



ANA CAROLINA SOARES DE OLIVEIRA



Determinação de um perfil de marcadores associados às alterações neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Dra. Camila Malta Romano

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Ana Carolina Soares de

Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1 / Ana Carolina Soares de Oliveira. – São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Camila Malta Romano

Descritores: 1. HIV. 2. MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS. 3. BIOMARCADORES.

USP/IMTSP/BIB-04/2018.

DEDICATÓRIA

**Dedico essa tese à memória de minha mãe,
Maria Aparecida de Oliveira.**

**E aos pacientes portadores de HIV,
por acreditarem e colaborarem com nosso trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à minha mãe, Maria Aparecida de Oliveira, em memória, por ser meu exemplo de vida e me ensinar, entre outras coisas, a ser forte e nunca desistir dos meus objetivos. Você é a razão desse trabalho e do meu amor ao tema.

À minha segunda mãe, Izanete Aparecida de Oliveira, pelo amor incondicional. Obrigada por ter sido a primeira pessoa a me apoiar na decisão de seguir carreira científica. Nunca serei grata o suficiente.

À Dra. Camila Malta Romano, minha orientadora e amiga. Obrigada primeiramente por me acolher. Obrigada por ter aceitado esse desafio comigo e pela confiança depositada em mim na execução do mesmo. Obrigada por todo apoio, incentivo e compreensão. Sabemos o quanto a caminhada foi difícil, mas chegamos lá.

Ao Prof. Dr. Claudio Sérgio Pannuti, por abrir as portas do Laboratório de Virologia do IMT-USP.

Ao grupo de neurociências do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, em especial ao Dr. Augusto Penalva, Dr. Jose Vidal, Dr. Jorge Casseb, Dra. Jerusa Smid e Rosa Marcusso, por todo conhecimento adquirido nas discussões científicas e pelo apoio clínico nesse projeto.

Ao Guilherme Olival pelo apoio clínico nas coletas de líquido.

À toda equipe de enfermagem do Hospital Dia do Instituto de Infectologia Emilio Ribas pelas coletas de sangue.

Às neuropsicólogas do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, em especial à Dra. Maria Rita Gascón e à Ana Caroline Martins, pelo enorme apoio na realização de avaliações neuropsicológicas, levantamento de dados e recrutamento de pacientes.

Ao Wellington Duarte e à Msc. Marilia Ladeira, por todo apoio no recrutamento dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

À Liã Bárbara Arruda, pela amizade e colaboração na genotipagem de HIV.

Ao Dr. José Eduardo Levi, pela confiança depositada e pela oportunidade de poder colaborar em diversos projetos.

Ao Prof. Heitor Franco, pela oportunidade de trabalhar no Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) da FMUSP.

Ao Dr. Toni Ricardo Martins, por todo apoio pessoal ao longo desse estudo.
Obrigada por me ouvir nos momentos mais críticos.

Aos amigos da virologia (e agregados): Luiz Nali, Bárbara Brito, Giovana Caleiro, Fabricia Madia, Felipe Scassi, Paulo Urbano, Tina Freitas, Francielle Cardoso, Charlys da Costa e Anderson.

Aos colegas da Virologia: Lucy, Nathalia, Silvia, Dra Cássia, Dra Clarisse, Dra Daisy, Clara, Laura, Cyri, Carol Mamana, Débora, Georgina, Alexandre, Paulo Braz, Marli, Maria, Luciana, Geovana, Midiã, Karina, Tânia, Maria, Vera, Wilton, Noeli e Jéssica, Cibele e Lucas.

Ao Luciano e à Sônia, por toda dedicação ao funcionamento do laboratório de Virologia.

À secretária da pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical, Eliane Araújo, por todo suporte prestado.

À FAPESP, pelo auxílio (2015/13853-7) e bolsa (2012/15469-1) concedidos.

À pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo

Por fim, à todos os voluntários que concordaram em participar desse estudo.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 HIV – Um breve histórico	20
1.2 Variabilidade Genética	21
1.3 Estrutura do HIV	22
1.4 Epidemiologia	22
1.5 História Natural da Doença	22
1.6 HIV e o Sistema Nervoso Central.....	24
1.7 Desordens Neurológicas Associadas ao HIV.....	24
1.8 História Natural das Alterações Neurocognitvas.....	25
1.9 Diagnóstico da HAND.....	26
1.10 Intervenções Farmacológicas	27
1.11 Biomarcadores e HAND.....	28
1.11.1 Marcadores de Ativação Celular.....	28
1.11.2 Marcadores de Neurodegeneração.....	30
1.11.3 Marcadores Genéticos	30
1.11.4 Marcadores Virais	31
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS.....	35
4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Desenho do Estudo.....	36
4.2 Locais e Período de Realização do Estudo.....	36
4.3 Seleção dos Participantes do Estudo	36
4.3.1 Critérios de Inclusão	36
4.3.2 Critérios de Exclusão	37
4.3.3. Aspectos Éticos.....	37
4.4 Procedimentos do Estudo.....	37
4.4.1 Coleta de Dados dos Participantes	37
4.4.2 Coleta de Amostras de Líquor.....	38
4.4.3 Coleta de Amostras de Sangue	38
4.4.4 Avaliação Neuropsicológica	38
4.4.5 Quantificação da Carga Viral do HIV	39
4.4.6 Extração de DNA	40
4.4.7 Genotipagem do HIV.....	40
4.4.8 Quantificação dos Peptídeos β -Amilóide1-40 e 1-42.....	42
4.4.9 Quantificação da Proteína Tau Total	43
4.4.10 Quantificação da Proteína Tau Fosforilada.....	43
4.4.11 Quantificação de CD14 Solúvel no Líquor.....	44
4.4.12 Quantificação de Citocinas, Quimiocinas e Apoe.....	46
4.4.13 Genotipagem da ApoE.....	46
4.4.14 Quantificação de Neurofilamentos	48
4.4.15 Quantificação de Neopterina.....	48
4.6 Escore de Efetividade de Penetração.....	49
4.7 Análise Estatística.....	50
5. RESULTADOS	51

5.1 População de Estudo.....	51
5.2 Carga Viral do HIV	53
5.3 Genotipagem do HIV	54
5.4 Exame Quimiocitológico	55
5.5 Marcadores de Neurodegeneração.....	55
5.6 Marcadores de Ativação Celular.....	57
5.7 ApoE.....	62
5.7.1 Quantificação da ApoE	62
5.7.2 Genotipagem da ApoE	65
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÃO	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
GRID	Gay Related Disease
NIH	National Institutes of Health
HTLV	Vírus T-linfotrófico Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
OMS	Organização Mundial da Saúde
CRF	Formas Recombinantes Circulantes
URF	Formas Recombinantes Únicas
Gp120	Glicoproteína 120
Gp41	Glicoproteína 41
P17	Proteína 17
P6	Proteína 6
P9	Proteína 9
nef	Fator de regulação negativa
vif	Fator de infectividade viral
vpr	Proteína viral R
vpu	Proteína viral U
tat	Transativador transcricional
TCD4	Linfócito T auxiliar
TCD8	Linfócito T citotóxico
SNC	Sistema Nervoso Central
HAND	Desordens Neurocognitivas associadas ao HIV
ANI	Alteração Neurocognitiva Assintomática
MND	Alteração Neurocognitiva Leve a Moderada
HAD	Demência associada ao HIV
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
TARV	Terapia Antirretroviral Ativa
ARV	Antirretroviral
CPE	Escore de efetividade de penetração
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
IL-8	Interleucina 8

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MCP-1	Proteína quimiotóxica de monócitos
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon
LPS	Lipopolissacarídeos
NFL	Neurofilamentos
AD	Doença de Alzheimer
Aβ	Amilóide β
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófagos-1 α
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
IL-6	Interleucina 6
IL-1β	Interleucina 1 β
IFN-γ	Interferon γ
ApoE	Apolipoproteína E
IEER	Instituto de Infectologia Emilio Ribas
RNA	Ácido Ribonucléico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
UV	Ultravioleta
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
IgG	Imunoglobulina G
SCD14	Grupamento de diferenciação 14 solúvel
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzimas
ITRN	Inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN	Inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
CV	Carga Viral
TH2	Célula T auxiliar 2

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μl	Microlitro
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro
β	Beta
γ	Gama
Ng	Nanograma
μM	Micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers para amplificar as regiões PR-RT e V3 - **41**

Tabela 2. Sequência dos primers para sequenciar as regiões PR-PT e V3 - **41**

Tabela 3. Descrição das características pessoais e da doença segundo grupos e resultados dos testes estatísticos - **52**

Tabela 4. Resultado das comparações múltiplas da idade entre os grupos - **53**

Tabela 5. Descrição dos marcadores de neurodegeneração segundo grupos e resultados dos testes comparativos - **56**

Tabela 6. Descrição dos marcadores de ativação celular segundo grupos e resultados dos testes comparativos - **58**

Tabela 7. Resultado das comparações múltiplas dos marcadores de ativação celular que foram estatisticamente diferentes entre os grupos - **60**

Tabela 8. Descrição da ApoE segundo grupos e resultados dos testes comparativos - **61**

Tabela 9. Resultado das comparações múltiplas de ApoE entre os grupos - **62**

Tabela 10. Resultado das funções discriminantes entre os grupos para os marcadores de neurodegeneração, de ativação celular e ApoE, ajustando por idade - **63**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de padronização do ensaio Human Scd14 Quntikine ELISA para líquido - **45**

Figura 2. Esquema de reação com o ensaio Taqman - **48**

Figura 3. Distribuição dos genótipos de HIV-1 na população estudada - **54**

Figura 4. Distribuição dos genótipos de HIV-1 nos grupos estudados - **55**

Figura 5. Boxplots da quantificação de INF- γ , IL-1 β e sCD14 nos grupos estudados - **59**

Figura 6. Boxplots da quantificação de ApoE nos grupos estudados - **62**

Figura 7. Gráfico de distribuição dos genótipos de ApoE na população estudada - **64**

Figura 8. Gráfico de distribuição do genótipo $\epsilon 4$ nos grupos estudados - **65**

LISTA DE QUADROS

Quadro1. Escore da efetividade de penetração dos antirretrovirais no sistema nervoso central - **49**

ANEXOS

Anexo A. Aprovação do comitê de ética da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo - **89**

Anexo B. Aprovação do comitê de ética do Instituto de Infectologia Emilio Ribas - **91**

Anexo C. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os grupos 1,2 e 3 (HAND)
- **96**

Anexo D. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo 4 (Controle HIV+)
- **100**

Anexo E. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo 5 (Controle HIV-)
- **105**

RESUMO

Oliveira ACS. *Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1.* Tese. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Apesar da introdução da HAART, formas leves de Transtornos Neurocognitivos Associados ao HIV (HAND) permanecem altamente prevalentes, afetando metade de todos os indivíduos infectados. A inflamação sistêmica e localizada induzida pelo HIV é considerada um dos mecanismos da HAND, e embora muitos biomarcadores potenciais tenham sido estudados, até o momento nenhum deles provou ser útil na prática clínica. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar os níveis de biomarcadores de ativação celular, neurodegeneração e virológicos, no líquido cefalorraquidiano (CSF), e também marcadores genéticos no sangue, buscando associá-los à presença de HAND. **Materiais e métodos:** Utilizando um desenho transversal, níveis dos marcadores de ativação celular sCD14, Neopterina, MCP-1, IL-1b, IL-6, TNF- α , CXCL-10, IFN- γ e MIP-1 α ; marcadores neuronais Tau, p-Tau, A β 40, A β 42 e Neurofilamentos; carga viral de HIV e níveis ApoE foram mensurados em 84 amostras de LCR, e a genotipagem do vírus, bem como a genotipagem da ApoE, foram feitas no sangue de 33 indivíduos infectados pelo HIV com alteração neurocognitiva assintomático (ANI), 15 com alteração neurocognitiva de leve a moderada (MND), 15 com demência associada ao HIV (HAD), 14 controles infectados pelo HIV (C HIV+) e 7 controles não infectados pelo HIV (C HIV-). Os dados clínicos também foram avaliados. **Resultados:** O parâmetro de idade diferiu estatisticamente entre os grupos, por isso foi ajustado para análise posterior. Os controles HIV+ e o grupo HAND estavam todos sob HAART e aproximadamente 96% deles apresentaram carga viral plasmática e líquórica suprimidas. Os marcadores de neurodegeneração não diferiram estatisticamente entre os grupos. No entanto, os marcadores de ativação celular IFN-gama, IL-1beta e sCD14, juntamente com a ApoE, mostraram diferenças significativas. A análise discriminatória revelou que ApoE e IL-1 β juntos possuem maior poder discriminatório para diferenciar o grupo HAND dos controles HIV+. A IL-1b mostrou um aumento progressivo no declínio cognitivo, enquanto os níveis de ApoE mostraram-se mais elevados nos controles HIV+, grupo que também teve a maior porcentagem de genótipo ϵ 4. sCD14 por sua vez mostrou-se elevado no grupo HAND, enquanto IFN- γ apresentou queda. **Conclusão:** Os resultados reforçam

o conceito de que a elevação da regulação das citocinas pró-inflamatórias, como sCD14 e IL-1beta, pode desempenhar um papel na patogênese da HAND, mesmo nos pacientes com supressão viral. Em contrapartida, nenhum marcador de neurodegeneração apresentou diferença estatística entre os grupos. É possível que as diferenças encontradas em relação a ApoE nos grupos, tanto em termos de regulação como a presença do genótipo e4, indique algum mecanismo compensatório, que poderia resultar em um fator protetor contra HAND, portanto deve ser melhor estudado.

Descritores: HIV, Manifestações neurológicas, Biomarcadores

ABSTRACT

Oliveira ACS. *Determination of a marker's profile associated with neurocognitive disorders in HIV-1 individuals.* Thesis. Sao Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, 2018.

Introduction: Despite the introduction of HAART, mild forms of HIV-associated Neurocognitive Disorders (HAND) remain highly prevalent, affecting half of all infected individuals. Systemic and localized inflammation induced by HIV is considered to be one of the mechanisms of HAND, and although many potential biomarkers have been studied, none of them have proven to be useful in clinical practice. Therefore, the objective of this study was to investigate the levels of biomarkers of cellular activation, neurodegeneration and virological, in the cerebrospinal fluid (CSF), as well as genetic markers in the blood, seeking to associate them with the presence of HAND. **Materials and methods:** Using a cross-sectional design, levels of the cell activation markers sCD14, Neopterin, MCP-1, IL-1b, IL-6, TNF- α , CXCL-10, IFN- γ and MIP-1 α ; neuronal markers Tau, p-Tau, A β 40, A β 42 and Neurofilaments; HIV viral load and ApoE levels were measured in 84 CSF samples, and virus genotyping and ApoE genotyping were done in the blood of 33 HIV-infected individuals with asymptomatic neurocognitive impairment (ANI), 15 with neurocognitive impairment (MND), 15 with HIV-associated dementia (HAD), 14 HIV-infected controls (C HIV +), and 7 non-HIV-infected controls (C HIV-). Clinical data were also evaluated. **Results:** The age parameter differed statistically between the groups, so it was adjusted for later analysis. HIV + controls and HAND group were all under HAART and approximately 96% of them had suppressed plasma and CSF viral load. Neurodegeneration markers did not differ statistically between the groups. However, the cell activation markers IFN-gamma, IL-1beta and sCD14, along with ApoE, showed significant differences. Discriminatory analysis revealed that ApoE and IL-1 β together have greater discriminatory power to differentiate HAND group from HIV + controls. IL-1b showed a progressive increase in cognitive decline, while ApoE levels were higher in HIV + controls, which also had the highest percentage of ϵ 4 genotype. sCD14 in turn showed to be elevated in the HAND group, while IFN- γ showed decrease. **Conclusion:** The results reinforce the concept that increased regulation of proinflammatory cytokines, such as sCD14 and IL-1beta, may play a role in the pathogenesis of HAND, even in patients with viral suppression. On the other hand, no neurodegeneration marker

ABSTRACT

presented statistical difference between groups. It is possible that the differences found regarding ApoE in the groups, both in terms of regulation and the presence of the e4 genotype, indicate some compensatory mechanism, which could result in a protective factor against HAND, so it should be better studied.

Descriptors: HIV, Neurological manifestations, Biomarkers

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIV – Um breve histórico

Os primeiros casos de aids foram relatados em 1981, nos Estados Unidos, em adultos do sexo masculino que mantinham contato sexual com outros homens, e foram a óbito devido doenças como sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocytis jirovecii*. Todos tiveram uma acentuada queda na contagem de células T CD4+¹. Por serem raros em adultos jovens, estes sinais e sintomas indicavam a ocorrência de algum tipo de alteração imunológica nesses indivíduos. Os padrões epidemiológicos e a predominância de pacientes homossexuais indicavam que a transmissão se dava por contato sexual, portanto a doença passou a ser denominada GRID (*Gay-Related Immunodeficiency Disease*) - Doença da Imunodeficiência Relacionada aos Gays².

Em 1982 foram detectados os mesmos sinais e sintomas em usuários de drogas injetáveis, trabalhadores do sexo e receptores de transfusões sanguíneas e hemoderivados. A doença então foi renomeada para aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)³. A primeira associação entre a aids e um agente viral ocorreu em 1983, quando Barrè-Sinoussi e colaboradores descobriram a atividade da transcriptase reversa, característica de vírus da família Retroviridae, em um vírus isolado do linfonodo de um paciente com síndrome da linfadenopatia persistente. Esse isolado foi então denominado LAV (Lymphadenopathy-associated virus) – Vírus Associado à Linfadenopatia⁴. Na mesma época, Dr. Robert C. Gallo, dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos (*National Institutes of Health* – NIH), responsável pelo isolamento do vírus HTLV-I e II, reportou um novo retrovírus, isolado de sangue periférico de pacientes com AIDS, e o denominou HTLV-III³. A nomenclatura HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) foi proposta três anos depois, em 1986^{5,6}. No mesmo ano outro vírus com características semelhantes foi isolado na região ocidental da África por Montagnier. Esse novo vírus, apesar de ter sido obtido de pacientes com AIDS, diferenciava-se mais de 40% em relação ao vírus isolado em 1983, portanto foi nomeado HIV-2 (tendo sido o vírus isolado em 1983 renomeado como HIV-1). Apesar de causarem a mesma doença os vírus distinguem-se por suas organizações genômicas, relações filogenéticas com outros lentivírus de primatas, e pela progressão da doença, que é mais lenta no HIV-2⁷.

1.2 Variabilidade Genética

O HIV apresenta uma alta variabilidade genética decorrente de sua alta taxa de mutação e de falhas durante o processo de replicação. Durante a infecção há a geração de aproximadamente 10 bilhões de partículas virais por dia que estão sujeitas a uma taxa de incorporação de erros de substituição nucleosídica de $2,5 \times 10^{-5}$ durante a transcrição reversa (*in vitro* a taxa é de cerca de $1,7 \times 10^{-4}$ erros por base incorporada por ciclo de replicação). Essas condições permitem o acúmulo de vantajosas alterações genéticas na população viral, permitindo que o HIV-1 resista às defesas do hospedeiro ⁸.

A recombinação é outro mecanismo que contribui significativamente para a diversidade genética do HIV-1, podendo gerar cepas mais virulentas, vírus resistentes aos medicamentos e até vírus com tropismo celular alterado, que pode levar ao comprometimento da eficácia terapêutica ^{9,10}. Essa grande variabilidade genética começou a ser observada a partir da caracterização molecular do HIV-1. Sequências da região do envelope, obtidos de isolados virais de um mesmo indivíduo, apresentaram até 5% de diferença.

Ao longo de 10 anos de infecção, outras sequências do mesmo paciente tiveram um aumento de 6-10% nas diferenças ¹¹. Com base nas diferenças genéticas observadas, os investigadores classificaram o HIV-1 em quatro grupos: M (Major), N (New), O (Outlier) e P (Putative). O grupo M, responsável pela incontestável maioria das infecções mundiais, foi subdividido em 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e 4 sub-subtipos (A1, A2, F1 e F2) ^{12,13}. O grupo O, endêmico no oeste da África Central, principalmente em Camarões, Gabão, Nigéria e Guiné Equatorial, não possui subdivisões, porém foi proposta a divisão em 5 grupos filogenéticos ^{14,15}. O grupo N, por sua vez, constituído por um número limitado de isolados em Camarões, é altamente relacionado ao Vírus da Imunodeficiência em Símios (SIVcpz) de chimpanzés da região ¹⁶. Por fim, uma nova variante do HIV, identificada em uma paciente originária de Camarões que apresentava um perfil raro, foi analisada e atribuída ao grupo P ¹⁷.

Há ainda formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs). As URFs não apresentam caráter epidêmico e possuem uma estrutura mosaico única, descrita em apenas um paciente ou, no máximo, entre indivíduos relacionados. As CRFs são capazes de manterem-se e expandirem-se em uma população de indivíduos. Para serem descritas é necessário o sequenciamento de 3 genomas

completos ou, no mínimo, 2 genomas completos e um parcial ¹⁸. Foram descritas até o momento 90 formas recombinantes circulantes, sendo sete delas no Brasil: CRF28_BF, CRF29_BF, CRF39_BF, CRF40_BF, CRF46_BF, CRF31_BC e CRF90_BF ¹⁸.

1.3 Estrutura do HIV

O HIV é uma partícula de aproximadamente 100nm de diâmetro, pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, e possui um genoma formado por duas fitas simples de RNA positivas e idênticas, capsídeo em forma de cone e longo período de incubação, como os demais retrovírus ¹⁹. O envelope viral, porção mais externa da partícula, é formado por uma bicamada fosfolipídica, de origem celular, por complexos protéicos formados pela gp120, proteína de superfície, e pela gp41, proteína transmembrana. Na gp120 estão localizados os sítios de ligação aos receptores celulares, permitindo a ligação ao vírus através de um complexo formado com a gp41 ¹⁹. Na porção mais interna encontra-se o capsídeo, formado pela proteína p24, e entre o envelope e o capsídeo está a matriz que é composta pela proteína p17 e pelo ácido mirístico. O nucleocapsídeo, envolto pelo capsídeo, é formado pelas proteínas p6 e p9, responsáveis pelo material genético. Ele abriga as duas fitas de RNA, as proteínas acessórias nef, vif e vpr e as enzimas virais protease, transcriptase reversa e integrase ^{20,21}.

1.4 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 36.7 milhões de pessoas estão infectadas. Em 2016, estima-se que 1,8 milhões de pessoas foram infectadas e um milhão morreu em decorrência da AIDS ²². A América Latina é a quarta região que mais apresenta casos de infecção por HIV e aids, sendo o Brasil o país com maior número de casos ²². De 1980 a junho de 2017, foram identificados no país 882.810 casos de aids no Brasil. O país tem registrado, anualmente, uma média de 40 mil novos casos de aids nos últimos cinco anos ²³.

1.5 História Natural da Doença

A infecção pelo HIV pode ser considerada crônica/persistente uma vez que o hospedeiro infectado não é capaz de eliminar o agente infeccioso. Após a exposição ao

HIV, e no caso de ocorrer infecção, o percurso patogênico desta infecção passa por três etapas principais e sequenciais: fase inicial, fase assintomática ou de latência clínica e fase sintomática ²⁴.

