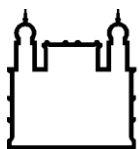


INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Disfunção cognitiva e HIV:
identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce

Rodrigo Teixeira Amâncio

RIO DE JANEIRO
novembro / 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Rodrigo Teixeira Amâncio

Disfunção cognitiva e HIV:
identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Fernando Augusto Bozza

RIO DE JANEIRO
novembro / 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

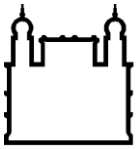
A484 Amâncio, Rodrigo Teixeira

Disfunção cognitiva e HIV: identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce / Rodrigo Teixeira Amâncio. – Rio de Janeiro, 2015. xvii,101 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.
Bibliografia: f. 73-87

1. HIV. 2. Cognição. 3. Biomarcadores. I. Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Rodrigo Teixeira Amâncio

**Disfunção cognitiva e HIV:
identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce**

Orientador: Dr. Fernando Augusto Bozza

Aprovada em: 10/11/2015

Banca examinadora:

Profa. Dra. Adriana Ribeiro Silva - **Presidente**
Prof. Dr. Marco Antonio Sales Dantas de Lima
Profa. Dra. Sandra Wagner Cardoso

Suplentes:

Prof. Dr. André Miguel Japiassu
Profa. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Revisor:

Prof. Dr. Rogério Rogerio Valls de Souza

Rio de Janeiro, 10 de novembro 2015.

Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
essas ficarão.

Carlos Drummond de Andrade

Para Antenor e Bia (*in memoriam*):
eternamente exemplos de
caráter e dedicação.
Saudade e admiração!

Para Lara, meu amor,
pela **imensa** paciência
e apoio constante e incondicional
nesta conturbada jornada!
Sua ajuda é fundamental!
Muito obrigado!

Agradecimentos

Ao Fernando Bozza que ao longo desta jornada se tornou um amigo, por quem tenho profunda admiração! Com uma energia invejável, trabalhar com ele é um privilégio! Muito obrigado pela consideração e pela confiança!

Ao Hugo Caire que me acolheu em seu Laboratório desde o PROVOC, com muita paciência! Um amigo que sempre, com muita sabedoria, sabe dar a *luz* para um caminho mais adequado!

À Patrícia Bozza, pesquisadora exemplar, que inspira a todos que buscam uma carreira científica robusta. Sempre atenciosa e com opiniões contundentes e precisas!

À Dra. Fernanda Moll, por sua colaboração e parceria, sempre com ideias precisas e claras! Sua ajuda foi imprescindível! Muito obrigado por todo apoio e ajuda!

Ao André Miguel Japiassú, amigo e companheiro na jornada, sempre preciso nos ajustes finos das análises! Obrigado pelo apoio! Vamos que vamos!

À Dra. Beatriz Grinsztejn, pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Clínica em DST e AIDS do INI, pela colaboração e pelo apoio no desenho e execução do estudo. Muito obrigado!

Ao Rogério Valls de Souza, amigo e exemplo de Infectologista! Sempre pronto a ajudar! Sua leitura prévia foi imprescindível! Mais uma vez, obrigado!

À Denise Medeiros, amiga e exemplo de profissional! Sempre de bom humor e *para frente*, muito estimulou e ajudou em todo o processo.

Ao Emersom Ciclini Mesquita, amigo e companheiro de Laboratório, com quem compartilhei os momentos de dificuldade desta jornada! Uma figura!

À Rosana Rodrigues, Helena e Beatriz, pela torcida incondicional pela conclusão do trabalho!

Aos membros do Laboratório de Imunofarmacologia (IOC), em especial a Edson Fernandes de Assis, Rachel Novaes Gomes, Rose Branco Rodrigues, Silvío Caetano da Silva Junior, Joana D'ávila, Tatiana Maron, Cassiano Albuquerque, Patrícia Reis, Flora Magno, Mariana Cunha, além de todos os pesquisadores e alunos que compõem o grupo do Lab!

À Dra. Adriana Ribeiro Silva, primeira pessoa que pessoalmente me acolheu na chegada ao Laboratório, no PROVOC, e que aceitou este convite e desafio para ser suplente na banca! Muito obrigado, mesmo!

Às enfermeiras que auxiliaram na inclusão, Cleyde Bié e Maria José Queiroz Alvarenga: sem a ajuda de vocês teria sido impossível!