A infecção primária, ou síndrome viral aguda, é definida pelo período de tempo entre a infecção inicial e o desenvolvimento da resposta imunológica, e tem uma duração não superior a duas ou três semanas ^{25,26}. O quadro clínico é semelhante ao da gripe ou da mononucleose e reflete tanto o tropismo linfocitopático quanto o neurológico, do vírus, com o paciente a apresentar tipicamente sintomas agudos caracterizados por febre, letargia, mal-estar geral, mialgias, diarreia, vômitos, cefaléias, faringite, linfadenopatias, rash maculopapular, entre outros ²⁷. A gravidade e a duração dos sintomas têm implicações prognósticas, dado que quanto mais prolongados e graves eles forem, mais rápida é a progressão da doença para aids ^{28,29}. Nesta fase ocorre uma intensa replicação viral, com disseminação visceral e pelos tecidos linfóides, uma diminuição acentuada dos linfócitos T CD4+ e uma ausência de resposta imunológica por parte do hospedeiro ²⁵.

Após a infecção primária, segue-se a fase assintomática onde ocorre a recuperação clínica, com redução da replicação viral, em consequência do desenvolvimento da resposta imunitária. É nesta fase que ocorre a soroconversão, com desenvolvimento de anticorpos que persistem no organismo durante toda a vida. Vários fatores podem estar envolvidos no controle da replicação viral, incluindo a presença de anticorpos neutralizantes e células T citotóxicas. De uma forma geral, pode-se dizer que nesta etapa se atinge um equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imunitária do hospedeiro³⁰. Apesar da latência clínica, não existe latência virológica e nem imunológica. A viremia é constante e, após atingir um valor basal, que pode ser preditivo acerca da evolução da infecção, vai persistir durante todo o curso evolutivo da doença, embora com amplitudes variáveis. Durante esse período verifica-se, também, uma destruição de cerca de 50 a 100 linfócitos T por ano, mas bem mais acentuada nos anos que precedem o aparecimento da aids ^{31,32}

Por fim, na fase sintomática ocorre intensa replicação viral e diminuição da resposta imunológica, devida à diminuição gradual dos linfócitos T CD4+ ao longo da fase assintomática, que favorece o aparecimento de neoplasias e infecções oportunistas de gravidade e potencial letal crescentes. Este período pode durar alguns meses ou vários anos ³⁰⁻³².

1.6 HIV e o Sistema Nervoso Central

Desde o início da pandemia de aids ficou evidente uma predisposição por parte dos pacientes infectados pelo HIV-1 à neoplasias e infecções oportunistas que, de certa forma, acabaram tornando-se marcadores indiretos da doença, além de elevar consideravelmente a morbimortalidade dos indivíduos. Essa predisposição está relacionada ao grave comprometimento imunológico, principalmente da imunidade celular ³³.

O vírus infecta tanto células do sistema linfóide quanto do sistema nervoso central (SNC), podendo ser detectado no líquido cefalorraquidiano e no tecido cerebral durante todo o curso da infecção, sem que necessariamente o paciente apresente algum sintoma neurológico ³⁴. O SNC pode ser considerado um santuário para o HIV-1 e é o segundo local mais comum de manifestações clínicas ³⁵. Infelizmente, a deficiente penetração de algumas drogas antirretrovirais através da barreira hematoencefálica favorece a replicação do vírus nesse sítio, particularmente em macrófagos, micróglia e células multinucleadas da glia, acometendo neurologicamente de 40% a 70% dos portadores do vírus no curso da sua infecção ^{36,37}. Em um estudo que avaliou tecido cerebral de 284 indivíduos positivos para o HIV-1, foi visto que a frequência de lesão causada pelo vírus chegou a 90% ³⁸.

O HIV atravessa a barreira hematoencefálica através da infiltração de monócitos infectados que posteriormente diferenciam-se em macrófagos. Esse mecanismo é conhecido como “cavalo de Tróia” ³⁹. No cérebro, as células infectadas secretam toxinas que levam ao dano e morte neuronal, sendo que a extensão desse dano está ligada ao nível do déficit neurológico clínico. As neurotoxinas liberadas pela micróglia e pelos macrófagos ocasionam a secreção de citocinas e quimiocinas que alteram a arquitetura sináptica do córtex, porém os mecanismos que levam ao dano cognitivo não estão totalmente elucidados ⁴⁰.

1.7 Desordens Neurológicas Associadas ao HIV

As desordens neurológicas associadas ao HIV (HAND, *HIV-associated neurologic disorders*) são caracterizadas por evolução progressiva com comprometimento nas esferas cognitivas, comportamental e motora, característico das demências subcorticais. São classificadas em: alteração neurocognitiva assintomática

(ANI, *asymptomatic neurocognitive impairment*), desordem neurocognitiva leve/moderada (MND, *mild neurocognitive disorder*) e demência associada ao HIV (HAD, *HIV-associated dementia*). Na ANI há alteração de dois ou mais domínios cognitivos na avaliação neuropsicológica, porém sem comprometimento funcional das atividades da vida diária. Na MND há alteração de dois ou mais domínios com comprometimento funcional de leve a moderado. Já na HAD há graves alterações de dois ou mais domínios com comprometimento severo da vida diária ⁴¹.

A HAD costuma manifestar-se nos estágios mais avançados da doença, porém em 5% dos casos os pacientes podem desenvolvê-la no início da infecção ⁴². Antes da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) a incidência de HAD chegava a 14% ⁴³, porém, como consequência da reconstituição imune alcançada com a introdução da terapia, houve um declínio no número de casos relatados ^{44,45}. Apesar disso, é necessário ter cautela ao interpretar esses dados, visto que simultaneamente há relatos de aumento da prevalência e incidência de ANI e MND ⁴⁶. Há também relatos de aumento da proporção de indivíduos com melhor imunidade (indicada pela contagem de linfócitos T CD4 maior que 200 céls/mm³) que desenvolvem HAND ^{45,46}.

1.8 História Natural das Alterações Neurocognitivas

As manifestações caracterizam-se por uma evolução progressiva, de forma variável, das esferas cognitiva, comportamental e motora, características das demências subcorticais ⁴⁷. Os sintomas são leves nas fases iniciais e incluem déficit de memória, lentidão do processamento mental, perda da capacidade de concentração, apatia e perda de interesse no trabalho e nas atividades cotidianas ⁴⁸. Nos quadros leves e moderados, os sintomas são mais discretos, e podem permanecer estáveis ou lentamente progressivos durante anos.

Com a evolução da doença, os déficits tornam-se mais graves e há maior comprometimento da realização das tarefas da vida diária. Distúrbios da marcha, tremor e perda da habilidade motora fina são comuns, geralmente acompanhando os sintomas psiquiátricos ^{49,50}. Em estágio avançado da doença, o paciente é incapaz de realizar atividades simples de forma independente e apresenta intensa dificuldade motora, frequentemente acompanhada de mielopatia e neuropatia periférica. A HAART mudou o curso da história natural das HAND, estabilizando ou melhorando a maioria dos casos mais graves ⁵¹. Por outro lado, as categorias se tornaram dinâmicas e bidirecionais e vários

padrões evolutivos podem ser identificados. O início oportuno da HAART constitui a melhor estratégia preventiva, evitando-se o baixo nadir de TCD4+, considerado o principal fator de risco associado às HAND ⁵².

1.9 Diagnóstico da HAND

O “Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos” (disponível em www.aids.gov.br) ganhou em 2013 um capítulo sobre alterações neurocognitivas associadas ao HIV. Nele são apresentados os testes neuropsicológicos, utilizados até agora como única ferramenta de diagnóstico.

Recomenda-se que as seguintes esferas cognitivas sejam rastreadas no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV, antes do início da HAART; depois, anualmente (em pacientes com fatores de risco para HAND, a triagem pode ser realizada a intervalos de 6 meses):

- Memória (“você tem perda de memória frequente? Esquece-se de eventos especiais ou reuniões, inclusive aquelas mais recentes?”)
- Lentificação psicomotora (“você sente que está mais lento quando pensa, planeja atividades ou resolve problemas?”) e/ou
- Atenção (“você tem dificuldades para prestar atenção, por ex., ao conversar, ler um jornal ou assistir a um filme?”)

A triagem também deve ser realizada caso exista evidência de deterioração clínica. Caso haja pelo menos uma resposta consistentemente afirmativa, recomenda-se continuar com a aplicação de um questionário que avalie o desempenho nas atividades cotidianas, conhecidas como atividades instrumentais da vida diária (IADL, Instrumental Activities of Daily Living). Se essa ferramenta indica alteração (classificação como dependência parcial ou total), recomenda-se uma avaliação neuropsicológica formal.

É importante lembrar que a avaliação do Mini-Exame do Estado Mental, classicamente utilizado como ferramenta de triagem para demências corticais do tipo Alzheimer, é habitualmente normal em pacientes com alteração neurocognitiva. A escala internacional para HAD (IHDS, International HIV Dementia Scale) é uma ferramenta desenhada para a triagem, que pode ser aplicada em poucos minutos, não sofre influência

da escolaridade e foi validada transculturalmente. Possui sensibilidade (~80%) e especificidade (~57%) razoáveis, com nota de corte ≤ 10 para o diagnóstico de HAD.

Para identificar casos prováveis de HAD e MND, em contextos de impossibilidade de avaliação neuropsicológica formal, propõe-se a IHDS como instrumento. Nesse cenário, sugere-se utilizar a nota de corte ≤ 11 , adaptando os resultados de estudo recente, o qual identificou que esse valor apresenta boa sensibilidade (~74%) e moderada especificidade (50%) na triagem de pacientes com todas as formas de HAND.

Os pacientes com infecção pelo HIV apresentam uma alta prevalência de condições ou comorbidades independentemente associadas às alterações neurocognitivas, as quais podem contribuir ou explicar completamente o déficit cognitivo e confundir o diagnóstico de HAND. Portanto, é fundamental avaliar a presença de doenças psiquiátricas graves, abuso de medicamentos psicotrópicos e álcool, sequelas de doenças neurológicas oportunistas ou outras doenças neurológicas (por ex., doença cerebrovascular, traumatismo crânio-encefálico), doenças infecciosas oportunistas ou outras doenças neurológicas atuais (por ex., encefalopatias metabólicas).

A avaliação laboratorial de todo paciente com suspeita de HAND deve incluir: dosagem de vitamina B12, ácido fólico, TSH, T4 livre, VDRL, perfil bioquímico (função renal, hepática e glicemia) e hematológico completo.

1.10 Intervenções Farmacológicas

Embora seja totalmente aceito que os pacientes com HAND, não tratados, precisam ser iniciados no TARV, a questão de como tratar é menos clara com os pacientes já em TARV. Se ainda houver replicação contínua do vírus do plasma, isso deve ser obviamente eliminado pela adaptação dos ARV. Se o vírus do plasma estiver suprimido, a punção lombar para a determinação da carga viral do LCR e, se possível, a genotipagem para verificação de vírus resistente, deve ser feita.

A estratégia central do tratamento das HAND, embora ainda seja controverso o seu real benefício clínico, fundamenta-se no conceito do escore da efetividade de penetração dos antirretrovirais no sistema nervoso central (SNC) (CPE, CNS penetration effectiveness), o qual estima a efetividade combinada dos ARV no SNC. Este modelo foi inicialmente proposto por Letendre e colaboradores em 2008⁵⁴.

Esse escore é baseado nas propriedades químicas que influenciam a penetração dos medicamentos pela barreira hematoencefálica (por ex., baixa ligação protéica, baixo peso molecular, maior solubilidade lipídica), dados farmacocinéticos (principalmente concentrações no líquido comparadas com concentrações inibitórias para o HIV do tipo selvagem), e, quando disponíveis, dados farmacodinâmicos (impacto na carga viral líquórica e desempenho neurocognitivo, resultante de estudos clínicos). O escore CPE tem demonstrado correlação com a diminuição da carga viral líquórica do HIV e melhora cognitiva na maioria de estudos, mas não em todos.

Vários autores trabalharam no impacto da penetração do SNC na carga viral do LCR e nos parâmetros clínicos cognitivos. A maioria dos estudos mostrou maiores níveis de CPE associados a menores cargas virais no LCR ^{55,56,57}. Porém, não é claro se isso se traduz em melhora neurocognitiva. Dois estudos observacionais recentes mostraram desfechos desejáveis e estatisticamente significativos ^{58,59}. Outros dois estudos randomizados examinaram prospectivamente os regimes com pontuações CPE superiores ou inferiores. Um deles mostrou resultados cognitivos ligeiramente melhores com maiores escores de CPE ⁶⁰ e o outro observou melhora cognitiva independente de escore de CPE, principalmente no subgrupo com viremia plasmática suprimida ⁶¹.

Não há consenso sobre melhor desempenho neurocognitivo com o uso de ARV com maior penetração no SNC, no entanto, ao menos em pacientes com doença sintomática, é recomendado que esse aspecto seja levado em consideração.

1.11 Biomarcadores e HAND

Os pacientes com HAND frequentemente apresentam níveis elevados de RNA viral no líquido cefalorraquidiano (LCR) bem como de marcadores de imunoativação persistente ^{62,63}. Porém, esses marcadores podem estar elevados também em pacientes sem comprometimento neurológico perceptível, portanto marcadores mais específicos são necessários para identificar uma lesão cerebral. Dessa forma, tais marcadores específicos poderiam, em conjunto, ser úteis como ferramenta de diagnóstico e prognóstico de HAND, ou no mínimo auxiliarem no entendimento da ocorrência e evolução das desordens neurocognitivas causadas pelo HIV ⁶⁴.

1.11.1 Marcadores de Ativação Celular

A imunoativação persistente favorece a expressão de genes de apoptose e citocinas pró-inflamatórias^{65,66,67}. Os linfócitos T que expressam CD38 demonstram uma secreção anormal de citocinas⁶⁸, o que sugere que o HIV-1 altera a regulação gênica e funcional da célula, bem como seu número. Apesar da diminuição da inflamação associada ao HIV-1 com o uso da HAART, ela ainda é significativamente maior do que em controles negativos⁶⁹. Essa imunoativação é associada, entre outras coisas, com o envelhecimento acelerado⁷⁰.

As citocinas inflamatórias provavelmente desempenham um papel muito importante durante a ativação imune persistente visto que seus níveis correlacionam com a progressão da doença^{71,72,73}. Yuan e colaboradores compararam a expressão de 26 citocinas em pacientes portadores de HIV com e sem HAND e encontraram diferenças significativas entre os dois grupos, com maiores concentrações de IL-8, IP-10 e MCP-1 no LCR dos pacientes com HAND, sugerindo que a avaliação dos níveis de citocinas no líquido podem auxiliar no diagnóstico de HAND⁷⁴. Os autores ainda verificaram que a IL-8 é a ligante endógena dos receptores CXCR1 e CXCR2, produzidos por monócitos e macrófagos, que apresentam um número aumentado durante lesões cerebrais e neuroinflamações^{75,76}. A MCP-1 é capaz de atrair e ativar monócitos e macrófagos, e embora ofereça uma proteção parcial no início da infecção, uma vez estabelecida, torna-se mediadora de inflamação e recrutadora de leucócitos^{77,78}. Por fim, IP-10/CXCL10 é expresso por astrócitos e micróglia no cérebro, e atua especificamente na ativação de células T e macrófagos e atrai linfócitos T para o LCR⁷⁹.

Outra causa da imunoativação persistente é a presença de lipopolissacarídeos (LPS) no sangue. O LPS é um produto da parede bacteriana que resulta da translocação bacteriana (passagem de bactérias do intestino para o sistema circulatório) por um mecanismo não totalmente esclarecido. Foi proposto que o aumento de LPS circulante contribui para a ativação de monócitos na infecção crônica pelo HIV e, juntamente com outros estudos, foi demonstrado que o LPS circulante pode estar relacionado com o desenvolvimento de HAD devido ao tráfego de monócitos ativados ao SNC através da barreira hematoencefálica^{71,80,81,82,83,84,85}. Uma forma de avaliar o impacto de LPS na HAND é através da fração solúvel de seu receptor CD14, que quando aumentada, tanto em plasma quanto em líquido, indica ativação de monócitos e correlaciona-se positivamente com a presença das alterações neurocognitivas^{86,87,88}.

1.11.2 Marcadores de Neurodegeneração

Nos estudos de marcadores de lesão neuronal, podemos citar a relevância dos neurofilamentos (NFL) no líquido de pacientes que apresentam alterações neurocognitivas. Há relatos na literatura sugerindo que doenças neurodegenerativas relacionadas à desmielinização e/ ou degeneração axonal (tais como as HAND), apresentam elevados índices de NFL no fluido cérebro-espinhal ^{89,90,91}. Os NFL correspondem aos principais constituintes do citoesqueleto das células neuronais, importantes para a manutenção da integridade estrutural e calibre dos axônios e dendritos, e estão envolvidos na influência da velocidade na condução dos impulsos de correntes nervosas. Portanto, a presença de NFL no fluido cérebro-espinhal é considerado um marcador de lesão axonal no SNC no curso da infecção por HIV ⁶⁴.

Marcadores bem relatados na doença de Alzheimer (AD) também têm sido estudados na HAND ⁹². São eles β -amilóide (A β 42), Tau total (t-tau) e tau fosforilada (p-tau). Alguns estudos detectaram diminuição significativa de A β 42 e aumento das concentrações de t-tau e p-tau no líquido de indivíduos com HAND, semelhantes aos achados em indivíduos com AD ^{93,94}. Observações adicionais ligando HAND e processos associados a amilóide incluem relatos de evidência neuropatológica de maior deposição de A β 42 nos cérebros de indivíduos com HIV, em relação aos controles da mesma idade ⁹⁴, e a presença de placas difusas aumentadas em cérebros de indivíduos portadores do vírus ⁹⁵. Demonstrou-se também que, nas membranas celulares neurais de agregados de cérebro humano, a proteína reguladora de transativação de transcrição de HIV-1, Tat, pode inibir a endonuclease que atua na degradação de A β , o constituinte peptídico primário de amilóide em DA ⁹⁵.

1.11.3 Marcadores Genéticos

Apolipoproteína E (APOE) ϵ 4 é um fator de risco bem estabelecido para a doença de Alzheimer ^{96,97} e tem sido associado a resultados cognitivos fracos em várias outras condições que causam lesão cerebral, como cirurgia de derivação cardíaca ^{98,99}, lesões cerebrais traumáticas ^{100,101}, e em indivíduos mais jovens com esclerose múltipla ¹⁰². O polimorfismo do gene APOE também desempenha um papel significativo na progressão da doença do HIV ¹⁰³. Especificamente, os indivíduos infectados pelo HIV com o alelo ϵ 4 de APOE podem ser mais suscetíveis a deficiências neurológicas, contribuindo para

uma maior incidência de neuropatia periférica e demência associada ao HIV ^{104,105}, especialmente em indivíduos mais velhos ¹⁰⁶. Em um estudo pós-morte, indivíduos com HAD e portadores do alelo $\epsilon 4$, exibiram metabolismo desregulado de esterol ¹⁰⁷ e maiores níveis de peroxidação lipídica, indicando maior estresse oxidativo em seus cérebros ¹⁰⁸.

1.11.4 Marcadores Virais

Há estudos moleculares que associam uma maior incidência de HAND à determinado subtipo de HIV ^{109,110}. Por outro lado, um estudo recente feito em Uganda não detectou nenhuma associação significativa entre os subtipos de HIV e alterações neurocognitivas, indicando que não há um consenso sobre a relação entre subtipos do vírus e incidência de HAND ¹¹¹.

Há também estudos que avaliam o impacto da compartimentalização do HIV nos pacientes com alterações neurocognitivas, mostrando que existe correlação entre o aumento na compartimentalização, ou seja, da evolução do vírus no sistema nervoso central através da replicação independente, com a presença de HAD ^{112,113,114}. Salemi e colaboradores sequenciaram o gene do envelope de vírus obtidos de diferentes partes do cérebro de um paciente que veio a falecer com HAD severa. Eles não somente observaram que havia subpopulações distintas nos diferentes compartimentos, mas também que os vírus presentes nas meninges e lobo temporal evoluem cerca até 100 vezes mais rápido do que as outras populações virais amostradas no cérebro, sendo possivelmente as origens da infecção no SNC ¹¹⁵. Corroborando esse achado, anos depois Schnell e colaboradores também mostraram compartimentalização em alguns indivíduos recém infectados, com a presença de variantes distintas encontradas no CSF ¹¹³. Em alguns trabalhos inclusive, a importância dessa variabilidade se restringe a determinadas regiões do vírus, como o gene Tat, por exemplo ¹⁰⁹.

Mesmo com tantas evidências apontando para uma associação entre compartimentalização e o desenvolvimento de desordens neurológicas, ainda não se tem uma visão clara e contundente sobre o papel da genética viral sobre a HAND.

2. JUSTIFICATIVA

A penetração do HIV no sistema nervoso central (SNC) ocorre geralmente durante a infecção sistêmica primária. Embora essa infecção assuma caráter silencioso na maioria dos indivíduos, em alguns casos pode evoluir para formas mais invasivas de encefalites, acarretando diferentes graus de desordens neurocognitivas ¹¹¹.

É inegável o impacto que a introdução da terapia antirretroviral de alta potência (HAART) teve na incidência de demência associada ao HIV (HAD), retardando seu início e também sua progressão. Em contrapartida, nos últimos anos houve um considerável aumento de pacientes com alterações neurocognitivas assintomáticas (ANI) e em graus que variam de leve a moderado (MND). É importante ressaltar que grande parte desses indivíduos está infectada há longa data, mas mantém a doença sistêmica controlada através do tratamento ^{44,109}. Isso é especialmente preocupante, pois embora a incidência de demência tenha diminuído, o controle virológico e imunológico alcançado com os tratamentos atuais (HAART) não são suficientes para evitar o comprometimento neurológico em algum grau.

Uma vez que o diagnóstico depende principalmente do estágio e gravidade (extensão do comprometimento das funções neurológicas), isso não somente desafia a eficácia das terapias atuais para a prevenção e tratamento da infecção do SNC pelo HIV, mas principalmente reflete as dificuldades na definição da natureza e dos processos evolutivos dessa doença.

Até o presente momento, a única maneira de confirmar o diagnóstico e classificar as HAND é por meio de uma avaliação neuropsicológica formal, porém, a imprecisão do reconhecimento fenotípico da doença, somado aos frequentes fatores de confusão, apontam para a necessidade de inclusão de biomarcadores para o diagnóstico mais preciso, bem como para a avaliação dos efeitos do tratamento e compreensão da evolução dessa comorbidade ¹¹².

Assim como a progressão da infecção sistêmica pode ser monitorada através de marcadores presentes no sangue (como quantificação de carga viral do HIV e contagem de células T CD4, entre outros), tem sido proposta a utilização de biomarcadores líquóricos para a avaliação de danos ao SNC. A carga viral do HIV é, evidentemente, um dos marcadores propostos, e que tem sido utilizado em alguns centros como um auxiliar

para o fechamento do diagnóstico de HAND. Entretanto, além do HIV ser detectado no líquido de pacientes não tratados sem que se saiba avaliar quais as consequências imediatas disso, não é infrequente a detecção de cargas virais baixíssimas no LCR de indivíduos apresentando demência já avançada.

Crucialmente, o diagnóstico precoce e definitivo das HAND é crítico para a tomada de decisões acerca do protocolo de tratamento que deve ser adotado/modificado. Isto posto, fica claro que testes neuropsicológicos, exames de imagem e marcadores líquidos isoladamente não são suficientes para o fechamento do diagnóstico das HAND, principalmente em estágios bastante iniciais, onde fatores externos e sintomas se confundem, impactando não somente a qualidade de vida do indivíduo, bem como na tomada de decisão terapêutica.

O entendimento das alterações neurocognitivas associadas ao HIV ainda é uma ciência em construção, assim, o que esse trabalho propôs foi um aprofundamento no estudo de fatores relacionados à resposta do hospedeiro, à lesão cerebral e também fatores virológicos e genéticos que permitissem identificar possíveis marcadores que pudessem auxiliar no diagnóstico diferencial das HAND e na discriminação dos seus diferentes graus.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal identificar possíveis marcadores biológicos que pudessem auxiliar na distinção do perfil de pacientes diagnosticados com alterações neurocognitivas do perfil de indivíduos saudáveis (com e sem HIV).

Os objetivos específicos são:

- Analisar marcadores de ativação celular;
- Analisar marcadores de neurodegeneração;
- Analisar marcadores genéticos;
- Analisar marcadores virológicos.

4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

O trabalho foi realizado com delineamento de um estudo transversal com componente descritivo e analítico.

4.2 Locais e Período de Realização do Estudo

O recrutamento dos sujeitos do estudo e a coleta de amostras de sangue e líquido realizadas no Hospital Dia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) durante o período de dezembro de 2014 a março de 2016.

O processamento das amostras e os ensaios para a determinação de Tau, p-Tau, β -amilóide, Neurofilamentos, Neopterin, SCD14 e a genotipagem da ApoE foram executados no Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52); a carga viral e a genotipagem do HIV foi feita no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56); os ensaios para quantificação de citocinas e ApoE foram feitos no Laboratório de Investigação Médica em Inflamação (LIM-17).

4.3 Seleção dos Participantes do Estudo

A população de estudo foi selecionada entre pacientes oriundos de um estudo de prevalência de neuropatia periférica e demência associada ao HIV, executado no IIER, sob a coordenação da Dra. Maria Rita Polo Gascón. Após apresentação do protocolo de pesquisa e obtenção da anuência voluntária, foram recrutados 77 indivíduos. Os indivíduos do grupo controle sem HIV foram recrutados separadamente, uma vez que não haviam indivíduos nessas condições incluídos no trabalho mencionado.

Os critérios de inclusão e exclusão estão listados a seguir.

4.3.1 Critérios de Inclusão

Para indivíduos dos grupos HIV positivo: diagnóstico de infecção pelo HIV, acompanhados no ambulatório do IIER, com idade igual ou superior a dezoito anos, e com escolaridade mínima de quatro anos.

Para indivíduos do grupo HIV negativo: idade igual ou superior a dezoito anos, teste negativo para HIV, e com escolaridade mínima de quatro anos.

4.3.2 Critérios de Exclusão

Diagnóstico concomitante de doenças neurológicas oportunistas em atividade (toxoplasmose cerebral, neurotuberculose, meningite criptocócica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, entre outras);

- Condições previamente documentadas (traumáticas, metabólicas, vasculares ou degenerativas) que dificultem a avaliação dos sintomas e sinais neurológicos (demência senil ou vascular, neuropatia diabética, entre outras);
- Uso de substâncias psicoativas;
- Incapacidade para compreender os conteúdos necessários para a avaliação neurológica e aplicação dos testes incluídos na bateria de avaliação;
- Ausência de consentimento para participar do estudo;
- Escolaridade inferior a quatro anos;
- Menores de dezoito anos.
- Gestantes

4.3.3. Aspectos Éticos

Os indivíduos que aceitaram participar desta pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os indivíduos com distúrbios cognitivos ou demência em grau que impedia o completo entendimento do TCLE foram autorizados por um responsável maior de 18 anos através da assinatura do termo em questão. Todos os dados individuais foram mantidos sob sigilo. É importante ressaltar que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (659.363) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (1.327.226).

4.4 Procedimentos do Estudo

4.4.1 Coleta de Dados dos Participantes

Os dados demográficos foram coletados no momento da apresentação da pesquisa e assinatura do TCLE. Os dados clínicos e laboratoriais de interesse foram coletados através dos resultados de exames disponíveis no HCMED, mediante autorização dos indivíduos.

4.4.2 Coleta de Amostras de Líquor

A punção líquórica foi realizada em acordo com todas as práticas internacionalmente aceitas, pelo Dr. Guilherme Olival, médico especializado em coleta de líquido do ambulatório multifuncional do IIER. Todas as amostras de LCR foram submetidas a exame quimiocitológico, no laboratório Central do HCFMUSP. Seis mililitros (6 mL) da amostra bruta foram aliquotados em tubo de polipropileno, até 2 horas após a coleta, e armazenados em freezer a -80°C .

4.4.3 Coleta de Amostras de Sangue

As amostras de sangue periférico foram obtidas por meio de punção venosa, em um tubo de dez mililitros (10 mL), contendo um mililitro (1 mL) de anticoagulante Ácido Citrato Dextrose (ACD). Estas amostras foram aliquotadas em até quatro horas após a coleta e armazenadas em freezer -80°C .

4.4.4 Avaliação Neuropsicológica

Todos os indivíduos recrutados nesse estudo foram submetidos a uma bateria de testes neuropsicológicos, que consistem na avaliação de múltiplos domínios cognitivos como: atenção, função executiva, memória verbal, linguagem, velocidade motora, entre outros. Através do Z score da pontuação de cada teste, é possível determinar quais domínios apresentam-se preservados e/ou comprometidos e, a partir desses dados, determinar se o indivíduo apresenta ou não declínio cognitivo.

Para a determinação do grau de comprometimento (assintomático, leve a moderado ou demência) foram utilizados os critérios de Frascati ⁴¹.

- Alteração Neurocognitiva Assintomática (ANI, asymptomatic neurocognitive impairment): há alterações de \geq dois domínios cognitivos, em pelo menos um desvio

padrão abaixo da média na avaliação neuropsicológica com testes padronizados e pontuações apropriadas para idade e escolaridade. A avaliação deve incluir as funções: visual, linguagem, atenção, memória, abstração, função executiva, velocidade de processamento das informações, habilidades motoras. Não pode haver comprometimento funcional nas atividades de vida diária e critérios para delirium e demência, bem como, evidências de outras causas pré-existentes para o déficit.

- **Comprometimento Neurocognitivo Leve/Moderado (MND, mild neurocognitive disorder):** há alterações de \geq dois domínios cognitivos em pelo menos um desvio padrão abaixo da média na avaliação neuropsicológica com testes padronizados e pontuações apropriadas para idade e escolaridade. A avaliação deve incluir as mesmas funções já mencionadas. A diferença desta classificação para a anterior é a presença do comprometimento funcional leve a moderado nas atividades da vida diária. Também, não podem existir critérios para delirium e demência, bem como, evidências de outras causas pré-existentes para o déficit.

- **Demência Associada ao HIV (HAD, HIV-associated dementia):** há alterações graves de \geq dois domínios cognitivos, geralmente o distúrbio é encontrado em múltiplos domínios, especialmente no aprendizado de novas informações, alentecimento no processamento de novas informações e déficit em atenção e concentração. O déficit cognitivo ocasiona comprometimento grave nas atividades da vida diária (trabalho, atividades em casa e atividades sociais). Também, não podem existir critérios para delirium ou evidência de outras causas pré-existentes para o déficit como: infecções no SNC, acidente vascular cerebral, doenças neurológicas pré-existentes, uso de drogas ilícitas.

4.4.5 Quantificação da Carga Viral do HIV

A quantificação da carga viral de HIV no plasma e no liquor foi feita no LIM- 56, sob responsabilidade do Dr. Jorge Casseb. Uma alíquota do RNA extraído do liquor dos pacientes HIV-1 positivos foi enviada ao laboratório LIM-56 para a realização dos testes. O ensaio Abbott Real Time HIV-1 é uma reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), para a quantificação do vírus da

imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) no sistema automatizado Abbott m2000rt™, dentro do intervalo de 40 a 10 milhões de cópias /ml.

Uma sequência de RNA, não relacionada com a sequência alvo de HIV-1, é introduzida no início da preparação da amostra e serve como um controle interno (CI). A quantidade de sequências alvo de HIV-1 presentes em cada ciclo de amplificação é medida através da utilização de sondas de oligonucleotídeos marcados com fluorescência no instrumento m2000 (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). O ciclo de amplificação em que o sinal fluorescente é detectado é proporcional ao logaritmo da concentração de RNA de HIV-1 presente na amostra.

4.4.6 Extração de DNA

Alíquotas de 200 µL de sangue total coletado em tubos contendo EDTA foram submetidas ao isolamento de DNA proviral total utilizando o *Qiampr DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada utilizando espectrofotômetro *ND-1000 Spectrophotometer v.3.5* (NanoDrop Technologies, EUA).

4.4.7 Genotipagem do HIV

As *nested* PCRs para amplificar os fragmentos de PR-RT foram realizadas utilizando o protocolo adaptado de Barreto e colaboradores¹¹⁶ em reações contendo 1 X *Buffer I*, 2,0 mM MgSO₄, 0,1 mM de cada dNTPs, 0,1 µM dos respectivos *primers*, 1 U *Platinum Taq DNA Polymerase* e 2,5 µL de DNA *template* para um volume final de 25 µL para a reação externa e 50 µL para a reação interna. Para as reações externas foram utilizados os primers K1 e K2, enquanto para as reações internas foram utilizados DP16 e RT4 (Tabela 1). As reações externas foram submetidas à desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1m, 68 °C por 1 min e 30 s, com extensão final a 68 °C por 10 min. A ciclagem das reações internas consistem em um ciclo a 94 °C por 3 min, 55 °C por 1 min e 68 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 45 s e 68 °C por 1 min, com extensão final a 68 °C por 10 min¹¹⁶.

Tabela 1 – Sequências dos primers para amplificar as regiões PR-RT e V3

Nome do primer	Sequencia 5' > 3'	Coordenada HXB2 ¹
PR-RT		
K1	CAGAGCCAACAGCCCCACC	2147 - 2165
K2	TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA	3338 - 3308
DP16	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC	2206 - 2274
RT4	AGTTCATAACCCATCCAAAG	3250 - 3231

Nota: ¹Coordenadas em relação a sequência referência HXB2, acesso no GenBank nº K03455

Os produtos da PCR interna foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100 V por 60 min. A visualização foi realizada pela adição de SybrSafe ao gel, sob incidência de luz UV. A quantificação e a determinação do tamanho dos fragmentos foi realizada utilizando os padrões de peso molecular de 100 pb como parâmetro de tamanho de fragmento e *Low DNA Mass* como parâmetro de concentração. Foram considerados produtos de PCR adequados os fragmentos de PR-RT com aproximadamente 1024 pb apresentando concentração entre 20 e 100 ng. Estes produtos foram purificados com o *Qiaquick PCR Purification kit* (Qiagen, Alemanha), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *kit ABI PRISM Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, EUA), adicionando 20 a 100 ng dos produtos amplificados purificados e 0,25 µM dos *primers* senso F1 e GABO1 e antissenso DP11, GABO2 e RT4 (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências dos *primers* para sequenciar as regiões PR-RT e V3

Nome do primer	Sequencia 5' > 3'	Posição sobre HXB2 ¹
PR-RT		
F1	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC	2519 - 2539
DP11	CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	2598 - 2572
RT4	AGTTCATAACCCATCCAAAG	3250 - 3231
GABO1	CTCARGACTTYTGGGAAGTTC	2800 - 2820
GABO2	GCATCHCCCACATCYAGTACTG	2890 - 2869

Nota: ¹ Posição sobre a sequência referência HXB2, acesso no GenBank nº K03455

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador convencional seguindo 25 ciclos de 96°C por 10 s, 55°C por 5 s e 60°C por 4 min. Os produtos foram purificados utilizando etanol absoluto e EDTA (125mM), seguido de uma lavagem com etanol 70%. A placa seca foi conduzida ao serviço de sequenciamento onde ao *pellet* seco foram adicionados 10 µL de formamida, seguido de uma etapa de desnaturação a 95°C por 3 min e choque térmico em gelo por 15 min. A corrida foi executada em sequenciador automático *3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, EUA).

As sequências senso e antissenso foram sobrepostas, avaliadas e editadas utilizando o programa Geneious v 9.1.6 (Biomatters, Ltd.). A sobreposição de picos no eletroferograma foi considerada como mistura de nucleotídeos em uma mesma posição quando a diferença entre os picos foi $\leq 25\%$ e a mistura esteve presente em duas leituras da amostra sequenciada. As regiões com ruído e/ou qualidade comprometida foram removidas da análise.

Os subtipos das sequências obtidas foram determinados através de métodos automáticos que compõem ferramentas de bioinformática disponíveis na *internet*: *REGA HIV Subtyping Tool v.3* (<http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>), *RIP – Recombinant Identification Program v. 3.0*¹¹⁷ e *COMET – COntext-based Modeling for Expeditious Typing*¹¹⁸. A subtipagem foi confirmada através de análise filogenética empregando o método de Máxima Verossimilhança com *bootstrap* de 1000 réplicas, utilizando o programa MEGA 7¹¹⁹. Também foram avaliados perfis de recombinação utilizando *SimPlot v.3.5.1*¹²⁰.

4.4.8 Quantificação dos Peptídeos β -Amilóide1-40 e 1-42

O INNOTEST β -amilóide é um imunoenensaio enzimático de fase sólida para a determinação quantitativa de β -amilóide humana em fluido cefalorraquidiano. Este ensaio detecta o peptídeo amilóide chamado A β , resultante da via β -secretase de maturação da APP (proteína precursora de amilóide). Este peptídeo, hidrofóbico e neurotóxico, é um dos principais componentes dos depósitos amilóides, sabidamente presentes em demências.

No ensaio 1-40 (que faz a detecção do primeiro aminoácido da extremidade N-terminal até posição 40) o peptídeo amilóide é capturado por um primeiro anticorpo monoclonal, 2G3 (IgG1). As amostras de líquido são então adicionadas e incubadas com

um anticorpo biotilado, 3D6 (IgG2b). O complexo antígeno-anticorpo é então detectado por uma estreptavidina marcada com peroxidase. Após a adição do substrato, as amostras desenvolvem uma cor de intensidade proporcional à quantidade do peptídeo β -amilóide (1-40) na amostra.

No ensaio 1-42 (que faz a detecção do primeiro aminoácido da extremidade N-terminal até posição 42) o procedimento é o mesmo, com exceção do anticorpo monoclonal que para esse teste é o 21F12 (IgG2a). O ensaio foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

4.4.9 Quantificação da Proteína Tau Total

O INNOTEST® hTAU é um imunoenensaio enzimático em fase sólida para a determinação quantitativa de proteína Tau no líquido. Este ensaio mede o marcador biológico Tau total, incluindo seis isoformas (352 a 441 aminoácidos) do líquido.

Nesse ensaio a proteína Tau humana ou fragmentos são capturados pelo primeiro anticorpo monoclonal, AT120. As amostras de líquido são adicionadas e incubadas com dois anticorpos marcados com biotina, HT7bio e BT2bio. Este complexo antígeno-anticorpo é detectado por uma estreptavidina marcada com peroxidase. Após a adição do substrato, as amostras vão desenvolver uma cor de intensidade proporcional à quantidade da proteína Tau na amostra. O ensaio foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

4.4.10 Quantificação da Proteína Tau Fosforilada

O INNOTEST® PHOSPHO-TAU(181P) é um imunoenensaio enzimático em fase sólida para a determinação quantitativa de tau fosforilada (PHOSPHO-TAU(181P)) em líquido.

Nesse ensaio a proteína Tau fosforilada ou fragmentos são capturados por um primeiro anticorpo monoclonal específico humano HT7. Amostras humanas de líquido são adicionadas e incubadas com AT270 monoclonal biotilado. Este complexo antígeno-anticorpo é detectado por uma estreptavidina marcada com peroxidase. Após a adição do substrato, as amostras vão desenvolver uma cor de intensidade proporcional à quantidade da proteína Tau fosforilada na amostra. O ensaio foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

4.4.11 Quantificação de CD14 Solúvel no Líquor

Foi utilizado o Human sCD14 Quantikine ELISA Kit para a quantificação da fração solúvel da proteína CD14, porém, por ser validado apenas para cultura celular, soro e plasma, foi feito um ensaio de padronização para líquido utilizando um protocolo cedido pelo fabricante. Dois testes foram realizados para determinar se o valor obtido a partir de uma amostra é preciso ou se há algum fator da amostra que interfere na medição.

O primeiro deles é o ensaio “Spike/Recovery” no qual uma quantidade conhecida de proteína recombinante é inserida em uma amostra antes da execução do ELISA. A concentração resultante demonstra se o valor esperado pode ser medido com precisão. Se o valor recuperado difere significativamente do valor esperado (entre 80% e 120%), este pode ser um sinal de que algum fator na matriz da amostra pode estar causando um valor superestimado ou subestimado.

No segundo ensaio, de linearidade, a amostra “enriquecida e a amostra pura são diluídas serialmente (1:2, 1:4, e 1:8). Se as amostras não apresentarem diluição linear, isto pode ser um indício de que um componente da matriz está interferindo na detecção precisa de um analito particular, em determinada diluição. Por vezes a interferência da matriz só ocorrerá se um fator estiver presente em concentrações acima de um determinado limiar, portanto se a amostra for diluída a interferência deixa de ser observada.

Foi utilizada uma solução padrão com 16000pg/ml para “batizar” tanto a amostra de líquido a ser testada como a solução diluente que foi utilizada como controle da reação. Após a adição da solução padrão, a amostra “batizada”, a amostra pura e o controle “batizado” foram diluídos 1:2, 1:4, e 1:8. O ensaio foi executado conforme instruções do fabricante e os valores de absorvância obtidos (média das duplicatas), bem como as concentrações das soluções padrão, foram utilizados na construção da curva logística de quatro parâmetros representada na Figura 1.

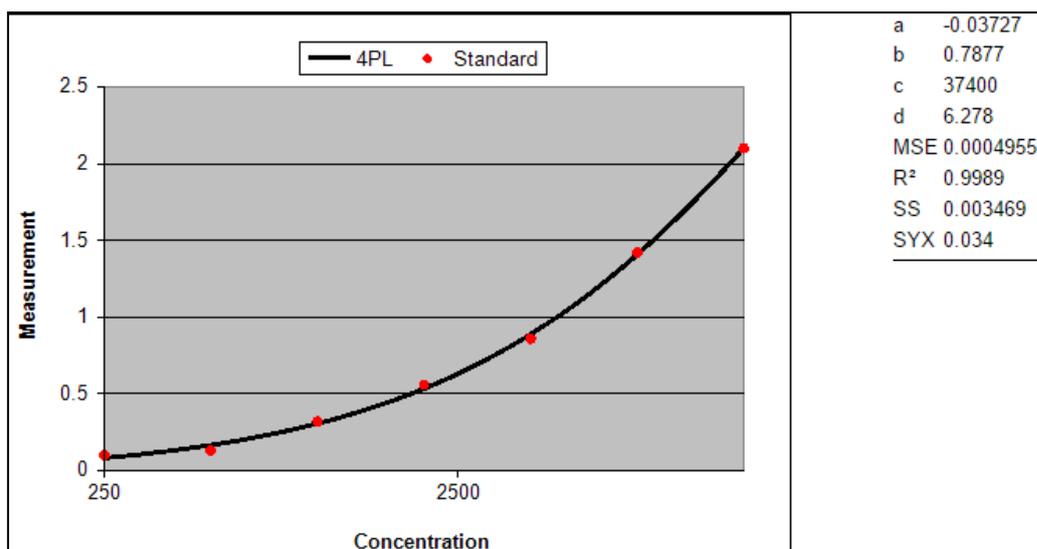


Figura 1. Curva de padronização do ensaio HumansCD14Quantikine ELISA para líquido.

A análise do ensaio “Spike/Recovery”, feita através da fórmula abaixo, mostrou uma percentagem de recuperação dentro do esperado (80-120%).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Observado} - \text{Pura} \times 100}{\text{Esperado}}$$

Observado = valor da amostra “batizada”

Pura = valor da amostra não “batizada”

Esperado = Quantidade adicionada à amostra (calculada com base na concentração da solução padrão e o volume adicionado na amostra).

A análise do ensaio de linearidade, feita através da fórmula abaixo, mostrou uma recuperação linear, com percentagem de recuperação dentro do esperado (80-120%).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Observado} \times 100}{\text{Esperado} / \text{fator de diluição}}$$

A quantificação da amostra batizada, sem diluição, ultrapassou o limite de detecção da curva. Como a amostra pura, mesmo na diluição 1:8 não se aproximou do limite inferior da curva, foi determinado que todas as amostras seriam diluídas 1:10 para evitar

perda de sensibilidade. Após a padronização, o ensaio foi feito de acordo com o protocolo do fabricante.

4.4.12 Quantificação de Citocinas, Quimiocinas e ApoE

Selecionamos um painel de citocinas pró inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α , CXCL-10, IFN- γ), quimiocinas (MCP-1 e MIP-1 α) e uma apolipoproteína (ApoE).

Para esse ensaio, utilizamos a tecnologia Luminex™ xMAP que dosa múltiplos analitos simultaneamente em um único poço de reação em microplacas. A tecnologia Luminex™ xMAP envolve um processo que cora microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex.

Nós adquirimos os dois Milliplex Human Cytokine® kits (EMD Millipore Corp.St. Charles, Missouri, U.S.A) descritos abaixo:

- HCYTOMAG-60K-07 (MCP-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL-10, IFN- γ , MIP-1 α)
- APOMAG-62K-01 (Apo E)

Ambos kits contam com anticorpos de captura específicos para cada analito, imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, Estreptavidina-Ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex movimentava estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera e o segundo laser quantifica o sinal em cada microesfera.

O ensaio foi feito seguindo o manual do fabricante e os resultados foram analisados no software Luminex 200 IS 2.3.

4.4.13 Genotipagem da ApoE

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada utilizando-se ensaios validados TaqMan® SNP Genotyping Assay (ThermoFischer) para o gene ApoE (rs429358; assay ID: C___3084793_20 e rs7412; assay ID: C___904973_10). Cada ensaio inclui dois primers (*forward* e *reverse*) para a amplificação das regiões de interesse e duas sondas para detecção dos alelos. As sondas possuem: um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' (VIC para um alelo e FAM para o outro alelo); um *minor groove binder* (MGB) que aumenta a temperatura de anelamento da sonda sem aumentar o seu comprimento, permitindo a discriminação mais precisa dos alelos; um *quencher* não fluorescente (NFQ) na terminação 3'da sonda.

As reações de amplificação e genotipagem do DNA foram realizadas em placas de 96 poços, em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA, USA). O protocolo foi otimizado utilizando 0.5µl TaqMan SNP Genotyping Assay (20X), 5µl Master Mix (2X) e 4.5µ de DNA, totalizando um volume de 10µl. As reações seguiram o ciclo de amplificação: 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Durante a PCR cada sonda anela especificamente à sequência complementar, entre os sítios dos primers *forward* e *reverse*. Quando a sonda está intacta, a proximidade do corante *reporter* com o NFQ resulta em supressão da fluorescência. A clivagem da sonda pela DNA polimerase Amplitaq Gold® separa o corante *reporter* do NFQ, o que resulta em fluorescência, sendo que a Amplitaq Gold cliva somente as sondas que estão hibridizadas. O sinal de fluorescência ocorre somente se a sequência alvo for complementar à sonda. Então o sinal gerado pela PCR indica que o alelo está presente na amostra.