À Rosângela Vieira Eiras, que com uma super capacidade de organizar o ambulatório do INI, tornou nosso recrutamento bem mais simples.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia do INI, em especial a Sérgio Barbosa (*in memoriam*) e Lúcia Nunes, pelo auxílio no processamento e armazenamento das amostras.

Ao grupo do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções, do INI, especialmente Dr. Marcus Tullius Teixeira da Silva, Dra. Roiza Rodrigues e Raquel Lisboa Oliveira, pela realização da avaliação neurocognitiva, pela parceria e pela colaboração.

Aos profissionais do Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR): Debora Lima, com sua presteza incansável e eficiência nota 1000!; Fernanda Meirelles, pela paciência e cuidado no processamento e análises do DTI; Dra. Andréia Silveira de Souza, imprescindível na reta final!

Ao grupo do Laboratório de Pesquisa Clínica em Terapia Intensiva, Cassia Righy Shinotsuka, Edwiges Motta, Daniel Marinho, e todos os demais membros do grupo, pela torcida e apoio nesta empreitada!

Ao grupo de profissionais do IPEC/INI: médicos, enfermeiros, administrativos e todas as pessoas que contribuem para o excelente funcionamento da Instituição, que me apoiaram e viabilizaram o andamento do estudo.

Ao grupo de médicos do Serviço de DIP do Hospital Federal dos Servidores do Estado, onde fui residente e aprendi a trabalhar com pacientes infectados pelo HIV, especialmente Fernando Passoni e Dra. Clarisse Bressan, amigos de sempre, que estimularam e apoiaram todo este desafio!

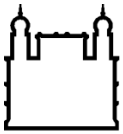
A todo o grupo de funcionários do CTI da Casa de Saúde Santa Lúcia, do qual faço parte, e que tiveram que me cobrir e me *aturar* ao longo deste último ano! Agradecimento especial a Celina Acra e Vicente Dantas, amigos verdadeiros, com quem conto sempre! Tamos juntos!

Pacientes e familiares que participaram deste estudo, acreditando na sua contribuição por uma causa maior.

À Maria Ângela Calvão, pela minuciosa leitura para uma melhor adequação à Língua Portuguesa! Muito obrigado pelo carinho e pela ajuda!

Aos meus familiares, que me apoiaram durante toda a minha vida. A meus pais, Bia e Antenor, exemplos que admiro e sigo, e que sempre influenciaram minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Flávia e Tiago, e a todos da família que sempre apoiaram e torceram para esta jornada: Sérgio, Fernanda, Carolina, Daniel, Luiza, Léa, Clarinha e Cida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Disfunção cognitiva e HIV: i identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce

RESUMO

Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular

Rodrigo Teixeira Amâncio

Após a implementação da Terapia Antirretroviral combinada (TARVc), observou-se uma melhora importante na sobrevivência dos pacientes infectados pelo HIV, trazendo uma maior prevalência de doenças crônico-degenerativas, incluindo as doenças neurológicas. As manifestações neurológicas, denominadas HANDs (*HIV-associated neurocognitive disorders - HAND*), interferem na capacidade laborativa e na sobrevivência dos pacientes infectados pelo HIV. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das HANDs não estão bem estabelecidos, e sua maior compreensão pode impactar num melhor manejo clínico, diagnóstico e terapêutico destes pacientes.

Nosso objetivo foi avaliar as relações entre disfunção cognitiva, resposta inflamatória sistêmica e alterações morfológicas e metabólicas cerebrais em uma população de pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, sem exposição prévia à TARVc.

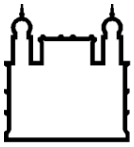
Fizemos um estudo transversal, observacional, no qual selecionamos pacientes infectados pelo HIV em acompanhamento ambulatorial no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ). Os pacientes foram submetidos a uma avaliação neurocognitiva e classificados como normais (N), ou como portadores de alguma alteração cognitiva: déficit cognitivo assintomático (DCA); déficit cognitivo leve (DCL) e demência associada ao HIV (DAH). Além disso, foram coletadas amostras de plasma para dosagem de 37 biomarcadores (inflamatórios e neurodegenerativos); os pacientes foram, também, submetidos a ressonância magnética para avaliação morfológica, espectroscopia e tractografia.

Incluímos 52 pacientes, com mediana de idade de 33 anos (IQR, 25-75: 28 – 43,75), com predomínio do sexo masculino (65%), com mediana da contagem de CD4⁺ de 578 células/mm³ (IQR, 25-75: 432-743). Destes, 31 (59,5%) apresentaram desempenho cognitivo normal (N), 15 (29%) DCL ou DCA, e 6 (11,5%) DAH, sendo, portanto, a prevalência de HANDs de 40,5%.

Comparamos 12 biomarcadores no plasma (pacientes HIV vs não HIV), observamos níveis significativamente maiores nos pacientes infectados pelo HIV em 9 destes: PDGF-BB, IP-10, BDNF, Catapsina D, PAI-1, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, sICAM-1. Comparando os níveis destes biomarcadores entre pacientes infectados pelo HIV (N vs DCA+DCL vs DAH), não observamos diferença significativa. Analisando o parênquima (neuroimagem estrutural), não encontramos alterações que justificassem a ocorrência das HANDs.

Através da espectroscopia, detectamos um aumento na relação MI/NAA (Mio-Inositol/N-acetil-aspartato) no lobo parietal posterior, em pacientes classificados como portadores de DAH. As análises da tractografia evidenciaram alterações de conectividade de substância branca nos pacientes com DAH, no corpo caloso (CC), na coroa radiada do tálamo anterior (esquerda e direita), no trato corticoespinhal (esquerda e direita), fórceps maior e menor, fascículo fronto-occipital inferior (esquerda e direita), e fascículo uncinado (esquerda e direita) ($p < 0,05$).

Dentre os pacientes avaliados, observamos alterações cognitivas sub-diagnosticadas em 40,5% da amostra. Acreditamos que a toxicidade pelo próprio vírus seja o mecanismo mais precoce envolvido na fisiopatologia das HANDs, o que também parece estar relacionado com as alterações de conectividade de substância branca no cérebro desses indivíduos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HIV and cognitive dysfunction: identification of biomarkers for early diagnosis

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

Rodrigo Teixeira Amâncio

After combined antiretroviral therapy (cART) implementation there was a significant improvement on HIV infected patient's survival, which increased the prevalence of chronic degenerative diseases, including neurocognitive diseases. The neurological manifestations, called HANDs (HIV-associated neurocognitive disorders), interfere with work capacity, and survival of HIV infected patients. The mechanisms involved on HANDs development are not well established, and a better understanding can impact directly on clinical management, diagnosis and treatment of those patients.

Our objective was to evaluate the relationship between cognitive dysfunction, systemic inflammatory response and brain morphological and metabolic changes in a population of asymptomatic HIV-infected patients, without prior exposure to cART.

We did a cross-sectional observational study, in which we selected HIV-infected patients in attendance at the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ). After neurocognitive evaluation patients classified as normal (N), or as having some cognitive impairment: asymptomatic neurocognitive impairment (ANI); mild neurocognitive disorder (MND) and HIV associated dementia (HAD). We collected plasma samples to evaluate 37 biomarkers (inflammatory and neurodegenerative). The patients underwent MRI to morphological, spectroscopy and tractography evaluation.

We included 52 patients, median age of 33 years (IQR, 25-75: 28 to 43.75), with a predominantly male (65%), with 578 median CD4⁺ counts (IQR, 25-75: 432-743). Among the patients included 31 (59.5%) presented normal cognitive performance (N), 15 (29%) MND or ANI, and 6 (11.5%) HAD, which is a 40,5% of HANDs prevalence.

Among 37 biomarkers evaluated we analyzed 12 of them, those that were detectable above 75% of sample tested. Comparing 12 biomarkers in plasma (HIV vs non-HIV), we observed levels statistically higher ($p < 0.05$) in HIV patients in 9 of them: PDGF-BB, IP-10, BDNF, Cathepsin D, PAI-1, PDGF-AA, PDGF-AB / BB, RANTES, sICAM-1. We observe no significant difference in biomarkers levels among patients stratified by cognitive evaluation (N + vs ANI+MND vs HAD)

Cerebral parenchyma evaluated by magnetic resonance (structural neuroimaging) we did not observed alteration that could explain the occurrence of HANDs. Analyzing spectroscopy we observed an increase in the ratio MI/NAA (myo-inositol / N-acetyl-aspartate), in posterior parietal lobe in patients classified as HAD. Analyzing tractography data we observed white matter connectivity integrity altered in patients with HAD, in the corpus callosum (CC), in corona radiata of the anterior thalamus (left and right) in costicoespinal tract (left and right), major and minor forceps, fronto-occipital (left and right), and the uncinate fasciculus (left and right) ($p < 0.05$).