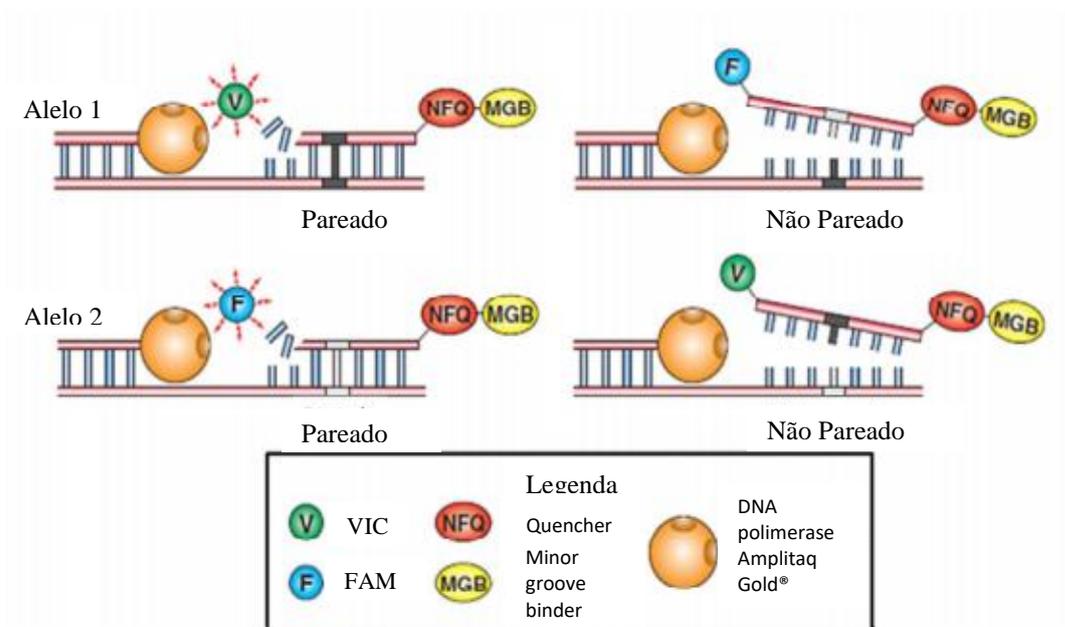


Figura 2: Esquema da reação com o ensaio Taqman

A discriminação e plotagem dos resultados traduzidos em genótipos foram realizadas pelo TaqMan® Genotyper Software (Thermo)

4.4.14 Quantificação de Neurofilamentos

Foi utilizado o *Human NEFL ELISA Kit* (Elabscience, USA), que se baseia no método sanduíche. Nesse método, o anticorpo específico para o neurofilamento, chamado anticorpo de captura, é previamente adsorvido no poço. Depois, a amostra de líquido, que possui o antígeno, é adicionada e se liga à esse anticorpo. Logo após, é adicionado outro anticorpo específico para o antígeno. Finalmente, um terceiro anticorpo ligado à enzima é adicionado. Essa enzima irá reagir com o substrato, gerando cor. A intensidade da reação é proporcional à quantidade de NFL presente. O ensaio foi executado de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.15 Quantificação de Neopterin

Foi utilizado o *Human Neopterin ELISA Kit* (Elabscience, USA), que se baseia no método de competição. Diferente do método descrito no item anterior, nessa metodologia a presença de neopterin no líquido é revelada pela competição com um anticorpo

específico, dirigido contra o antígeno. Igualmente, o resultado é dado pela adição de um conjugado, porém a coloração aparece nos orifícios onde não havia anticorpos. O ensaio foi executado de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6 Escore de Efetividade de Penetração

O escore da efetividade de penetração dos antirretrovirais no sistema nervoso central (CPE, CNS *penetration effectiveness*) foi utilizado para avaliar o impacto do tratamento no controle da carga viral líquórica. O modelo apresentado no Quadro 1, proposto por Letendre e colaboradores ⁵³, mostra escores baseados nas propriedades químicas dos medicamentos que influenciam a penetração pela barreira hematoencefálica.

Quadro 1. Escore da efetividade de penetração dos antirretrovirais no sistema nervoso central

	4 (Melhor penetração)	3	2	1 (Pior penetração)
ITRN	Zidovudina	Abacavir	Didanosina Lamivudina	Tenofovir
ITRNN	Nevirapina	Efavirenz	Etravirina	
IP		Darunavir Fosamprenavir Indinavir Lopinavir	Atazanavir Atazanavir Tipranavir	Nelfinavir Ritonavir Saquinavir Saquinavir Tipranavir
Inibidores da fusão/entrada		Maraviroque		Enfuvirtida
Inibidores da integrase		Raltegravir		

4.7 Análise Estatística

Foram descritas as características quantitativas segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana e quartis) e comparados os grupos com uso de modelos lineares ¹²¹, seguidos de comparações múltiplas de Bonferroni ¹²¹ para especificar entre quais grupos ocorreram as diferenças. As características qualitativas foram descritas segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e verificada a associação com uso de testes da razão de verossimilhanças ¹²².

Os marcadores foram descritos segundo grupos com uso de medidas resumo e comparados entre os grupos com uso de modelos lineares ajustados pela idade, seguidos de comparações múltiplas de Bonferroni.

Foram criadas funções para discriminação dos grupos com uso de análises discriminantes usando a idade e os marcadores inflamatórios, a idade e os marcadores neurodegenerativos e a idade e todos os marcadores com uso de método de seleção Stepwise com critério de menor valor de Wilks' Lambda e criadas as funções pelo método de Fisher que discriminam os grupos ¹²³.

Para realização das análises foi utilizado o software IBM-SPSS para Windows versão 20.0 e para tabulação dos dados foi utilizado o software Microsoft Excel 2003. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 População de Estudo

A população desse estudo foi composta por oitenta e quatro indivíduos, distribuídos em cinco grupos: trinta e três indivíduos portadores de HIV com alteração neurocognitiva assintomática (ANI), quinze indivíduos portadores de HIV com alteração neurocognitiva leve-moderada (MND), quinze indivíduos portadores de HIV com demência (HAD), quatorze indivíduos portadores de HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (C HIV+) e sete indivíduos não portadores de HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (C HIV-). Os dados clínicos, sociodemográficos e laboratoriais estão apresentados na Tabela 3.

RESULTADOS

Tabela 3. Descrição das características pessoais e da doença segundo grupos e resultado dos testes estatísticos.

Variável	Grupo					Total (N = 84)	p
	C HIV- (N = 7)	C HIV+ (N = 14)	ANI (N = 33)	MND (N = 15)	HAD (N = 15)		
Idade (anos)							<0,001
média ± DP	28 ± 6,9	41,2 ± 13	47,4 ± 9,1	50,7 ± 7,6	55 ± 11,3	46,7 ± 12	
mediana (P25; P75)	28 (20; 34)	41 (32; 52,3)	50 (43,5; 54)	53 (48; 56)	55 (53; 60)	51 (39; 54,8)	
Sexo, n (%)							0,096*
Feminino	4 (57,1)	2 (14,3)	10 (30,3)	3 (18,8)	8 (50)	27 (31,4)	
Masculino	3 (42,9)	12 (85,7)	23 (69,7)	13 (81,2)	8 (50)	59 (68,6)	
Uso de Efavirenz, n (%)							0,385*
Não		10 (71,4)	19 (57,6)	11 (68,8)	13 (81,2)	53 (67,1)	
Sim		4 (28,6)	14 (42,4)	5 (31,2)	3 (18,8)	26 (32,9)	
CV_Líquor (cópias), n (%)							0,302*
Indetectável		13 (92,9)	29 (87,9)	16 (100)	14 (87,5)	72 (91,1)	
Detectável		1 (7,1)	4 (12,1)	0 (0)	2 (12,5)	7 (8,9)	
CV (cópias/mL), n (%)							0,148*
Indetectável		11 (78,6)	31 (93,9)	16 (100)	15 (93,8)	73 (92,4)	
Detectável		3 (21,4)	2 (6,1)	0 (0)	1 (6,2)	6 (7,6)	
NADIR de CD4+							0,222
média ± DP		632,2 ± 214	629,2 ± 319,1	782,1 ± 479,2	478,9 ± 186,7	645 ± 332,8	
mediana (P25; P75)		565 (480; 860)	553 (419,5; 713,5)	600 (500; 1311)	488 (383; 694)	553 (438,8; 755)	
CD4 (CEL/MM3)							0,286
média ± DP		674,5 ± 263,5	597,9 ± 332,4	395,8 ± 262,5	508,7 ± 171,6	570,5 ± 287,6	
mediana (P25; P75)		613 (452,3; 967,3)	546 (374; 631)	503 (125; 613)	450,5 (376,5; 652,3)	541,5 (382; 653,5)	
CD8 (CEL/MM3)							0,650
média ± DP		1037,5 ± 373,9	968,9 ± 556,4	732,8 ± 160,6	941,2 ± 411,3	945,4 ± 446	
mediana (P25; P75)		956,5 (774; 1381,5)	819 (716; 1099)	780 (590,5; 851,5)	907 (540,3; 1393,5)	840 (716,8; 1117,5)	

Nem todos os pacientes tiveram todos os exames avaliados; Modelos lineares generalizados com distribuição normal e função de ligação identidade; * Teste da razão de verossimilhanças

A Tabela 3 mostra que apenas a idade diferiu estatisticamente em média entre os grupos avaliados ($p < 0,001$). Os indivíduos do grupo C HIV- apresentaram em média menor idade que os pacientes HIV POSITIVOS ($p < 0,05$) e o grupo de pacientes HAD foi em média estatisticamente mais velho que o grupo C HIV+ ($p = 0,001$), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Resultado das comparações múltiplas da idade entre os grupos.

Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
C HIV- vs C HIV+	-13,21	4,44	1	0,029	-25,67	-0,76
C HIV- vs ANI	-19,39	3,99	1	<0,001	-30,59	-8,20
C HIV- vs MND	-22,67	4,39	1	<0,001	-34,98	-10,35
C HIV- vs HAD	-27,00	4,39	1	<0,001	-39,32	-14,68
C HIV+ vs ANI	-6,18	3,06	1	0,432	-14,76	2,40
C HIV+ vs MND	-9,45	3,56	1	0,080	-19,45	0,55
C HIV+ vs HAD	-13,79	3,56	1	0,001	-23,78	-3,79
ANI vs MND	-3,27	2,99	1	>0,999	-11,65	5,11
ANI vs HAD	-7,61	2,99	1	0,108	-15,98	0,77
MND vs HAD	-4,33	3,50	1	>0,999	-14,16	5,49

Comparações múltiplas de Bonferroni

Tendo isso em vista, todas as análises apresentadas a seguir foram corrigidas por idade para que esse parâmetro não enviesasse os resultados.

5.2 Carga Viral do HIV

Dos sessenta e três indivíduos com HAND, seis (9,5%) apresentaram carga viral detectável no líquido, sendo quatro assintomáticos e dois demenciados. Seis indivíduos (9,5%) apresentaram carga plasmática detectável, sendo três controles, dois assintomáticos e um demenciado. Apenas um indivíduo (assintomático) apresentou carga viral e líquórica detectável. É importante ressaltar que ambos os ensaios garantem sensibilidade de 100% somente acima de 40 cópias, portanto é possível que o número de pacientes com carga inferior a esse limite esteja subestimado.

Em relação ao escore de efetividade de penetração, dos setenta e sete indivíduos avaliados, vinte e dois (28,6%) utilizam esquemas com $CPE \geq 8$, quarenta e sete (61%) utilizam esquemas com $CPE < 8$ e oito (10,4%) não possuíam registro do esquema utilizado no momento da avaliação. Dos seis indivíduos com HAND que apresentaram carga detectável no líquido, dois não possuíam registro do esquema antirretroviral utilizado e três utilizavam esquema com alta penetração.

5.3 Genotipagem do HIV

Dos setenta e sete indivíduos HIV POSITIVOS do estudo, foi possível realizar a genotipagem de cinquenta e quatro. Quarenta e seis indivíduos (86%) apresentaram subtipo B, três (5%) apresentaram subtipo BF, três (5%) apresentaram subtipo F1, um (2%) apresentou subtipo BC e um (2%) apresentou subtipo BD. A distribuição dos genótipos na população estudada está representada na Figura 3.

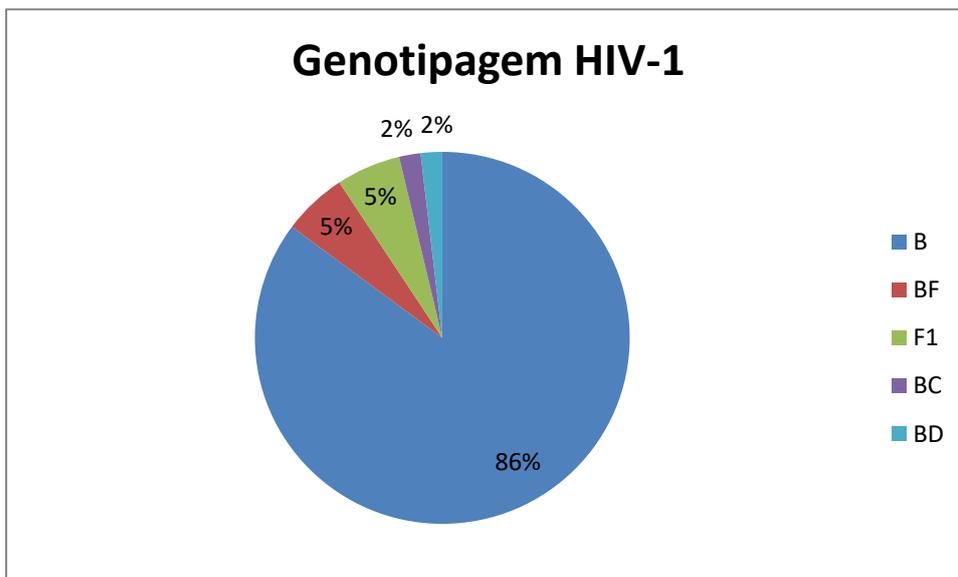


Figura 3 - Distribuição dos genótipos de HIV-1 na população estudada .

O subtipo B, como esperado, foi o mais prevalente. De forma geral a distribuição dos genótipos foi homogênea entre os grupos, como é possível observar na Figura 4.

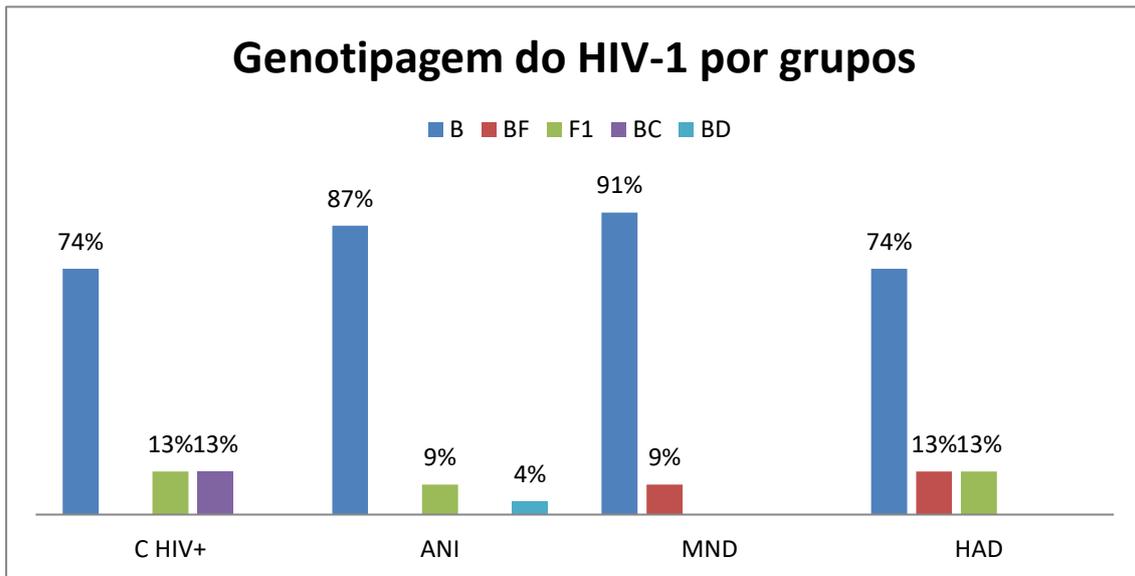


Figura 4 - Distribuição dos genótipos de HIV-1 nos grupos estudados .

5.4 Exame Quimiocitológico

Apenas quatro indivíduos (4,7%) apresentaram um discreto aumento no número de proteínas líquóricas, dois assintomáticos e dois demenciados.

5.5 Marcadores de Neurodegeneração

A análise dos marcadores de neurodegeneração está representada na Tabela 5.

RESULTADOS

Tabela 5. Descrição dos marcadores de neurodegeneração segundo grupos e resultado dos testes comparativos.

Variável	Grupo					Total (N = 84)	p*
	C HIV- (N = 7)	C HIV+ (N = 14)	ANI (N = 33)	MND (N = 15)	HAD (N = 15)		
p-tau (pg/μL)							0,897
média ± DP	36,1 ± 25	43,1 ± 23,5	46,5 ± 29,9	42,2 ± 18,2	56,8 ± 55,6	46,2 ± 33,3	
mediana (P25; P75)	28,7 (26,3; 36,8)	41 (25,4; 47,4)	36,6 (29,1; 54,8)	39,8 (28,9; 50,1)	38,4 (30; 55,9)	36,8 (28,4; 50,7)	
tau (pg/μL)							0,352
média ± DP	232,6 ± 117	204,9 ± 132,3	275,8 ± 173,2	447,6 ± 588,4	435,7 ± 351,7	322,1 ± 325,2	
mediana (P25; P75)	281,3 (151,8; 320,8)	224,3 (81,8; 293,1)	245,9 (155,3; 332,2)	216,8 (96,2; 514,6)	355,4 (236,6; 479,7)	254,5 (154,9; 376,7)	
B-1-40 (pg/μL)							0,457
média ± DP	12368,4 ± 4366,2	21989,5 ± 22064,3	24588,6 ± 23026,2	18384,3 ± 8227,9	22470,3 ± 12730,5	21587,5 ± 18056,8	
mediana (P25; P75)	12980 (8936; 15470)	19400 (5855,3; 29490)	20685 (10622,5; 29985)	17775 (12130; 23407,5)	21730 (14905; 31677,5)	17750 (11030; 26490)	
B-1-42 (pg/μL)							0,682
média ± DP	1142,8 ± 366,2	1365,2 ± 837,7	1092,5 ± 751,7	1232,4 ± 326,6	1316,6 ± 692,7	1211,2 ± 667,7	
mediana (P25; P75)	1214 (833; 1512)	1135,5 (862,1; 1405,5)	867,9 (612,7; 1272)	1235 (959,5; 1390)	1243,5 (745,1; 1633,8)	1131 (786,6; 1390)	
Neurofilamento (pg/ml)							0,438
média ± DP	2717,7 ± 2091	1992,2 ± 1216,9	3096,8 ± 3741,9	2232,2 ± 1051,4	2591,5 ± 4739,9	2622 ± 3178	
mediana (P25; P75)	1703 (1047; 4014)	1256 (1084,5; 2895)	2043,5 (1318,3; 3316,3)	2016 (1296,3; 2908,3)	1145 (1041,3; 1896,5)	1638,5 (1132,8; 2983,8)	

Nem todos os pacientes tiveram todos os exames avaliados; Modelos lineares generalizados com distribuição normal e função de ligação identidade; * Valores ajustados pela idade

A Tabela 5 mostra que os marcadores de neurodegeneração foram estatisticamente iguais entre os grupos.

5.6 Marcadores de Ativação Celular

A análise dos marcadores de ativação celular, que compreendem CD14 solúvel, citocinas e quimiocinas, está representada na Tabela 6.

RESULTADOS

Tabela 6. Descrição dos marcadores de ativação celular segundo grupos e resultado dos testes comparativos.

Variável	Grupo					Total (N = 84)	p*
	C HIV- (N = 7)	C HIV+ (N = 14)	ANI (N = 33)	MND (N = 15)	HAD (N = 15)		
IFN gamma (pg/mL)							0,002
média ± DP	0,37 ± 0,12	0,32 ± 0,14	0,18 ± 0,22	0,11 ± 0,18	0,07 ± 0,14	0,18 ± 0,2	
mediana (P25; P75)	0,35 (0,31; 0,47)	0,35 (0,27; 0,44)	0,06 (0,03; 0,44)	0,03 (0,02; 0,1)	0,04 (0,01; 0,05)	0,06 (0,03; 0,35)	
IL1 beta (pg/mL)							<0,001
média ± DP	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,08	0,44 ± 0,11	0,48 ± 0,14	0,52 ± 0,17	0,45 ± 0,13	
mediana (P25; P75)	0,36 (0,33; 0,37)	0,36 (0,31; 0,45)	0,41 (0,36; 0,49)	0,46 (0,41; 0,53)	0,47 (0,41; 0,64)	0,41 (0,36; 0,49)	
IL 6 (pg/mL)							0,055
média ± DP	0,82 ± 0,54	0,97 ± 0,57	1,71 ± 1,95	1,18 ± 0,6	2,37 ± 1,85	1,56 ± 1,58	
mediana (P25; P75)	0,79 (0,34; 1,15)	0,78 (0,74; 0,9)	1,13 (0,66; 1,69)	1,06 (0,7; 1,53)	1,38 (1,03; 4,09)	1,03 (0,73; 1,62)	
IP 10 (pg/mL)							0,805
média ± DP	459,8 ± 214,6	2845,4 ± 4388,2	3087,1 ± 3463,6	3561,4 ± 4134,3	5147,7 ± 4335	3329,2 ± 3884,1	
mediana (P25; P75)	474,5 (306,8; 645,8)	989 (506,5; 2951,5)	2405 (851; 4161)	1586 (1071; 4734,3)	4284 (1517; 8832)	1636 (819; 4191,8)	
MCP1 (pg/mL)							0,097
média ± DP	998,2 ± 444,9	1769,9 ± 1056,9	3634,7 ± 4527,4	2428,9 ± 2485,9	5793,6 ± 5302,7	3343,8 ± 4060,1	
mediana (P25; P75)	996 (663; 1433,8)	1288 (1129; 2248,5)	1902 (1256; 3106)	1809,5 (1172,3; 2546,5)	3491 (2051; 10788)	1855 (1143; 3106)	
MIP 1 alpha (pg/mL)							0,378
média ± DP	0,47 ± 0,1	0,58 ± 0,23	0,74 ± 0,9	0,76 ± 0,82	1,41 ± 2,04	0,83 ± 1,13	
mediana (P25; P75)	0,49 (0,39; 0,55)	0,54 (0,42; 0,66)	0,5 (0,34; 0,68)	0,55 (0,3; 0,77)	0,75 (0,41; 0,98)	0,53 (0,38; 0,77)	
TNF alpha (pg/mL)							0,293
média ± DP	1,8 ± 0,45	1,78 ± 0,8	2,46 ± 1,31	2,31 ± 1,61	2,77 ± 2,91	2,34 ± 1,69	
mediana (P25; P75)	1,75 (1,38; 2,16)	1,58 (1,22; 1,92)	2,25 (1,66; 3,01)	1,99 (1,08; 3,3)	2,33 (1,02; 2,84)	2,02 (1,36; 2,72)	
sCD14 (pg/μL)							0,009
média ± DP	56090 ± 12575	89618,2 ± 23940	119475,9 ± 41910,5	140602,5 ± 63052,5	159288,8 ± 54368	121054,4 ± 53574	
mediana (P25; P75)	56340 (46110; 64340)	85600 (76910; 99630)	118200 (85305; 149350)	114150 (93495; 193750)	159200 (110475; 203750)	109100 (83560; 151100)	
Neopterin (pg/ml)							0,100
média ± DP	80,3 ± 51	67,8 ± 37,8	98,5 ± 51,5	66,4 ± 37,2	77,1 ± 48,5	82,1 ± 47,4	
mediana (P25; P75)	62,9 (38,2; 138,3)	45,5 (36,7; 101,4)	82,6 (59,7; 142,4)	56,7 (36,1; 87)	62,2 (47,5; 83,7)	68 (44,4; 100,4)	

Nem todos os pacientes tiveram todos os exames avaliados; Modelos lineares generalizados com distribuição normal e função de ligação identidade; * Valores ajustados pela idade

A Tabela 6 mostra que IFN gamma, IL1 beta e sCD14 apresentaram diferença estatística entre os grupos. A representação gráfica desses marcadores pode ser vista na Figura 5.