Among asymptomatic HIV-infected patients, we observe cognitive changes under diagnosed in 40.5% of our sample. Among the main mechanisms involved in the pathophysiology of HANDs, toxicity by the virus itself seems to be the earliest and most important, which seems to be related to white matter connectivity changes in the brain of patients with HANDs.

Sumário

	Página
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de Figuras e Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
1 Introdução	01
1.1 - A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana	02
1.2 - HIV e Inflamação Sistêmica	03
1.3 - HANDs – <i>HIV - Associated Neurocognitive Disorders</i>	05
1.4 - Epidemiologia das HANDs	06
1.5 - Fisiopatologia das HANDs	07
1.6 - Diagnóstico das HANDs	13
1.7 - Tratamento das HANDs	22
2 Objetivos Geral e Específicos	26
3 Materiais e Métodos	27
3.1 - Aspectos Éticos	27
3.2 - Desenho do estudo	27
3.3 - Critérios de inclusão e exclusão	28
3.4 - Coleta de amostras de plasma e dados clínicos	29
3.5 - Avaliação neurocognitiva	29
3.6 - Dosagem de biomarcadores plasmáticos	32
3.7 - Neuroimagem: aquisição de dados, processamento e análise	33
3.8 - Análise estatística	39
4 Resultados	40
4.1 - Características clínicas dos pacientes incluídos	40
4.2 - Avaliação neurocognitiva	41
4.3 - Dosagem dos biomarcadores plasmáticos	45
4.4 - Avaliação de neuroimagem através de Ressonância Magnética	48
5 Discussão	56
6 Conclusões	72
7 Referências	73

1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE	88
2	Parecer de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa - CEP	90
3	FICHA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DO ESTUDO	91
4	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, específico para a realização de Ressonância Magnética	93
5	Resultados dos testes neurocognitivos dos pacientes infectados pelo HIV na inclusão no estudo	96
6	Percentual de detecção das citocinas pelo sistema multiplex nos grupos analisados	98
7	Concentrações plasmáticas de biomarcadores de controles não HIV e de pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, sem indicação do uso de terapia antirretroviral	99
8	Produção científica durante o Doutorado	101
	a) Amancio RT , Japiassu AM, Gomes RN, Mesquita EC, Assis EF, Medeiros DM, Grinsztejn B, Bozza PT, Castro-Faria Neto HC, Bozza FA. The innate immune response in HIV/AIDS septic shock patients: a comparative study. <i>PLoS One</i> . 2013 Jul 11;8(7):e68730.	
	b) Coelho L, Cardoso SW, Amancio RT , Moreira RI, Campos DP, Veloso VG, Grinsztejn B, Luz PM. Trends in AIDS-defining opportunistic illnesses incidence over 25 years in Rio de Janeiro, Brazil. <i>PLoS One</i> . 2014 Jun 5;9(6):e98666. doi: 10.1371/journal.pone.0098666	
	c) Six-month survival of critically ill patients with HIV-related disease and tuberculosis: a retrospective study Ana Carla Pecego, Rodrigo Teixeira Amancio , Camila Ribeiro, Emersom C Mesquita, Denise M Medeiros, José Cerbino, Beatriz Grinsztejn, Fernando A Bozza and André M Japiassu Submetido à <i>BMC Infectious Diseases</i> : 7 Janeiro 2015	

Lista de Figuras e Tabelas

Figuras		Página
Figura 1.1	Curva metabólica da espectroscopia de prótons de um indivíduo normal.	20
Figura 3.1	RNM anatômica e ponderada em difusão.	36
Figura 3.2	Mapas derivados da Imagem do Tensor de Difusão.	37
Figura 4.1	Distribuição dos pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, agrupados em função da avaliação neurocognitiva.	42
Figura 4.2	Clusters de voxels de pacientes sem exposição prévia ao uso de antirretrovirais, agrupados de acordo com avaliação neurocognitiva (normal – N; Déficit Cognitivo Leve + Déficit Cognitivo Assintomático – DCL/DCA; Demência associada ao HIV - DAH), comparado aos pares de grupos.	54
Tabelas		
Tabela 1.1	Grau de penetração de Antirretrovirais no SNC, denominado <i>CNS Penetration Effectiveness Score</i> (CPE).	24
Tabela 3.1	Testes que compõem a avaliação neurocognitiva, agrupados em função dos domínios avaliados.	30
Tabela 3.2	Critérios de classificação de transtornos neurocognitivos relacionados com o HIV – HANDs.	31
Tabela 4.1	Dados clínicos e demográficos dos pacientes infectados pelo HIV assintomáticos incluídos.	40
Tabela 4.2	Comparação dos resultados dos testes neurocognitivos dos pacientes infectados pelo HIV assintomáticos, agrupados em função da avaliação neurocognitiva: Normal (N); Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA); Demência associada ao HIV (DAH).	43
Tabela 4.3	Concentrações plasmáticas de biomarcadores de pacientes infectados pelo HIV, comparados a um grupo controle de voluntários saudáveis, não HIV.	46
Tabela 4.4	Concentrações plasmáticas de biomarcadores de pacientes sem uso prévio de antiretroviral, agrupados em função da avaliação neurocognitiva: Normal (N); Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA); Demência associada ao HIV (DAH).	47
Tabela 4.5	Classificação de Avaliação do Parênquima, através de técnicas de neuroimagem, por Ressonância Magnética, de pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos.	49
Tabela 4.6	Metabólitos ajustados para creatina, medidos através de espectroscopia, nos lobos frontal e parietal posterior, de pacientes agrupados de acordo com a avaliação neurocognitiva: Normal (N); Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA); Demência associada ao HIV (DAH).	52