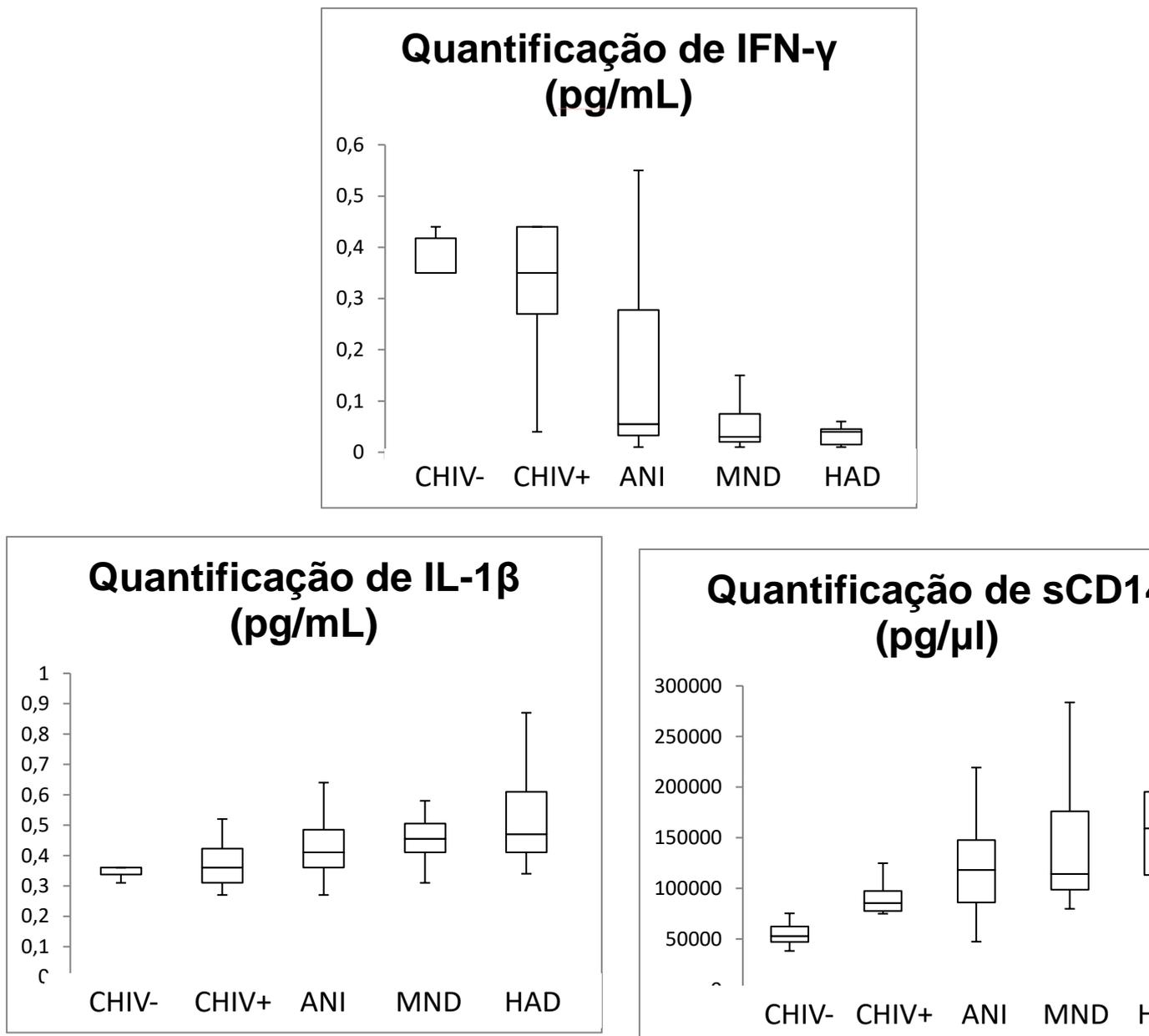


Figura 5. Boxplots da quantificação de IFN-γ, IL-1β e sCD14 nos grupos estudados.

A tabela 7 mostra o resultado das comparações múltiplas de IFN-γ, IL-1β e sCD14, dentro dos grupos estudados.

Tabela 7. Resultado das comparações múltiplas dos marcadores de ativação celular que foram estatisticamente diferentes entre os grupos.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
IFN gamma (pg/mL)	C HIV- vs C HIV+	0,07	0,09	1	>0,999	-0,19	0,34
	C HIV- vs ANI	0,22	0,09	1	0,147	-0,03	0,47
	C HIV- vs MND	0,29	0,10	1	0,031	0,01	0,57
	C HIV- vs HAD	0,33	0,10	1	0,014	0,04	0,62
	C HIV+ vs ANI	0,14	0,06	1	0,186	-0,03	0,32
	C HIV+ vs MND	0,22	0,07	1	0,024	0,02	0,42
	C HIV+ vs HAD	0,26	0,07	1	0,006	0,05	0,47
	ANI vs MND	0,07	0,06	1	>0,999	-0,09	0,23
	ANI vs HAD	0,11	0,06	1	0,557	-0,05	0,28
	MND vs HAD	0,04	0,07	1	>0,999	-0,15	0,23
IL1 beta (pg/mL)	C HIV- vs C HIV+	-0,06	0,06	1	>0,999	-0,23	0,11
	C HIV- vs ANI	-0,14	0,06	1	0,159	-0,30	0,02
	C HIV- vs MND	-0,18	0,06	1	0,045	-0,36	0,00
	C HIV- vs HAD	-0,24	0,07	1	0,002	-0,43	-0,06
	C HIV+ vs ANI	-0,08	0,04	1	0,463	-0,19	0,03
	C HIV+ vs MND	-0,12	0,05	1	0,092	-0,25	0,01
	C HIV+ vs HAD	-0,18	0,05	1	0,001	-0,32	-0,05
	ANI vs MND	-0,04	0,04	1	>0,999	-0,14	0,06
	ANI vs HAD	-0,11	0,04	1	0,045	-0,21	0,00
	MND vs HAD	-0,07	0,04	1	>0,999	-0,19	0,06
sCD14 (pg/μL)	C HIV- vs C HIV+	-20275,96	21658,87	1	>0,999	-81073,15	40521,22
	C HIV- vs ANI	-44900,57	20488,27	1	0,284	-102411,84	12610,71
	C HIV- vs MND	-63665,19	23130,62	1	0,059	-128593,61	1263,22
	C HIV- vs HAD	-72531,71	23871,29	1	0,024	-139539,23	-5524,18
	C HIV+ vs ANI	-24624,60	15203,59	1	>0,999	-67301,60	18052,40
	C HIV+ vs MND	-43389,23	18089,17	1	0,165	-94166,13	7387,68
	C HIV+ vs HAD	-52255,74	18030,69	1	0,038	-102868,49	-1643,00
	ANI vs MND	-18764,63	14526,11	1	>0,999	-59539,91	22010,65
	ANI vs HAD	-27631,14	13939,66	1	0,475	-66760,25	11497,96
	MND vs HAD	-8866,51	16516,81	1	>0,999	-55229,75	37496,72

Comparações múltiplas de Bonferroni

Essa análise comparativa mostra que o IFN- γ foi menor nos grupos MND e HAD do que nos grupos CHIV- e CHIV+ ($p < 0,05$). O IL1 beta foi estatisticamente maior no grupo MND e HAD que no grupo CHIV- ($p = 0,045$ e $p = 0,002$ respectivamente) e o grupo HAD foi em média estatisticamente maior que os grupos CHIV+ e ANI ($p = 0,001$ e $p = 0,045$ respectivamente). E, por fim, o sCD14 apresentou em média estatisticamente maior valor no grupo HAD que nos grupos CHIV- e CHIV+ ($p = 0,024$ e $p = 0,038$ respectivamente).

RESULTADOS

5.7 ApoE

5.7.1 Quantificação da ApoE

Os resultados das análises da quantificação de ApoE nos grupos está representada na Tabela 8.

Tabela 8. Descrição da ApoE segundo grupos e resultado dos testes comparativos.

Variável	Grupo					Total (N = 84)	p*
	C HIV- (N = 7)	C HIV+ (N = 14)	ANI (N = 33)	MND (N = 15)	HAD (N = 15)		
APOE (ng/mL)							0,002
média ± DP	46,8 ± 17,8	102,1 ± 41,5	65,3 ± 35	65,2 ± 23,1	69,3 ± 28,2	70,3 ± 34,6	
mediana (P25; P75)	44,6 (38; 54,3)	92,1 (74,7; 130,5)	59,2 (42,7; 76,1)	56 (48,7; 89)	63,8 (50,9; 90,7)	61,4 (46; 89)	

A Tabela 8 mostra que ApoE apresenta diferença estatística entre os grupos, quando ajustados pela idade dos indivíduos ($p < 0,05$). A representação gráfica desse marcador pode ser vista na Figura 6.

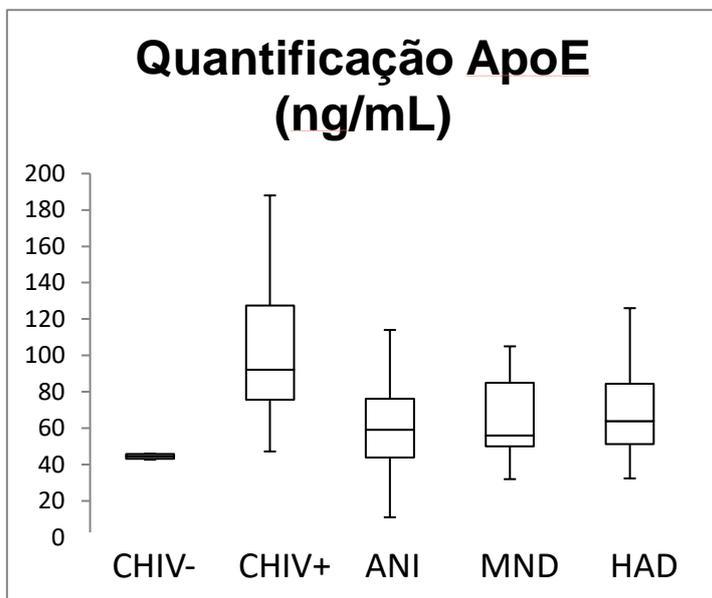


Figura 6. Boxplot da quantificação da ApoE nos grupos estudados.

A tabela 9 mostra o resultado das comparações múltiplas da ApoE dentro dos grupos estudados.

Tabela 9. Resultado das comparações múltiplas da ApoE entre os grupos.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
APOE (ng/mL)	C HIV- vs C HIV+	-56,18	16,51	1	0,007	-102,52	-9,85
	C HIV- vs ANI	-19,69	15,85	1	>0,999	-64,17	24,79
	C HIV- vs MND	-19,82	17,48	1	>0,999	-68,90	29,26
	C HIV- vs HAD	-22,63	18,39	1	>0,999	-74,27	29,00
	C HIV+ vs ANI	36,49	10,83	1	0,008	6,09	66,88
	C HIV+ vs MND	36,36	12,68	1	0,041	0,76	71,96
	C HIV+ vs HAD	33,55	13,22	1	0,112	-3,57	70,67
	ANI vs MND	-0,13	10,10	1	>0,999	-28,47	28,22
	ANI vs HAD	-2,94	10,41	1	>0,999	-32,17	26,29
	MND vs HAD	-2,82	11,92	1	>0,999	-36,27	30,63

Observamos que a ApoE foi útil na discriminação das formas assintomática e leve/moderada das HAND quando comparada ao controle HIV+. Olhando isoladamente, ApoE parece ser um marcador promissor, visto que é o único que já se mostra alterado nas fases iniciais da HAND. Porém, como a proposta inicial desse estudo não foi determinar um marcador isolado, mas sim um perfil, foram feitas três análises discriminantes: marcadores neurodegenerativos em conjunto; marcadores inflamatórios + ApoE em conjunto; todos os marcadores em conjunto. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultado das funções discriminantes entre os grupos para os marcadores neurodegenerativos, de ativação celular e ApoE, ajustando a idade.

Marcadores	Variável	Grupo				
		C HIV-	C HIV+	ANI	MND	HAD
Neurodegenerativos	Idade (anos)	0,285	0,420	0,478	0,516	0,560
	Constante	-5,601	-10,257	-12,809	-14,679	-17,010
Inflamatórios	Idade (anos)	0,387	0,561	0,622	0,649	0,718
	APOE (ng/ml)	0,090	0,159	0,125	0,126	0,135
	IL1 beta (pg/ml)	40,063	51,093	53,894	55,989	62,370
	Constante	-16,244	-31,754	-32,686	-35,011	-42,407

Análise discriminante com método de seleção *Stepwise* menor Wilks' Lambda; Funções de classificação de Fisher

A Tabela 10 mostra que a análise dos marcadores neurodegenerativos em conjunto não foi capaz de discriminar os grupos. Já para os demais marcadores, além da idade, a ApoE e a IL1 beta auxiliaram estatisticamente na discriminação dos grupos. As funções discriminantes, com todos os marcadores juntos, resultaram em funções exatamente iguais às funções vistas apenas com os marcadores de ativação celular + ApoE, ou seja, apenas estes foram estatisticamente capazes de discriminar os grupos, ajustado pela idade dos indivíduos.

5.7.2 Genotipagem da ApoE

Dos oitenta e quatro indivíduos do estudo, sessenta em quatro tinham amostras válidas e em volume suficiente para a realização da genotipagem de ApoE. Os três genótipos existentes foram encontrados e a distribuição dos mesmos está representada na Figura 7

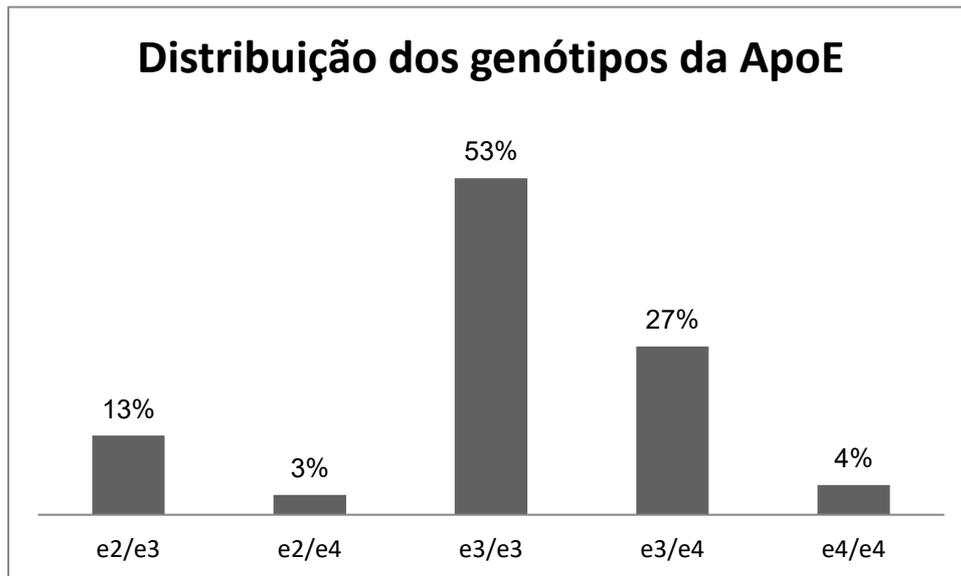


Figura 7 – Gráfico da distribuição dos genótipos na população estudada.

Vinte indivíduos (31%) apresentaram genótipo $\epsilon 4$ (heterozigotos e homozigotos). A distribuição dos genótipos nos grupos estudados está apresentada na Figura 8.

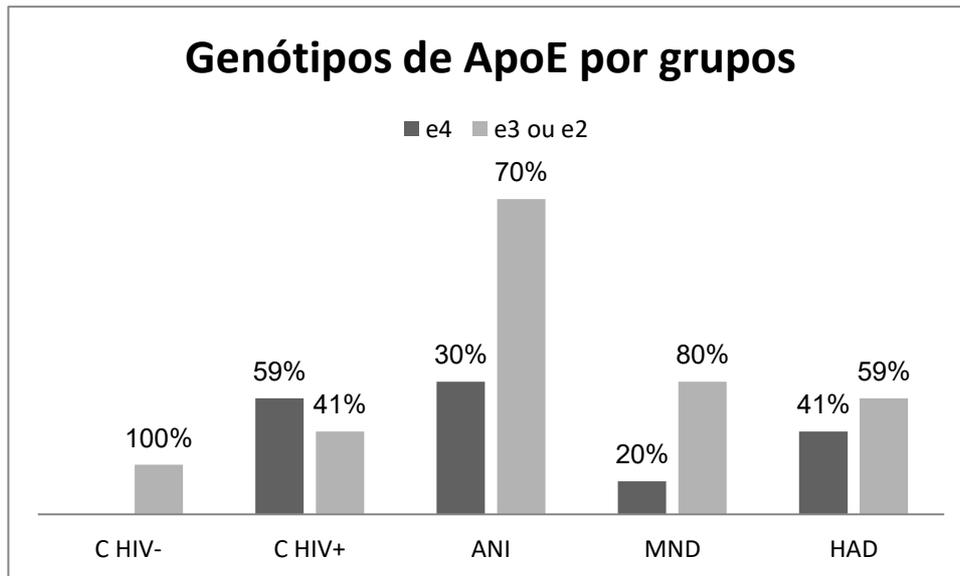


Figura 8 – Gráfico da distribuição do genótipo $\epsilon 4$ nos grupos estudados.

O genótipo $\epsilon 4$ foi encontrado em 59% dos controles HIV+, 30% dos assintomáticos, 20% dos leves a moderados e 41% dos demenciados. Não houve nenhum controle HIV- com esse genótipo. Considerando somente os indivíduos HIV POSITIVOS, a prevalência do genótipo $\epsilon 4$ é de 31% nos indivíduos com HAND e de 59% nos controles.

6. DISCUSSÃO

As complicações neurocognitivas associadas ao HIV continuam prevalentes apesar da disponibilidade do tratamento antirretroviral. Até o presente momento, a única maneira de confirmar o diagnóstico e classificar a HAND é por meio de uma avaliação neuropsicológica formal, utilizando os critérios de Frascati 2007⁴¹. Entretanto, ainda há debate sobre certos pontos, como a neuropatogênese (e heterogeneidade associada) de formas mais moderadas de HAND, sobre impacto que o início da HAART têm em reduzir a prevalência dessa comorbidade, e ainda sobre o quanto as comorbidades e o envelhecimento patológico podem influenciar esse processo.

Além disso, os dados disponíveis na literatura são inconstantes e muito variáveis. Em virtude do impacto negativo dessas questões sob o avanço da pesquisa nesse campo, especialistas da área se reuniram no encontro de neuroHIV em Washington DC em outubro de 2017 para revisar os critérios definidores de HAND e levantar os próximos passos a serem dados nos próximos anos. Um dos assuntos em pauta foi a necessidade de inclusão de biomarcadores laboratoriais que possam auxiliar no diagnóstico, bem como na avaliação dos efeitos do tratamento e compreensão da evolução dessa comorbidade, o que reforça a importância do presente trabalho.

Diante da imprecisão do reconhecimento fenotípico da doença, somado aos frequentes fatores de confusão, esse trabalho buscou identificar possíveis marcadores biológicos que pudessem auxiliar na distinção do perfil de pacientes diagnosticados com alterações neurocognitivas do perfil de indivíduos saudáveis com e sem HIV. Serão discutidos a seguir os resultados dos marcadores de ativação celular, de neurodegeneração, genéticos e virológicos.

O meio inflamatório, como colaborador potencial para o aparecimento da HAND, está bem estabelecido na literatura¹²⁴⁻¹²⁶. É cada vez mais reconhecido que a infecção latente, bem como o envelhecimento, pode levar a uma ativação e inflamação imunes crônicas^{127,128}. A Inflamação sustentada do SNC pode ser devido à infecção latente no compartimento líquórico meníngeo e possivelmente no cérebro (escape viral), ativação de microglia e macrófagos devido a produtos circulantes translocados a partir do intestino e possível toxicidade relacionada à antirretrovirais¹²⁷⁻¹³⁰.

A secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias por monócitos infectados causa uma cascata que leva a um estado de inflamação crônica e conseqüente injúria

neuronal. Dentre os marcadores de ativação celular estudados, sCD14, um receptor solúvel de lipopolissacarídeos de monócitos, e IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória responsável pela produção de células Th2, mostraram-se aumentados no grupo HAND. Estudos mostram que sCD14 apresenta níveis mais elevados na infecção pelo HIV, mesmo em indivíduos tratados, em comparação à controles HIV negativos¹³¹, e também que esse marcador correlaciona-se com a gravidade da HAND^{132,133}. Esses dados corroboram nossos achados, visto que o sCD14 apresentou-se aumentado no grupo HAND e foi estatisticamente capaz de diferenciar a forma demencial das alterações neurocognitivas mais brandas. A citocina pró-inflamatória IL-1 β também se apresentou elevada nos indivíduos com HAND, e em especial no grupo demência, onde foi estatisticamente maior que o grupo controle HIV+ e o grupo ANI

Por outro lado, os níveis de IFN- γ apresentaram-se diminuídos no grupo HAND. Uma possível explicação envolve o processo de compartimentalização viral. Monócitos e macrófagos, tanto no SNC como na periferia, são infectados no início da doença, vivem muito tempo, não morrem como consequência da infecção pelo HIV, e, portanto, podem se tornar reservatórios virais para HIV¹³⁴⁻¹³⁸. Uma provável infecção cerebral latente em macrófagos, astrócitos, e outras células gliais, foi demonstrada em múltiplos estudos neuropatológicos e *in vitro*¹³⁹⁻¹⁴⁶, porém, com exceção dos macrófagos, o vírus em tais células não demonstrou ser competente para a replicação¹⁴⁷. Sendo assim, podemos assumir que o vírus compartimentalizado tem tropismo monomacrofágico, e não pelo linfócito T, o que conseqüentemente levaria a uma diminuição da produção do IFN- γ , já que este está relacionado à resposta do linfócito T à presença de vírus. Em outras palavras, não havendo replicação ativa, refletida pela ausência de vírus no líquido (que será discutida mais adiante), não há razão para um aumento no influxo de célula T, havendo, portanto, queda na produção de IFN- γ . Essa explicação, porém, não se aplica ao grupo controle HIV+, que apresenta níveis de IFN- γ semelhantes aos do grupo controle HIV-. Essa ausência de diferença entre esses dois grupos foi observada por Griffin e colaboradores, que encontraram níveis muito parecidos desse marcador em indivíduos HIV positivos tratados quando comparados ao grupo controle HIV negativo¹⁴⁸. Contudo, o mecanismo que diferencia a atividade do IFN- γ no grupo HAND em relação aos demais grupos não foi elucidado e necessita de mais investigações.

Em relação aos marcadores de neurodegeneração, os dados encontrados na literatura são bem inconstantes. Alguns estudos observaram menores concentrações de β -

amilóide 42 no LCR de indivíduos com HAND, em níveis semelhantes aos observados na doença de Alzheimer¹⁴⁹⁻¹⁵¹, e um deles ainda observou a relação do IFN- γ em conjunto com a IL-1 β , dois marcadores discutidos anteriormente, no aumento da produção de peptídeos A β ¹⁵². Outros estudos, porém não observaram diferenças entre a produção de A β nos grupos HAND em relação aos controles^{153,154} e, por fim, também há trabalho demonstrando aumento desse marcador em indivíduos com HAND¹⁵⁵.

O mesmo cenário pode ser observado em relação à proteína Tau e sua versão fosforilada p-Tau. Há trabalhos demonstrando aumento de Tau e nenhuma diferença de p-Tau¹⁵⁶, nenhuma diferença nos níveis das duas proteínas¹⁵⁵, e ainda queda de Tau e p-Tau em grupos HAND¹⁵⁷.

A cadeia leve de neurofilamento (NFL), um marcador de lesão axonal que é preditivo de gravidade e sobrevivência em várias doenças neurocognitivas, por sua vez, tem resultados mais constantes, mostrando-se um marcador bastante estudado. Muitos trabalhos o apontam como um biomarcador em potencial¹⁵⁸⁻¹⁶¹, inclusive correlacionando os níveis de NFL no líquido com os do sangue, o que torna esse marcador ainda mais atrativo para o futuro uso na prática clínica¹⁶².

Em nosso estudo nenhum dos marcadores de neurodegeneração apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, reforçando ainda mais a idéia de que não há consenso em relação ao benefício do uso de marcadores neurodegenerativos utilizados em Alzheimer, no entendimento da HAND.

A apolipoproteína E (ApoE) está envolvida principalmente no catabolismo de triglicerídeos, mas também medeia resposta imune inata, incluindo a de macrófagos¹⁶³. O alelo $\epsilon 4$ de ApoE tem sido estudado há muito tempo na patogênese da doença de Alzheimer, e mais recentemente tornou-se de interesse na patogênese de HAND¹⁶⁴⁻¹⁷⁶. Estudos recentes usando grupo controle com indivíduos soronegativos, sugerem efeitos deletérios sinérgicos do alelo $\epsilon 4$ e do HIV na cognição^{164,165}.

Estudos mostram que a isoforma $\epsilon 4$ da ApoE é ineficaz na mediação de processos de reparação celular¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, portanto a síntese de quantidades significativas de ApoE pelos neurônios, parece fazer parte de um processo compensatório para conter a neurodegeneração do SNC¹⁸⁰⁻¹⁸².

Analisando os dados desse estudo com base nessas afirmações, podemos observar que a ApoE líquórica aumentada no grupo controle HIV+ poderia indicar um aumento na regulação que favorece a reparação neuronal. Seguindo essa lógica, os grupos que apresentam declínio cognitivo têm uma menor produção dessa apolipoproteína, o que

favorece o aparecimento de sintomas. Em outras palavras, os indivíduos que tem capacidade de aumentar a produção de ApoE conseguem contrabalancear o dano com o reparo neuronal, atrasando assim o aparecimento dos sintomas.

A análise das diferentes isoformas mostra que o grupo que mais tem ApoE é o mesmo grupo que tem uma maior porcentagem de $\epsilon 4$. Por ser uma ApoE “defeituosa”, a produção aumentada pode indicar uma tentativa de compensação de reparação neuronal. Nos grupos ANI e MILD a porcentagem de $\epsilon 4$ em relação aos demais genótipos é bem inferior. Já no grupo HAD, a proporção de genótipos $\epsilon 4$ é mais equilibrada (41% de $\epsilon 4$). Esses achados podem ser explicados, de forma especulatória, da seguinte maneira: os baixos níveis de ApoE impactam todos os grupos com HAND, mas dentre eles o grupo mais afetado é o HAD, pois além de ter uma baixa produção, possui quase 50% de ApoE defeituosa. Em virtude disso, algum mecanismo compensatório pode estar ativando a produção de ApoE nesse grupo, o que pode de fato ser observado com o aumento da ApoE no grupo HAD à níveis que continuam sendo mais baixos, mas que não diferem estatisticamente dos níveis do grupo controle HIV+.

Por fim, a carga viral líquórica foi avaliada como marcador virológico. Dentre os indivíduos estudados, 95,8% não possuíam carga viral líquórica detectável. Para melhor entender esse achado, utilizamos o escore CPE para avaliarmos o uso drogas com diferentes níveis de penetração no SNC.

O escore CPE tem sido apoiado em alguns estudos, nos quais os regimes de tratamento com maior pontuação CPE geralmente apresentam taxas mais baixas de RNA viral no líquido^{54,59}. No entanto, a questão da utilidade da pontuação CPE continua controversa. De fato, o escore CPE é limitado por sua pontuação categórica, ponderação pouco clara de cada critério (farmacocinética, propriedades químicas, etc.) e falta de consideração de efeitos tóxicos ou interações medicamentosas. Além disso, o escore CPE depende de concentrações de fármaco no líquido, que podem não refletir a farmacocinética do parênquima cerebral¹⁸³. Em nosso estudo, apenas 22% dos indivíduos faziam uso de esquemas com CPE>8, apesar disso menos de 6% dos indivíduos no total apresentaram carga viral detectável. É importante destacar que dos quatro indivíduos com carga viral detectável, três utilizavam esquema de alta penetração. Esse resultado mostra que nessa população o escore CPE não pode ser considerado um fator de destaque no controle da viremia no SNC.

As guias brasileira e européia de manejo clínico da infecção pelo HIV em adultos utilizam atualmente o conceito de drogas potencialmente neuroativas, em detrimento ao

escore CPE. A recomendação é que, no tratamento das formas sintomáticas das HAND e no escape líquórico do HIV, a TARV contenha pelo menos dois ARV potencialmente neuroativos^{184,185}. Porém, atualmente, o benefício de esquemas com melhor penetração no SNC são controversos e as recomendações são conflitante^{59,185,186} e não há nenhuma comprovação científica consistente em relação ao benefício do uso dessas estratégias na prática clínica, indicando a necessidade de mais estudos.

Outro ponto importante em relação à TARV é o uso de Efavirenz, ainda utilizado como terapia de primeira linha em países em desenvolvimento. É sabido que esta droga comumente causa toxicidade neuropsiquiátrica e que o impacto dessa toxicidade a longo prazo pode ter como desfecho o comprometimento neurocognitivo⁵⁹. Foi avaliado o uso de Efavirenz nos indivíduos desse estudo, porém, em contraste com esse achado da literatura, não foi observada associação entre o uso desse artirretroviral e a HAND.

Importante destacar que, apesar de 95,8% dos indivíduos avaliados não possuírem carga viral líquórica detectável, encontramos IL-1 β e sCD14 aumentados nos indivíduos com HAND, como já foi discutido. Em outras palavras, líquido com perfil inflamatório mesmo sem presença de vírus. Uma explicação para o achado é a possível presença, mesmo em baixas quantidades, de proteínas virais produzidas a partir de células infectadas, como Vpr, Tat, Nef e gp120, que ativam ainda mais as vias inflamatórias, levando diretamente à toxicidade neural¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. No entanto, a inflamação crônica na infecção latente do HIV, sem a presença viral no compartimento líquórico, também pode ocorrer. Foi proposto recentemente em um encontro internacional de neuro HIV, em Pollenzo (NEUROHIV 2017), um novo conceito de “escape do sistema nervoso central com líquido avirêmico” que baseia-se no fato de que o compartimento líquórico representa a injúria causada pela presença do vírus no SNC, mas que não necessariamente apresenta uma infecção ativa local. Isso sugere que a HAND com supressão viral pode ser conduzida por componentes virais presentes em momento anterior, ou somente no SNC, ou pela ativação “indireta” de cascatas inflamatórias, enquanto a HAND sem supressão viral pode ser alimentada por vírus inteiros.

Por fim, o aspecto genético do vírus também não mostrou qualquer correlação com HAND. Resultado de certa forma esperado, visto que 86% dos indivíduos avaliados possuíam vírus do mesmo subtipo (B).

Em linhas gerais, esse trabalho buscou estudar diferentes classes de biomarcadores que pudessem auxiliar a identificação e diferenciação do perfil de

indivíduos com HAND em relação aos grupos controle HIV+ e HIV-. O entendimento das alterações neurocognitivas associadas ao HIV ainda é uma ciência em construção e os dados disponíveis na literatura são muitas vezes inconstantes e controversos, o que dificulta uma análise profunda e o entendimento das associações dos achados. Como comentado no início dessa sessão, a busca por biomarcadores é um assunto vigente na comunidade científica. Portanto, ainda que alguns dados aqui apresentados tenham sido discutidos de forma especulatória, em virtude da ausência de material bibliográfico consistente, sem dúvidas nossos achados podem contribuir com pesquisas futuras nessa linha. Finalmente, é importante ressaltar que os marcadores aqui identificados com capacidade discriminatória entre os grupos devem ser melhor estudados também em outras populações, como recém infectados, co-infectados e sintomáticos, com o intuito de melhor entender os mecanismos que regem a HAND.

7. CONCLUSÃO

- Os resultados reforçam o conceito de que a elevação da regulação das citocinas pró-inflamatórias, como sCD14 e IL-1beta, pode desempenhar um papel na patogênese da HAND, mesmo nos pacientes com supressão viral. Ambas citocinas encontram-se elevadas nos indivíduos com alterações neurocognitivas, indicando que a ativação celular pode estar relacionada a essa comorbidade.
- Em contrapartida, nenhum marcador de neurodegeneração apresentou diferença estatística entre os grupos.
- Os resultados mostraram um aumento de ApoE nos controles HIV + e uma diminuição nos pacientes com HAND. Da mesma forma, o alelo $\epsilon 4$, que apresenta uma deficiente capacidade de reparação neuronal, está mais presente no grupo controle HIV+, quando comparado com o grupo HAND. É possível que esse achado indique algum mecanismo compensatório, que poderia resultar em um fator protetor contra HAND, portanto deve ser melhor estudado;
- Todos os indivíduos HIV positivos estavam sob uso de TARV e 95,8% deles apresentaram carga viral plasmática e líquórica indetectável. O uso de drogas com maior neuropenetração não correlacionou-se com esse achado;
- O uso de Efavirenz não correlaciona-se com a presença de HAND;
- Não houve correlação entre os subtipos de HIV e a presença de HAND.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Control CoD. Pneumocystis pneumonia. (1981) MMWR Morb Mortal WKIY Rip 30: 250-252.
2. Marx JL. Strong new candidate for AIDS agent. (1984) Science 224: 475-477.
3. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, et al. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220: 865-867.
4. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220: 868-871.
5. (2006) International Committee on Taxonomy of Viruses.
6. Coffin J, Haase A, Levy J, Montagnier L, Oroszlan S, et al. (1986) Human Immunodeficiency Viruses. Science 232 697.
7. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, et al. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 233: 343-346.
8. Mansky LM, Temin HM (1995) Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. J Virol 69: 5087-5094.
9. Bretscher MT, Althaus CL, Muller V, Bonhoeffer S (2004) Recombination in HIV and the evolution of drug resistance: for better or for worse? Bioessays 26: 180- 188.
10. Carvajal-Rodriguez A, Crandall KA, Posada D (2007) Recombination favors the evolution of drug resistance in HIV-1 during antiretroviral therapy. Infect Genet Evol 7: 476-483.
11. Myers T, Millson M, Rigby J, Ennis M, Rankin J, et al. (1995) A comparison of the determinants of safe injecting and condom use among injecting drug users. Addiction 90: 217-226.
12. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, et al. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med 15: 871- 872.
13. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, et al. (2000) HIV-1 nomenclature proposal. Science 288: 55-56.
14. Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, et al. (1994) A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. J Virol 68: 1581-1585.
15. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM (2008) The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Engl J Med 358: 1590-1602.

16. Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, et al. (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4: 1032-1037.
17. Plantier, J.-C., et al. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15:871-872
18. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, et al. (1999) A reference guide to HIV-1 classification. In: C. Kuiken, B. Foley, et al (Ed.). *The Human retroviruses and AIDS compendium: Theoretical Biology and Biophysics group*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1999. HIV nomenclature proposal – a reference guide to HIV-1 classification. 492-505.
19. Turner BG, Summers MF (1999) Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285: 1-32.
20. Barre-Sinoussi F (1996) HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348: 31-35.
21. Haseltine WA (1991) Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J* 5: 2349-2360.
22. UNAIDS – Joint United Programme on HIV/aids. *Unaids Report on the Global AIDS Epidemic*, 2012.
23. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais. *Boletim Epidemiológico – HIV/AIDS*, 2016.
24. Costin, J.M.; Cytopathic Mechanisms of HIV-1. *Virology Journal*. 2007; 4:100.
25. Miranda, A. Evolução Natural da infecção por HIV – Aspectos clínicos. *Rev Port Clin Geral*, 2003; 19: 587-597.
26. Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D., et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Eng J Med*. 1991; 324:954-960.
27. Kahn, J.O., Walker, B.D.; Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Eng J. Med*. 1998; 339:33-39.
28. Sinicco, A., For a, R., Sciandra, M., Lucchini, A., Caramello, P., Gioannini, P.; Risk of developing AIDS after primary acute HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993; 6:575-581.
29. Vanhems, P., Hirschel, B., Phillips, A.N., Cooper, D.A., Vizzard, J., Brassard, J., et al. Incubation time of acute human immunodeficiency virus (HIV) infection and duration of acute HIV infection are independent prognostic factors of progression to AIDS. *J Infect Dis*. 2000; 182:334- 337.
30. Cooper, D.A., Gold, J., Maclean, P., Donovan, B., Finlayson, R., Barnes, T.G., et al. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1985; 1:537-540.

31. Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalams, S.A., et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997; 278:1447-1450.
32. Forsman, A., Weiss, R.A.; Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol.* 2008; 16, 555-560.
33. Riedel DJ, Pardo CA, McArthur J, Nath A (2006) Therapy Insight: CNS manifestations of HIV-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 557-565.
34. Christo PP, Greco DB, Aleixo AW, Livramento JA (2005) HIV-1 RNA levels in cerebrospinal fluid and plasma and their correlation with opportunistic neurological diseases in a Brazilian AIDS reference hospital. *Arq Neuropsiquiatr* 63: 907-913.
35. McArthur JC, Haughey N, Gartner S, Conant K, Pardo C, et al. (2003) Human immunodeficiency virus-associated dementia: an evolving disease. *J Neurovirol* 9: 205-221.
36. Berger JR, Moskowitz L, Fischl M, Kelley RE (1987) Neurologic disease as the presenting manifestation of acquired immunodeficiency syndrome. *South Med J* 80: 683-686.
37. Spector SA, Hsia K, Pratt D, Lathey J, McCutchan JA, et al. (1993) Virologic markers of human immunodeficiency virus type 1 in cerebrospinal fluid. The HIV Neurobehavioral Research Center Group. *J Infect Dis* 168: 68-74.
38. Chimelli L, Rosemberg S, Hahn MD, Lopes MB, Netto MB (1992) Pathology of the central nervous system in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV): a report of 252 autopsy cases from Brazil. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 478-488.
39. Lawrence DM, Major EO (2002) HIV-1 and the brain: connections between HIV-1-associated dementia, neuropathology and neuroimmunology. *Microbes Infect* 4: 301-308.
40. Clifford DB, Evans S, Yang Y, Acosta EP, Ribaud H, et al. (2009) Long-term impact of efavirenz on neuropsychological performance and symptoms in HIV-infected individuals (ACTG 5097s). *HIV Clin Trials* 10: 343-355.
41. Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, et al. (2007) Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 69: 1789-1799.
42. McArthur JC, Hoover DR, Bacellar H, Miller EN, Cohen BA, et al. (1993) Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. Multicenter AIDS Cohort Study. *Neurology* 43: 2245-2252.
43. Day JJ, Grant I, Atkinson JH, Brysk LT, McCutchan JA, et al. (1992) Incidence of AIDS dementia in a two-year follow-up of AIDS and ARC patients on an initial phase II

AZT placebo-controlled study: San Diego cohort. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 4: 15-20.

44. Sacktor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy (2002). *J Neurovirol* 8 Suppl 2: 115-121.

45. Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, et al. (2001) HIV-associated neurologic disease incidence changes:: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology* 56: 257-260.

46. Valcour VG, Shikuma CM, Watters MR, Sacktor NC (2004) Cognitive impairment in older HIV-1-seropositive individuals: prevalence and potential mechanisms. *AIDS* 18 Suppl 1: S79-86.

47. Ragin AB, Wu Y, Storey P, Cohen BA, Edelman RR, Epstein LG. Diffusion tensor imaging of subcortical brain injury in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Neurovirol.* 2005;11:292–298)

48. Thames AD, Becker BW, Marcotte TD, Hines LJ, Foley JM, Ramezani A, Singer EJ, Castellon SA, Heaton RK, Hinkin CH. Depression, cognition, and self-appraisal of functional abilities in HIV: an examination of subjective appraisal versus objective performance. *Clin Neuropsychol.* 2011;25:224–243)

49. Arendt G, Hefter H, Elsing C, Strohmeyer G, Freund HJ. Motor dysfunction in HIV-infected patients without clinically detectable central-nervous deficit. *J Neurol.* 1990;237:362–368

50. Mc Arthur JC, Hoover DR, Bacellar H, Miller EN, Cohen BA, Becker JT, Graham MNH, McArthur JH, Selnes OA, Jacobson LP, Vissler BR, Concha M, Saah A. Dementia in AIDS-patients: incidence and risk factors. *Neurology.* 1993;43:2245–2252

51. Crum-Cianflone NF, Moore DJ, Letendre S, Poehlman Roediger M, Eberly L, Weintrob A, Ganesan A, Johnson E, Del Rosario R, Agan BK, Hale BR. Low prevalence of neurocognitive impairment in early diagnosed and managed HIV-infected persons. *Neurology.* 2013;80:371–379

52. Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, Clifford DB, Cinque P, Epstein LG, Goodkin K, Gisslen M, Grant I, Heaton RK, Joseph J, Marder K, Marra CM, McArthur JC, Nunn M, Price RW, Pulliam L, Robertson KR, Sacktor N, Valcour V, Wojna VE. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology.* 2007;69:1789–1799).

53. Letendre S. Central nervous system complications in HIV disease: HIV-associated neurocognitive disorder. *Top Antivir Med.* 2011;19:137–142.

54. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, Collier AC, Gelman BB, McArthur JC, McCutchan JA, Morgello S, Simpson D, Grant I, Ellis RJ. Validation

of the CNS Penetration-effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the CNS. *Arch Neurol*. 2008;65:65–70.

55. Ellis RJ, Hsia K, Spector SA, et al. Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus Type 1 RNA levels are elevated in neurocognitively impaired individuals with acquired immunodeficiency syndrome. *AnnNeurol*. 1997;42:679–88.

56. Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*. 1969;9:179–86.

57. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*. 2006;12(12):1365–71.

58. Navia BA, Jordan BD, Price RW. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *AnnNeurol*. 1986;19:517–24

59. Ellis RVF, Letendre S, Haubrich R, Heaton R, McCutchan A, Cherner M, Umlauf A, Sacktor N, Clifford D. A randomized, controlled trial of a central nervous system-targeted ART strategy for HIV-associated neurocognitive disorders.. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections - Atlanta, GA.2013. p. 3.

60. Wong HL, Chattopadhyay N, Wu XY, Bendayan R. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. [Review] [194 refs]. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(4-5):503–17.

61. Schmitt FA, Bigley JW, McKinnis R, et al. Neuropsychological outcome of zidovudine (AZT) treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. *NEnglJMed*. 1988;319:1573–8.

62. Brew BJ, Bhalla RB, Paul M, Gallardo H, McArthur JC, et al. (1990) Cerebrospinal fluid neopterin in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Ann Neurol* 28: 556-560.

63. Brew BJ, Pemberton L, Cunningham P, Law MG (1997) Levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in cerebrospinal fluid correlate with AIDS dementia stage. *J Infect Dis* 175: 963-966.

64. Abdulle S, Mellgren A, Brew BJ, Cinque P, Hagberg L, et al. (2007) CSF neurofilament protein (NFL) -- a marker of active HIV-related neurodegeneration. *J Neurol* 254: 1026-1032.

65. Estes JD, Gordon SN, Zeng M, Chahroudi AM, Dunham RM, et al. (2008) Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in SIV-infected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques. *J Immunol* 180: 6798-6807.

66. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, et al. (2008) Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with

undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197: 126-133.

67. Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, et al. (2011) High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. *BMC Infect Dis* 11: 43.

68. Espinosa E, Ormsby CE, Reyes-Teran G, Asaad R, Sieg SF, et al. (2010) Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38⁺ CD4⁺ memory T cells in chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55: 439-445.

69. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, et al. (1988) Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4⁺ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 82: 1908-1914.

70. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, et al. (2003) T cell activation is associated with lower CD4⁺ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 187: 1534-1543.

71. Deeks SG, Phillips AN (2009) HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ* 338: a3172.

72. Bebell LM, Passmore JA, Williamson C, Mlisana K, Iriogbe I, et al. (2008) Relationship between levels of inflammatory cytokines in the genital tract and CD4⁺ cell counts in women with acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 198: 710-714.

73. Letendre SL, Zheng JC, Kaul M, Yiannoutsos CT, Ellis RJ, et al. (2011) Chemokines in cerebrospinal fluid correlate with cerebral metabolite patterns in HIV-infected individuals. *J Neurovirol* 17: 63-69.

74. Roberts L, Passmore JA, Williamson C, Little F, Bebell LM, et al. (2010) Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 24: 819-831.

75. Yuan L, Qiao L, Wei F, Yin J, Liu L, et al. (2013) Cytokines in CSF correlate with HIV-associated neurocognitive disorders in the post-HAART era in China. *J Neurovirol* 19: 144-149.

76. Shah A, Kumar A (2010) HIV-1 gp120-mediated increases in IL-8 production in astrocytes are mediated through the NF- κ B pathway and can be silenced by gp120-specific siRNA. *J Neuroinflammation*.

77. Yang B, Akhter S, Chaudhuri A, Kanmogne GD (2009) HIV-1 gp120 induces cytokine expression, leukocyte adhesion, and transmigration across the blood-brain barrier: modulatory effects of STAT1 signaling. *Microvasc Res* 77: 212-219.

78. Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM, et al. (2006) CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci* 26: 1098-1106.
79. Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, et al. (2002) HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13795-13800.
80. Lane BR, King SR, Bock PJ, Strieter RM, Coffey MJ, et al. (2003) The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology* 307: 122-134.
81. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-1371.
82. Gartner S (2000) HIV infection and dementia. *Science* 287: 602-604.
83. Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5: 69-81.
84. Kaul M, Garden GA, Lipton SA (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* 410: 988-994.
85. Williams K, Westmoreland S, Greco J, Ratai E, Lentz M, et al. (2005) Magnetic resonance spectroscopy reveals that activated monocytes contribute to neuronal injury in SIV neuroAIDS. *J Clin Invest* 115: 2534-2545.
86. Ryan LA, Zheng J, Brester M, et al. Plasma levels of soluble CD14 and tumor necrosis factor- α type II receptor correlate with cognitive dysfunction during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis.* 2001 Sep 15;184(6):699-706
87. Lyons JL, Uno H, Ancuta P, et al. Plasma sCD14 Is a Biomarker Associated With Impaired Neurocognitive Test Performance in Attention and Learning Domains in HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011 Aug 15;57(5):371-379.
88. Fischer-Smith T, Croul S, Sverstiuk AE, et al. CNS invasion by CD14⁺/CD16⁺ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *J Neurovirol.* 2001 Dec;7(6):528-541.
89. Sjogren M, Blomberg M, Jonsson M, Wahlund LO, Edman A, Lind K, Rosengren L, Blennow K, Wallin A (2001) Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a marker of white matter changes. *J Neurosci Res* 66:510- 516 12.
90. Malmestrom C, Haghighi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J (2003) Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* 61:1720-1725 91.

91. Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C (1996) Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem* 67:2013–2018
92. Brew BJ, Pemberton L, Blennow K, Wallin A, Hagberg L. CSF amyloid β 42 and tau levels correlate with AIDS dementia complex. *Neurology* 2005;65:1490–1492.
93. Green DA, Masliah E, Vinters HV, Beizai P, Moore DJ, Achim CL. Brain deposition of beta-amyloid is a common pathologic feature in HIV positive patients. *AIDS* 2005;19:407–411.
94. Esiri MM, Biddolph SC, Morris CS. Prevalence of Alzheimer plaques in AIDS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65:29–33.
95. Rempel HC, Pulliam L. HIV-1 Tat inhibits neprilysin and elevates amyloid β . *AIDS* 2005;19:127–135.
96. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261:921–923.
97. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993;43:1467–1472.
98. Newman MF, Croughwell ND, Blumenthal JA, Lowry E, White WD, Spillane W, Davis RD, Jr, Glower DD, Smith LR, Mahanna EP, et al. Predictors of cognitive decline after cardiac operation. *Ann Thorac Surg*. 1995;59:1326–1330.
99. Tardiff BE, Newman MF, Saunders AM, Strittmatter WJ, Blumenthal JA, White WD, Croughwell ND, Davis RD, Jr, Roses AD, Reves JG. Preliminary report of a genetic basis for cognitive decline after cardiac operations. The Neurologic Outcome Research Group of the Duke Heart Center. *Ann Thorac Surg*. 1997;64:715–720.
100. Nicoll JA, Roberts GW, Graham DI. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. *Nat Med*. 1995;1:135–137.
101. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet*. 1997;350:1069–1071
102. Shi J, Zhao CB, Vollmer TL, Tyry TM, Kuniyoshi SM. APOE epsilon 4 allele is associated with cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2008;70:185–190.
103. Burt TD, Agan BK, Marconi VC, He W, Kulkarni H, Mold JE, Cavrois M, Huang Y, Mahley RW, Dolan MJ, McCune JM, Ahuja SK. Apolipoprotein (apo) E4 enhances

HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:8718–8723.

104. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261:921–923.

105. Cutler RG, Haughey NJ, Tammara A, McArthur JC, Nath A, Reid R, Vargas DL, Pardo CA, Mattson MP. Dysregulation of sphingolipid and sterol metabolism by ApoE4 in HIV dementia. *Neurology*. 2004;63:626–630.

106. Valcour V, Shikuma C, Shiramizu B, Watters M, Poff P, Selnes OA, Grove J, Liu Y, Abdul-Majid KB, Gartner S, Sacktor N. Age, apolipoprotein E4, and the risk of HIV dementia: the Hawaii aging with HIV Cohort. *J Neuroimmunol*. 2004;157:197–202.

107. Corder EH, Robertson K, Lannfelt L, Bogdanovic N, Eggertsen G, Wilkins J, Hall C. HIV-infected subjects with the E4 allele for APOE have excess dementia and peripheral neuropathy. *Nat Med*. 1998;4:1182–1184.

108. Turchan-Cholewo J, Liu Y, Gartner S, Reid R, Jie C, Peng X, Chen KC, Chauhan A, Haughey N, Cutler R, Mattson MP, Pardo C, Conant K, Sacktor N, McArthur JC, Hauser KF, Gairola C, Nath A. Increased vulnerability of ApoE4 neurons to HIV proteins and opiates: protection by diosgenin and l-deprenyl. *Neurobiol Dis*. 2006;23:109–119.

109. Cinque, P., et al. (2000). "Molecular analysis of cerebrospinal fluid: potential for the study of HIV-1 infection of the central nervous system." *J Neurovirol* 6 Suppl 1: S95-S102.

110. de Almeida, S. M., et al. (2013). Neurocognitive impairment in HIV-1 clade C- versus B-infected individuals in Southern Brazil. *J Neurovirol* 19(6): 550-556.

111. Harrington, P. R., et al. (2009). Cross-sectional characterization of HIV-1 env compartmentalization in cerebrospinal fluid over the full disease course. *AIDS* 23(8): 907-915.

112. Sacktor, N., et al. (2014). HIV subtype is not associated with dementia among individuals with moderate and advanced immunosuppression in Kampala, Uganda. *Metab Brain Dis* 29(2): 261-268.

113. Schnell, G., et al. (2010). Compartmentalization and clonal amplification of HIV-1 variants in the cerebrospinal fluid during primary infection. *J Virol* 84(5): 2395-2407.

114. Tyor, W., et al. (2013). Effect of HIV clade differences on the onset and severity of HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol* 19(6): 515-522.

115. Salemi, M., et al. (2005). "Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes." *J Mol Evol* 60(5): 598-605.

116. Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Mar;41(3):338-41.
117. Siepel AC, Halpern AL, Macken C, Korber BT. A computer program designed to screen rapidly for HIV type 1 intersubtype recombinant sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995 Nov;11(11):1413-6.
118. Struck D, Lawyer G, Ternes AM, Schmit JC, Bercoff DP. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Res*. 2014 Oct;42(18):e144.
119. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016 Jul;33(7):1870-4.
120. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*. 1999 Jan;73(1):152-60.
121. Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J. and Wasserman, W. (1996). *Applied Linear Statistical Models*. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1408p.
122. Kirkwood, B.R. and Sterne, J. A. C (2006). *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. p.502.
123. Johnson, R.A. e Wichern, D. W. (2007). *Applied multivariate statistical analysis*. Upper Saddle River - New Jersey : Pearson Prentice Hall, 773p.
124. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-1371.
125. Gartner S (2000) HIV infection and dementia. *Science* 287: 602-604.
126. Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5: 69-81.
127. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, et al. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238–246.
128. Cysique LA, Moffat K, Moore DM, et al. HIV, vascular and aging injuries in the brain of clinically stable HIV-infected adults: A ¹H MRS Study. *PLoS One*. 2013;8(4):e61738.
129. Price RW, Epstein LG, Becker JT, et al. Biomarkers of HIV-1 CNS infection and injury. *Neurology*. 2007;69(18):1781–1788.

130. Yilmaz A, Price RW, Spudich S, et al. Persistent intrathecal immune activation in HIV-1-infected individuals on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;47(2):168–73.
131. Burdo TH, Lentz MR, Autissier P, et al. Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. *J Infect Dis*. 2011;204(1):154–163.
132. Burdo TH, Weiffenbach A, Woods AP, et al. : Elevated sCD163 in plasma but not cerebrospinal fluid is a marker of neurocognitive impairment in HIV infection. *AIDS*. 2013;27(9):1387–1395.
133. Lyons JL, Uno H, Ancuta P, et al. Plasma sCD14 is a biomarker associated with impaired neurocognitive test performance in attention and learning domains in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;57(5):371–379.
134. Zhu T, Muthui D, Holte S, et al. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication *in vivo* in CD14⁺ monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2002;76(2):707–716.
135. Bacchus C, Cheret A, Avettand-Fenoël V, et al. A single HIV-1 cluster and a skewed immune homeostasis drive the early spread of HIV among resting CD4⁺ cell subsets within one month post-infection. *PLoSOne*. 2013;8(5):e64219. 10.1371/journal.pone.0064219
136. Campbell JH, Hearps AC, Martin GE, et al. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. *AIDS*. 2014;28(15):2175–2187.
137. He J, Chen Y, Farzan M, et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*. 1997;385(6617):645–649.
138. Lavi E, Strizki JM, Ulrich AM, et al. CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types, including microglia and neurons. *Am J Pathol*. 1997;151(4):1035–1042.
139. Desplats P, Dumaop W, Smith D, et al. Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain. *Neurology*. 2013;80(15):1415–1423.
140. Thompson KA, Cherry CL, Bell JE, et al. Brain cell reservoirs of latent virus in presymptomatic HIV-infected individuals. *Am J Pathol*. 2011;179(4):1623–9.
141. Carroll-Anzinger D, Al-Harathi L: Gamma interferon primes productive human immunodeficiency virus infection in astrocytes. *J Virol*. 2006;80(1):541–4.
142. Churchill MJ, Wesselingh SL, Cowley D, et al. : Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*. 2009;66(2):253.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

143. Takahashi K, Wesselingh SL, Griffin DE, et al. Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/ *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Ann Neurol*. 1996;39(6):705–11.
144. Sharer LR, Saito Y, Da Cunha A, et al. *In situ* amplification and detection of HIV-1 DNA in fixed pediatric AIDS brain tissue. *Hum Pathol*. 1996;27(6):614–7.
145. An SF, Groves M, Giometto B, et al. Detection and localisation of HIV-1 DNA and RNA in fixed adult AIDS brain by polymerase chain reaction/ *in situ* hybridisation technique. *Acta Neuropathol*. 1999;98(5):481–7.
146. Churchill MJ, Gorry PR, Cowley D, et al. Use of laser capture microdissection to detect integrated HIV-1 DNA in macrophages and astrocytes from autopsy brain tissues. *J Neurovirol*. 2006;12(2):146–52.
147. Honeycutt JB, Wahl A, Baker C, et al. Macrophages sustain HIV replication *in vivo* independently of T cells. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1353–66.
148. Griffin DE, McArthur JC, Cornblath DR. Neopterin and interferon-gamma in serum and cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurologic disease. *Neurology*. 1991 Jan;41(1):69-74.
149. Brew BJ, Pemberton L, Blennow K, Wallin A, Hagberg L. CSF amyloid β 42 and tau levels correlate with AIDS dementia complex. *Neurology* 2005;65:1490–1492.
150. Krut JJ, Zetterberg H, Blennow K, Cinque P, Hagberg L, Price RW, Studahl M, Gisslén M. Cerebrospinal fluid Alzheimer's biomarker profiles in CNS infections. *J Neurol*. 2013 Feb;260(2):620-6.
151. Cysique LA, et al. APOE ϵ 4 moderates abnormal CSF-abeta-42 levels, while neurocognitive impairment is associated with abnormal CSF tau levels in HIV+ individuals - a cross-sectional observational study. *BMC Neurol*. 2015 Apr 1;15:51.
152. Stamouli EC, Politis AM. Pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease. *Psychiatriki*. 2016 Oct-Dec;27(4):264-275.
153. Beau M, Ances, et al. HIV Associated Neurocognitive Disorder (HAND) is Not Associated with Increased Fibrillar Amyloid Deposits Using C-PiB in Middle-Aged HIV+ Participants. *Arch Neurol*. 2012 Jan; 69(1): 72–77.
154. Steinbrink F, et al. Cognitive impairment in HIV infection is associated with MRI and CSF pattern of neurodegeneration. *Eur J Neurol*. 2013 Mar;20(3):420-8.
155. Peluso MJ, et al. Cerebrospinal fluid and neuroimaging biomarker abnormalities suggest early neurological injury in a subset of individuals during primary HIV infection. *J Infect Dis*. 2013 Jun 1;207(11):1703-12.

156. Gisslén M, et al. Amyloid and tau cerebrospinal fluid biomarkers in HIV infection. *BMC Neurol.* 2009 Dec 22;9:63.
157. Clifford DB, et al. CSF biomarkers of Alzheimer disease in HIV-associated neurologic disease. *Neurology.* 2009 Dec 8; 73(23): 1982–1987.
158. Skillback T, Farahmand B, Bartlett JW, Rosen C, Mattsson N, Nagga K, et al. CSF neurofilament light differs in neurodegenerative diseases and predicts severity and survival. *Neurology.* 2014;83:1945–53.
159. Peterson J, Gisslen M, Zetterberg H, Fuchs D, Shacklett BL, Hagberg L, et al. Cerebrospinal fluid (CSF) neuronal biomarkers across the spectrum of HIV infection: Hierarchy of injury and detection. *PLoS One.* 2014;9
160. Krut JJ, Mellberg T, Price RW, Hagberg L, Fuchs D, Rosengren L, et al. Biomarker evidence of axonal injury in neuroasymptomatic HIV-1 patients. *PLoS One.* 2014;9
161. Edén A, Marcotte TD, Heaton RK, Nilsson S, Zetterberg H, Fuchs D, et al. Increased Intrathecal Immune Activation in Virally Suppressed HIV-1 Infected Patients with Neurocognitive Impairment. *PLoS One.* 2016;11.
162. Gisslén M, Price RW, Andreasson U, Norgren N, Nilsson S, Hagberg L, et al. Plasma Concentration of the Neurofilament Light Protein (NFL) is a Biomarker of CNS Injury in HIV Infection: A Cross-Sectional Study. *EBioMedicine.* 2016;3:135– 40.
163. Vitek MP, Brown CM, Colton CA. APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol Aging.* Sep; 2009 30(9):1350–1360.
164. Chang L, Andres M, Sadino J, et al. Impact of apolipoprotein E epsilon4 and HIV on cognition and brain atrophy: Antagonistic pleiotropy and premature brain aging. *NeuroImage.* 2011; 58(4):1017–1027.
165. Andres MA, Feger U, Nath A, Munsaka S, Jiang CS, Chang L. APOE epsilon 4 allele and CSF APOE on cognition in HIV-infected subjects. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology.* 2011; 6(3):389–398.
166. Panos SE, Hinkin CH, Singer EJ, et al. Apolipoprotein-E genotype and human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorder: The modulating effects of older age and disease severity. *Neurobehavioral HIV Medicine.* 2013.
167. Diaz-Arrastia R, Gong Y, Kelly C, Gelman B. Host genetic polymorphisms in human immunodeficiency virus related neurologic disease. *Journal of neurovirology.* 2004; 10(Suppl 1): 67–73.

168. Soontornniyomkij V, Moore DJ, Gouaux B, et al. Cerebral beta-amyloid deposition predicts HIV-associated neurocognitive disorders in APOE epsilon4 carriers. *AIDS*. Nov 28; 2012 26(18):2327–2335.
169. Corder EH, Robertson KR, Lannfelt L, et al. HIV-infected subjects with E4 allele for APOE have excess dementia and peripheral neuropathy. *Nature medicine*. 1998; 4(10):1182–1184.
170. Joska JA, Combrinck M, Valcour VG, et al. Association between apolipoprotein E4 genotype and human immunodeficiency virus-associated dementia in younger adults starting antiretroviral therapy in South Africa. *Journal of neurovirology*. 2010; 16(5):377–383.
171. Levine et al. Page 21 *J Acquir Immune Defic Syndr*. Author manuscript; available in PMC 2015 April 01.
172. Pemberton LA, Stone E, Price P, van Bockxmeer F, Brew BJ. The relationship between ApoE, TNFA, IL1a, IL1b and IL12b genes and HIV-1-associated dementia. *HIV Med*. 2008; 9(8):677–680.
173. Pomara N, Belzer KD, Silva R, Cooper TB, Sidtis JJ. The apolipoprotein E epsilon4 allele and memory performance in HIV-1 seropositive subjects: differences at baseline but not after acute oral lorazepam challenge. *Psychopharmacology*. 2008; 201(1):125–135.
174. Spector SA, Singh KK, Gupta S, et al. APOE ε4 and MBL-2 O/O genotypes are associated with neurocognitive impairment in HIV-infected plasma donors. *AIDS*. 2010; 24(10):1471–1479.
175. Sun B, Abadjian L, Rempel H, Calosing C, Rothlind J, Pulliam L. Peripheral biomarkers do not correlate with cognitive impairment in highly active antiretroviral therapy-treated subjects with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of neurovirology*. 2010; 16(2):115–124.
176. Valcour VG, Shikuma C, Shiramizu B, et al. Age, apolipoprotein E4, and the risk of HIV dementia: the Hawaii Aging with HIV Cohort. *Journal of neuroimmunology*. 2004; 157(1-2):197–202.
177. Buttini M¹, Akeefe H, Lin C, Mahley RW, Pitas RE, Wyss-Coray T, Mucke L. Dominant negative effects of apolipoprotein E4 revealed in transgenic models of neurodegenerative disease. *Neuroscience*. 2000;97(2):207-10.

178. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:333–344
179. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* 2012;148:1204–1222.
180. Mahley RW, Apolipoprotein E. cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988;240(4852):622–630.
181. Han SH, Hulette C, Saunders AM, et al. Apolipoprotein E is present in hippocampal neurons without neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and in age-matched controls. *Exp. Neurol.* 1994;128(1):13–26.
182. Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA. Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1986;83(4):1130–1134.
183. Cysique LA, Waters EK, Brew BJ: Central nervous system antiretroviral efficacy in HIV infection: a qualitative and quantitative review and implications for future research. *BMC Neurol.* 2011;11:148. 10.1186/1471-2377-11-148.
184. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for the Management of HIV Infection in Adults. 2017. Available at: <http://www.aids.gov.br/pt-br/tags/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas> (Last accessed February 27, 2018).
185. EACS Guidelines. Version 8.2, January 2017. Available at: www.eacsociety.org/files/guidelines_8.2-english.pdf (Last accessed October 10, 2017).
186. Letendre SL, Mills AM, Tashima KT, et al. A study of the pharmacokinetics and antiviral activity of dolutegravir in cerebrospinal fluid in HIV-1-infected, antiretroviral therapy-naïve subjects. *Clin Infect Dis* 2014;59:1032–1037.
187. Kasyanov A, Tamamura H, Fujii N, et al. HIV-1 gp120 enhances giant depolarizing potentials via chemokine receptor CXCR4 in neonatal rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2006;23(5):1120–1128.
188. Lu SM, Tremblay MÈ, King IL, et al. : HIV-1 Tat-induced microgliosis and synaptic damage via interactions between peripheral and central myeloid cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e23915.
189. Power C, Hui E, Vivithanaporn P, et al. Delineating HIV-associated neurocognitive disorders using transgenic models: the neuropathogenic actions of Vpr. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(2):319–331.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

190. Yang B, Akhter S, Chaudhuri A, et al. HIV-1 gp120 induces cytokine expression, leukocyte adhesion, and transmigration across the blood-brain barrier: modulatory effects of STAT1 signaling. *Microvasc Res.* 2009;77(2):212–219.

ANEXO A. Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

<p>FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DE UM PERFIL DE MARCADORES ASSOCIADOS AS DESORDENS NEUROCOGNITIVAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV-1

Pesquisador: Camilla Malta Romano

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 21297613.0.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 659.363

Data da Relatoria: 21/05/2014

Apresentação do Projeto:

Foi solicitado uma alteração pelo comite do Emilio Ribas para descrever melhor os controles do projeto

Objetivo da Pesquisa:

descrito anteriormente

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

risco minimo pois as amostras serao coletadas de pacientes com Indicação de realização de liquor

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

as modificações estão adequadas indicando melhor como será feito o recrutamento dos pacientes

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequado

Recomendações:

nenhum

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

<p>Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21ª andar sala 96 Bairro: PACAEMBU CEP: 01.248-903 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep_fm@usp.br</p>
--

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 059.363

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

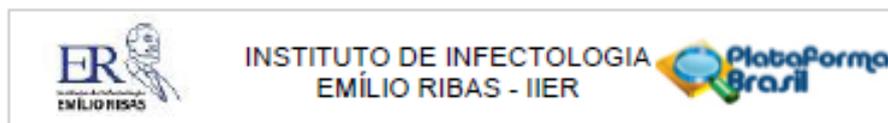
SAO PAULO, 23 de Maio de 2014

Assinado por:
Paulo Euripedes Marchiori
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.248-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

Página 02 de 02

ANEXO B. Aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DE UM PERFIL DE MARCADORES ASSOCIADOS AS DESORDENS NEUROCOGNITIVAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV-1

Pesquisador: Camila Malta Romano

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 21297613.0.3002.0061

Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.327.226

Apresentação do Projeto:

Pedido de emenda do projeto supracitado, ref. solicitação do CEP do IIER, conforme parecer 545.187 sobre:

1-Descrever como será feito o recrutamento dos pacientes.

Serão avaliados 150 pacientes e divididos em 5 grupos diferentes, de acordo com os resultados dos exames neuropsicológicos realizados por um neuropsicólogo do IIER:

Grupo 1 Pacientes portadores do vírus HIV com Alteração Neurocognitiva Assintomática (ANI)

Grupo 2 Pacientes portadores do vírus HIV com Desordem Neurocognitiva leve/moderada (MND)

Grupo 3 Pacientes portadores do vírus HIV com Demência associada ao HIV (HAD)

Grupo 4 Pacientes portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 1)

Grupo 5 Pacientes não portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 2)

O recrutamento dos indivíduos dos grupo 1 a 3 será feito a partir do encaminhamento dos

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.248-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3896-1406 Fax: (11)3896-1406 E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 1.327.226

mesmos ao Ambulatório coordenado pela Dra Jerusa Smlid, e somente aqueles com indicação de coleta de líquor serão abordados. O recrutamento dos participantes dos grupos 4 e 5 será feito através da necessidade de coleta de líquor para eventuais exames solicitados pelo seu médico, uma vez que não possuem desordens neurocognitivas.

Estes indivíduos são acompanhados no IIER e o diagnóstico de alteração neurocognitiva e /ou demência será realizado por uma equipe de neuropsicólogos e psiquiatras. As amostras serão submetidas aos seguintes experimentos: 1. Quantificação de carga viral do HIV no líquor; 2. Quantificação de lipopolissacarídeos (LPS) no plasma; 3. Quantificação de citocinas no líquor; 4. Determinação de HERV-K no líquor; 5. Quantificação de neurofilamentos no líquor.

Critério de Inclusão: Indivíduos com sorologia positiva para HIV-1; ambos os sexos; Idade entre 18 e 60 anos; Acompanhamento regular no ambulatório; Dentro de um dos seguintes perfis: 1. Sorologia negativa para HIV e sem alterações neurocognitivas, 2. Sorologia positiva para HIV e sem alterações neurocognitivas, 3. Sorologia positiva para HIV e com ANI, 4. Sorologia positiva para HIV e com MND e 5. Sorologia positiva para HIV e com HAD.

Critério de Exclusão: Pacientes com dados clínicos e laboratoriais incompletos; Gestantes; Pacientes com comorbidades como: sífilis, hepatites B e C, HTLV, toxoplasmose e/ou outras patologias que possam ter como consequência algum tipo de alteração neurológica; Pacientes sem HAART.

2-Anexar o questionário dos sintomas neurológicos subjetivos, teste de rastreio neuropsicológico e testes neuropsicológicos: Anexados os questionários e testes que serão realizados (Anexos 1-7).

3-Rever o projeto e os TCLEs para que considere a coleta de LCR como procedimento do estudo. Incluído ao longo do texto (pág 13, Item 4.4) uma sentença explicitando a coleta de líquor como procedimento do estudo. Da mesma forma, incluímos nos TCLEs os detalhes da necessidade da coleta de LCR para a realização de exames e como utilizaremos esse material no presente projeto, mediante autorização dos mesmos. Sendo assim, os riscos e desconfortos possivelmente decorrentes da coleta foram claramente informados. Ainda, mencionamos aqui que um TCLE separado será aplicado para os pacientes a serem incluídos nos diferentes grupos, sendo 3 TCLEs distintos – encaminhados para apreciação - (um para os indivíduos Grupo 1, 2 e 3- com HIV-1 e algum grau de desordem neurocognitiva, um para os indivíduos do Grupo 4 – HIV-1 sem desordens neurocognitivas e um para o Grupo 5 – sem HIV-1 e sem desordens neurocognitivas).

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



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 1.327.226

Isso se faz necessário para diminuir o número de Informação a ser descrita se fosse um único TCLE, o que poderia levar o paciente a confusão sobre o entendimento do estudo e o seu papel dentro do mesmo.

4-Incluir no TCLE o nome e contato do responsável pela pesquisa no IIER: Adicionado nos TCLEs o nome, telefone e email do Dr Augusto Penalva de Oliveira, responsável pelo estudo no IIER. Uma sentença está logo no início do TCLE com seu nome e email e no texto do Termo, oferecemos esses dados, além do telefone pessoal do Dr Augusto.

5-Incluir o termo de anuência do Diretor do IIER: Foi incluído e segue também a carta solicitada como parte do material enviado para apreciação.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Estabelecer um painel de marcadores relacionados às desordens neurológicas associadas ao HIV-1.

Objetivo Secundário: Determinar, através da análise dos marcadores estudados, limites que possam discriminar os diferentes graus de desordens neurológicas associadas ao HIV-1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Na coleta de sangue poderá haver um pequeno hematoma que desaparecerá em pouco tempo. Na coleta de líquor poderá haver dor de cabeça e, em casos muito raros, hemorragia ou infecção, porém a coleta desse material é indicada pelo médico responsável pelo paciente e faz parte do acompanhamento clínico do mesmo, ou seja, não haverá necessidade de uma punção extra para a pesquisa.

Benefícios: Não há benefícios diretos aos sujeitos de pesquisa além dos resultados dos testes realizados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ver conclusões e pendências.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ver conclusões e pendências.

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



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 1.327.226

Recomendações:

ver conclusões e pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pedido de emenda do projeto supracitado, ref. solicitação do CEP do IIER, conforme parecer 545.187 atendido as solicitações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_317289_EI.pdf	14/05/2014 10:57:18		Aceito
Outros	Justificativa emenda CEPFMUSP 2014.pdf	14/05/2014 10:50:38		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuência.pdf	14/05/2014 10:50:13		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_G5_cmr_acso.docx	14/05/2014 10:49:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_G4_cmr_acso.docx	14/05/2014 10:49:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_G1,2,3_cmr_acso.doc	14/05/2014 10:49:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Deme;ncia_CEP_cmr_acso.docx	14/05/2014 10:49:21		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_212976.pdf	08/11/2013 16:38:02		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_212976.pdf	03/10/2013 14:01:59		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_212976.pdf	05/09/2013 15:18:42		Aceito
Folha de Rosto	Plataforma0001.pdf	27/08/2013 13:05:44		Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.248-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3896-1406 Fax: (11)3896-1406 E-mail: comiteetca@emilioribas.sp.gov.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 1.327.226

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Novembro de 2015

Assinado por:
Vilma Borba Leandro Ferreira Jardim
(Coordenador)

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.248-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3896-1406 Fax: (11)3896-1406 E-mail: comitecia@emilioribas.sp.gov.br

ANEXO C. Termo de consentimento livre e esclarecido para os grupo 1,2 e 3 (HAND).

“INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS”

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO:.....

BAIRRO: CIDADE.....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

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

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE:

.....

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1”

-PESQUISADOR EXECUTANTE: Ana Carolina Soares de Oliveira (anacarolina.soares@usp.br)

-PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Dra. Camila Malta Romano (cmromano@usp.br)

-PESQUISADOR CO-RESPONSÁVEL: Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira (rdcassia@uol.com.br)

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA “EMÍLIO RIBAS”

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: “Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1”

O (a) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo que consiste em procurar indicadores de lesões (machucados) no cérebro causadas pelo HIV. Nós procuraremos esses indicadores no seu sangue e no seu líquido (líquido da espinha).

Os indivíduos que aceitarem participar do estudo serão divididos em 5 grupos diferentes, de acordo com os resultados dos exames neuropsicológicos realizados por um neuropsicólogo do Emílio Ribas:

Grupo 1 – Pacientes portadores do vírus HIV com Alteração Neurocognitiva Assintomática (ANI)

Grupo 2 – Pacientes portadores do vírus HIV com Desordem Neurocognitiva leve/moderada (MND)

Grupo 3 – Pacientes portadores do vírus HIV com Demência associada ao HIV (HAD)

Grupo 4 – Pacientes portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 1)

Grupo 5 – Pacientes não portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 2)

No momento da entrevista nós lhe informaremos a qual grupo o (a) senhor(a) pertence.

Para participar deste estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, local de nascimento, endereço e outros). Estas informações serão mantidas em sigilo, ou seja, o seu nome não será divulgado e as amostras receberão um código para a identificação.

Nesse estudo participarão 150 pacientes em acompanhamento clínico no Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, divididos nos 5 grupos mencionados a cima (serão em média 30 pacientes em cada grupo).

Para participar desse estudo é necessário coleta de sangue e do líquido da espinha.

- Coleta do líquido da espinha:

A coleta do líquido da espinha será indicada pelo seu médico e faz parte da rotina de acompanhamento no ambulatório, sendo assim será necessária apenas 1 coleta. O procedimento será realizado pela Dra. Thereza Mattos, médica especializada em coleta de líquido, de acordo com todas as normas internacionais. Durante o procedimento o (a) senhor (a) será orientado a se deitar de lado, em posição fetal (como um bebê na barriga da mãe). Em seguida a doutora irá desinfetar a pele e introduzir uma agulha descartável

que vai passar pelo espaço entre duas vértebras da sua coluna até chegar ao reservatório onde se acumula o líquido. A dor é semelhante a da coleta de sangue. O (a) senhor (a) poderá sentir dor de cabeça algumas horas após a coleta, para evitar que isso aconteça, ao chegar em casa deverá permanecer deitado e em repouso por 24 horas e tomar bastante líquido. Em casos muito raros poderá ocorrer hemorragia ou infecção, porém lembramos que esse procedimento é feito rotineiramente e por uma profissional altamente qualificada. Serão coletados aproximadamente 7mL do líquido da sua espinha (1 colher de sopa e meia), 4mL serão utilizados para seus exames e 3mL serão utilizados em nossa pesquisa

- Coleta de sangue:

A coleta do sangue, 10mL aproximadamente (2 colheres de sopa), será feita com uma agulha esterilizada, limpa, ligada a um tubo de vidro contendo anticoagulante e será colocada em uma veia do seu antebraço, puxando o sangue para dentro do tubo por um processo a vácuo. Esse procedimento pode causar um pequeno sangramento, uma mancha roxa ou vermelha (hematoma) na pele (que desaparecerá em pouco tempo), e em casos muito extremos, desmaio. Mas lembramos que esta coleta será realizada por uma equipe treinada que faz parte do Laboratório do “Instituto de Infectologia Emilio Ribas”.

O (a) senhor (a) não receberá benefício direto por fazer parte deste estudo. As informações obtidas poderão ajudar a outras pessoas que tenham HIV.

O (a) senhor (a) também tem o direito de optar por não participar deste estudo. Caso o (a) senhor (a) decida não participar, isto não afetará em nada quanto ao seu direito em receber tratamento no ambulatório.

Os documentos contendo as suas informações serão guardados em local seguro e somente os pesquisadores responsáveis e o executante terão acesso.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

No caso do participante apresentar alguma consequência grave em decorrência da coleta de sangue, que o imobilize dos seus afazeres diários (desde que seja devidamente comprovado), este deverá acionar o coordenador do estudo e/ou o pesquisador executante para que seja providenciada total assistência e tratamento médico na instituição.

Todos os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Os resultados desse estudo serão informados ao (a) senhor (a) ao término do mesmo.

Caso o (a) senhor (a) tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emilio Ribas através do telefone (11) 3896-1406 ou pelo e-mail: comitedeeticaier@ig.com.br e/ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo através do telefone (11) 3061-8004 ou e-mail: cep.fm@usp.br. O (a) senhor (a) pode entrar em contato com a pesquisadora executante Msc. Ana Carolina S. de Oliveira

a qualquer momento no telefone: 3061-8699 ou através do e-mail: anacarolina.soares@usp.br, com a pesquisadora responsável Dra. Camila Romano através do e-mail cmromano@usp.br e/ou com o pesquisador co-responsável Dr. Augusto Penalva através do e-mail: rdcassia@uol.com.br ou pelo telefone (11) 99933-2917. O (a) senhor (a) receberá uma cópia deste termo.

Desde já agradecemos!

Reforçamos que participar deste estudo é um ato inteiramente voluntário. O (a) senhor (a) pode preferir não participar deste estudo ou abandoná-lo em qualquer momento. O (a) senhor (a) será tratado (a) da mesma forma, independente da sua decisão nós prestaremos todos os serviços clínicos e profissionais de diagnóstico e de laboratório que fizerem parte deste estudo, sem que isso ocorra em custo algum.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que li, ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “DETERMINAÇÃO DE UM PERFIL DE MARCADORES ASSOCIADOS ÀS DESORDENS NEUROCOGNITIVAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV-1”.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ser adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Dados do Paciente/Representante legal

Nome:.....
Assinatura.....
Data:...../...../.....

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

Dados do Responsável que obteve o TCLE

Nome:.....
Assinatura:.....
Data:...../...../.....

ANEXO D. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Grupo 4 (controle HIV positivo).

**“INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS”
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:.....

BAIRRO: CIDADE:.....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

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

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE:

.....

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : “Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1”

-PESQUISADOR EXECUTANTE: Ana Carolina Soares de Oliveira
(anacarolina.soares@usp.br)

-PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Dra. Camila Malta Romano (cmromano@usp.br)

-PESQUISADOR CO-RESPONSÁVEL: Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira
(rdcassia@uol.com.br)

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA “EMÍLIO RIBAS”

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: “Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1”

O (a) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo que consiste em procurar indicadores de lesões (machucados) no cérebro causadas pelo HIV. Nós procuraremos esses indicadores no seu sangue e no seu líquido (líquido da espinha).

Os indivíduos que aceitarem participar do estudo serão divididos em 5 grupos diferentes, de acordo com os resultados dos exames neuropsicológicos realizados por um neuropiscólogo do Emílio Ribas:

Grupo 1 – Pacientes portadores do vírus HIV com Alteração Neurocognitiva Assintomática (ANI)

Grupo 2 – Pacientes portadores do vírus HIV com Desordem Neurocognitiva leve/moderada (MND)

Grupo 3 – Pacientes portadores do vírus HIV com Demência associada ao HIV (HAD)

Grupo 4 – Pacientes portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 1)

Grupo 5 – Pacientes **não** portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 2)

Para participar deste estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, local de nascimento, endereço e outros). Estas informações serão mantidas em sigilo, ou seja, o seu nome não será divulgado e as amostras receberão um código para a identificação.

Nesse estudo participarão 150 pacientes em acompanhamento clínico no Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, divididos nos 5 grupos mencionados a cima (serão em média 30 pacientes em cada grupo).

Para participar desse estudo é necessário coleta do líquido da espinha, de sangue e alguns testes neuropsicológicos.

- Coleta do líquido da espinha:

O procedimento é realizado pela Dra. Thereza Mattos, médica especializada em coleta de líquido, de acordo com todas as normas internacionais. Durante o procedimento o (a) senhor (a) será orientado a se deitar de lado, em posição fetal (como um bebê na barriga da mãe). Em seguida a doutora irá desinfetar a pele e introduzir uma agulha descartável que vai passar pelo espaço entre duas vértebras da sua coluna até chegar ao reservatório onde se acumula o líquido. A dor é semelhante a da coleta de sangue.

O (a) senhor (a) poderá sentir dor de cabeça algumas horas após a coleta, para evitar que isso aconteça, ao chegar em casa deverá permanecer deitado e em repouso por 24 horas e tomar bastante líquido. Em casos muito raros poderá ocorrer hemorragia ou infecção, porém lembramos que esse procedimento é feito rotineiramente e por uma profissional altamente qualificada.. No seu caso, o senhor está sendo convidado a participar desse estudo para sua inclusão no grupo 4 (indivíduos com HIV sem qualquer alteração neurocognitiva, grupo controle 1). Portanto, a coleta do líquido da espinha já foi feita pelo (a) senhor (a), por indicação do seu médico, para a realização de alguns exames. Foram

coletados aproximadamente 7mL do líquido da sua espinha (1 colher de sopa e meia), uma parte desse material foi utilizada para seus exames, a outra parte seria jogada fora. Solicitamos portanto a sua autorização para utilizar a parte que seria descartada.

- Coleta de sangue:

A coleta do sangue, 10mL aproximadamente (2 colheres de sopa), será feita com uma agulha esterilizada, limpa, ligada a um tubo de vidro contendo anticoagulante e será colocada em uma veia do seu antebraço, puxando o sangue para dentro do tubo por um processo a vácuo. Esse procedimento pode causar um pequeno sangramento, uma mancha roxa ou vermelha (hematoma) na pele (que desaparecerá em pouco tempo), e em casos muito extremos, desmaio. Mas lembramos que esta coleta será realizada por uma equipe treinada que faz parte do Laboratório do “Instituto de Infectologia Emilio Ribas”. Este procedimento será feito nos cinco grupos de pacientes dessa pesquisa.

- Testes neuropsicológicos:

O (a) senhor (a) passará por alguns testes, feitos por uma psicóloga, que confirmarão que o (a) senhor (a) não possui nenhuma alteração neuropsicológica. Esses testes vão avaliar diversos domínios cognitivos como memória, audição, visão e fala.

Os testes serão aplicados na sala de Neurociências e a duração da avaliação é de no máximo duas horas. Caso seja detectado algum grau de alteração cognitiva, o Sr.(a) será encaminhado para avaliação no ambulatório de Neurologia do nosso serviço.

O (a) senhor (a) não receberá benefício direto por fazer parte deste estudo. As informações obtidas poderão ajudar a outras pessoas que tenham HIV.

O (a) senhor (a) também tem o direito de optar por não participar deste estudo. Caso o (a) senhor (a) decida não participar, isto não afetará em nada quanto ao seu direito em receber tratamento no ambulatório.

Os documentos contendo as suas informações serão guardados em local seguro e somente os pesquisadores responsáveis e o executante terão acesso.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

No caso do participante apresentar alguma consequência grave em decorrência da coleta de sangue, que o imobilize dos seus afazeres diários (desde que seja devidamente comprovado), este deverá acionar o coordenador do estudo e/ou o pesquisador executante para que seja providenciada total assistência e tratamento médico na instituição.

Todos os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Os resultados desse estudo serão informados ao (a) senhor (a) ao término do mesmo.

Caso o (a) senhor (a) tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas através do telefone (11) 3896-1406 ou pelo e-mail: comitedeeticaier@ig.com.br e/ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo através do telefone (11) 3061-8004 ou e-mail: cep.fm@usp.br. O (a) senhor (a) pode entrar em contato com a pesquisadora executante Msc. Ana Carolina S. de Oliveira a qualquer momento no telefone: 3061-8699 ou através do e-mail: anacarolina.soares@usp.br, com a pesquisadora responsável Dra. Camila Romano através do e-mail cmromano@usp.br e/ou com o pesquisador co-responsável Dr. Augusto Penalva através do e-mail: rdcassia@uol.com.br ou pelo telefone (11) 99933-2917. O (a) senhor (a) receberá uma cópia deste termo.

Desde já agradecemos!

Reforçamos que participar deste estudo é um ato inteiramente voluntário. O (a) senhor (a) pode preferir não participar deste estudo ou abandoná-lo em qualquer momento. O (a) senhor (a) será tratado (a) da mesma forma, independente da sua decisão nós prestaremos todos os serviços clínicos e profissionais de diagnóstico e de laboratório que fizerem parte deste estudo, sem que isso ocorra em custo algum.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que li, ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**DETERMINAÇÃO DE UM PERFIL DE MARCADORES ASSOCIADOS ÀS DESORDENS NEUROCOGNITIVAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV-1**”.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ser adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Dados do Paciente/Representante legal

Nome:.....

Assinatura:.....

Data:...../...../.....

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

Dados do Responsável que obteve o TCLE

Nome:.....

Assinatura:.....

Data:...../...../.....

**ANEXO E. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Grupo 5
(controle HIV negativo).**

**“INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS”
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .MF

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº.....APTO:.....

BAIRRO: CIDADE.....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

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

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE:

.....

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : “Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1”

PESQUISADOR EXECUTANTE: Ana Carolina Soares de Oliveira
(anacarolina.soares@usp.br)

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Dra. Camila Malta Romano (cmromano@usp.br)

PESQUISADOR CO-RESPONSÁVEL: Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira
(rdcassia@uol.com.br)

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	<input type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input type="checkbox"/>

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA “EMÍLIO RIBAS”

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: “Determinação de um perfil de marcadores associados às desordens neurocognitivas em indivíduos portadores de HIV-1”

O (a) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo que consiste em procurar indicadores de lesões (machucados) no cérebro causadas pelo HIV. Nós procuraremos esses indicadores no seu sangue e no seu líquido (líquido da espinha).

Os indivíduos que aceitarem participar do estudo serão divididos em 5 grupos diferentes, de acordo com os resultados dos exames neuropsicológicos realizados por um neuropiscólogo do Emílio Ribas:

Grupo 1 – Pacientes portadores do vírus HIV com Alteração Neurocognitiva Assintomática (ANI)

Grupo 2 – Pacientes portadores do vírus HIV com Desordem Neurocognitiva leve/moderada (MND)

Grupo 3 – Pacientes portadores do vírus HIV com Demência associada ao HIV (HAD)

Grupo 4 – Pacientes portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 1)

Grupo 5 – Pacientes **não** portadores do vírus HIV sem qualquer alteração neurocognitiva (grupo controle 2)

Para participar deste estudo, serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, local de nascimento, endereço e outros). Estas informações serão mantidas em sigilo, ou seja, o seu nome não será divulgado e as amostras receberão um código para a identificação.

Nesse estudo participarão 150 pacientes em acompanhamento clínico no Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, divididos nos 5 grupos mencionados a cima (serão em média 30 pacientes em cada grupo).

Para participar desse estudo é necessário coleta do líquido da espinha, de sangue e alguns testes neuropsicológicos.

- Coleta do líquido da espinha:

O procedimento é realizado pela Dra. Thereza Mattos, médica especializada em coleta de líquido, de acordo com todas as normas internacionais. Durante o procedimento o (a) senhor (a) será orientado a se deitar de lado, em posição fetal (como um bebê na barriga da mãe). Em seguida a doutora irá desinfetar a pele e introduzir uma agulha descartável que vai passar pelo espaço entre duas vértebras da sua coluna até chegar ao reservatório onde se acumula o líquido. A dor é semelhante a da coleta de sangue. O (a) senhor (a) poderá sentir dor de cabeça algumas horas após a coleta, para evitar que isso aconteça, ao chegar em casa deverá permanecer deitado e em repouso por 24 horas e tomar bastante líquido. Em casos muito raros poderá ocorrer hemorragia ou infecção, porém lembramos que esse procedimento é feito rotineiramente e por uma profissional altamente qualificada. No seu caso, o senhor está sendo convidado a participar desse estudo para sua inclusão no grupo 5 (indivíduos sem o vírus HIV, grupo controle 2). Portanto, a coleta do líquido da espinha já foi feita pelo (a) senhor (a), por indicação do seu médico, para a realização de alguns exames. Foram coletados aproximadamente 7mL do líquido da sua espinha (1 colher de sopa e meia), uma parte desse material foi utilizada para seus exames, a outra parte seria jogada fora. Solicitamos assim, sua autorização para utilizar a parte que seria descartada.

- Coleta de sangue:

A coleta do sangue, 10mL aproximadamente (2 colheres de sopa), será feita com uma agulha esterilizada, limpa, ligada a um tubo de vidro contendo anticoagulante e será colocada em uma veia do seu antebraço, puxando o sangue para dentro do tubo por um processo a vácuo. Esse procedimento pode causar um pequeno sangramento, uma mancha roxa ou vermelha (hematoma) na pele (que desaparecerá em pouco tempo), e em casos muito extremos, desmaio. Mas lembramos que esta coleta será realizada por uma equipe treinada que faz parte do Laboratório do “Instituto de Infectologia Emilio Ribas”. Este procedimento será feito nos cinco grupos de pacientes dessa pesquisa.

- Testes neuropsicológicos:

O (a) senhor (a) passará por alguns testes, feitos por uma psicóloga, que confirmarão que o (a) senhor (a) não possui nenhuma alteração neuropsicológica. Esses testes vão avaliar diversos domínios cognitivos como memória, audição, visão e fala.

Os testes serão aplicados na sala de Neurociências e a duração da avaliação é de no máximo duas horas. Caso seja detectado algum grau de alteração cognitiva, o Sr.(a) será encaminhado para avaliação no ambulatório de Neurologia do nosso serviço.

O (a) senhor (a) não receberá benefício direto por fazer parte deste estudo. As informações obtidas poderão ajudar a outras pessoas que tenham HIV.

O (a) senhor (a) também tem o direito de optar por não participar deste estudo. Caso o (a) senhor (a) decida não participar, isto não afetará em nada quanto ao seu direito em receber tratamento no ambulatório.

Os documentos contendo as suas informações serão guardados em local seguro e somente os pesquisadores responsáveis e o executante terão acesso.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

No caso do participante apresentar alguma consequência grave em decorrência da coleta de sangue, que o imobilize dos seus afazeres diários (desde que seja devidamente comprovado), este deverá acionar o coordenador do estudo e/ou o pesquisador executante para que seja providenciada total assistência e tratamento médico na instituição.

Todos os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Os resultados desse estudo serão informados ao (a) senhor (a) ao término do mesmo.

Caso o (a) senhor (a) tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas através do telefone (11) 3896-1406 ou pelo e-mail: comitedeeticaier@ig.com.br e/ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo através do telefone (11) 3061-8004 ou e-mail: cep.fm@usp.br. O (a) senhor (a) pode entrar em contato com a pesquisadora executante Msc. Ana Carolina S. de Oliveira a qualquer momento no telefone: 3061-8699 ou através do e-mail: anacarolina.soares@usp.br, com a pesquisadora responsável Dra. Camila Romano através do e-mail cmromano@usp.br e/ou com o pesquisador co-responsável Dr. Augusto Penalva através do e-mail: rdcassia@uol.com.br ou pelo telefone (11) 99933-2917. O (a) senhor (a) receberá uma cópia deste termo.

Desde já agradecemos!

Reforçamos que participar deste estudo é um ato inteiramente voluntário. O (a) senhor (a) pode preferir não participar deste estudo ou abandoná-lo em qualquer momento. O (a)

senhor (a) será tratado (a) da mesma forma, independente da sua decisão nós prestaremos todos os serviços clínicos e profissionais de diagnóstico e de laboratório que fizerem parte deste estudo, sem que isso ocorra em custo algum.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que li, ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “DETERMINAÇÃO DE UM PERFIL DE MARCADORES ASSOCIADOS ÀS DESORDENS NEUROCOGNITIVAS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV-1”.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos deste estudo, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ser adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Dados do Paciente/Representante legal

Nome:.....

Assinatura.....

Data:...../...../.....

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

Dados do Responsável que obteve o TCLE

Nome:.....

Assinatura:.....

Data:...../...../.....