Lista de Abreviaturas

¹H-ERM - Espectroscopia de prótons por ressonância magnética

5-LOX - 5-lipoxigenase

AIDS - *Acquired immune deficiency syndrome*

ANI - *asymptomatic neurocognitive impairment*

ANOVA - *analysis of variance*

ARV - Antirretroviral

AZT - Zidovudina

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic fator*)

BHE - Barreira Hematoencefálica

cART - combined Antiretroviral Therapy implementation

CC - Corpo Caloso

CCMHIV - Complexo cognitivo-motor ligado ao HIV

CDA - Complexo Demência-AIDS

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CHARTER - *CNS HIV Antiretroviral Therapy Effects Research*

CMV - Citomegalovírus

CNS - *Central nervous System*

Co - Colina

COX-2 - Ciclooxygenase-2

CPE - *Score de penetração no SNC – (CNS penetration effectiveness score)*

Cr - Creatina

DAH - Paciente portador de demência associada ao HIV

DCA - Paciente portador de Déficit cognitivo assintomático

DCL - Paciente portador de Déficit cognitivo leve

DCMHIV - Declínio cognitivo-motor menor ligado ao HIV

DNA - Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DST - Doenças Sexualmente Transmissíveis

DTI - *Diffusion Tensor Imaging*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EID-HIV - Escala Internacional de Demência pelo HIV

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

FA - Anisotropia Fracional (*Fractional anisotropy*)

FDA - Food and Drug Administration

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

G-CSF - Fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos (*granulocyte colony-stimulating factor*)

GALT - *Gut-associated lymphoid tissue*

glutamina/glutamato

GM-CSF - Fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - GM-CSF)

HAART - Terapia antirretroviral de alta eficácia (*Highly Active AntiRetroviral Therapy*)

HAD - HIV associated dementia

HANDs - *HIV-associated neurocognitive disorders*

HCV - Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C vírus*)

HDS - *HIV Dementia Scale*

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

IHDS - *International HIV Dementia Scale*

IHDS - *The International HIV Dementia Scale*

IL - Interleucina (*interleukin*)

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

IP – Inibidores de Protease

IP-10 - Proteína induzível pelo interferon-gama 10 (*IFN-gamma-inducible protein 10*)

IRIS - *Immune reconstitution inflammatory syndrome*

ITRN - Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos

ITRNN - Inibidor da Transcriptase Reversa Não-Nucleosídeo

LCR - Líquido cefalorraquidiano

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*)

MD - Difusividade Média (Mean Diffusivity)

MI - Mio-Inositol

MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófagos-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 α*)

MIP-1 β - Proteína inflamatória de macrófagos-1 β (*macrophage inflammatory protein-1 β*)

MND - mild neurocognitive disorder

MPO – Mieloperoxidase

MRI - *magnetic resonance imaging*.

N - Pacientes com avaliação neurocognitiva normal; Sem déficit cognitivo

NAA - N-acetil-aspartato

NCAM - Molécula de adesão celular neural (*neural cell adhesion molecule*)

NFL - Neurofilamento de cadeia leve (*Neurofilament light chain protein*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAI-1 - Inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*)

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cells*)

PDGF-AA - Fator de crescimento derivado de plaquetas AA (*Platelet-derived growth factor-AA*)

PDGF-AA/BB - Fator de crescimento derivado de plaquetas AA/BB (*Platelet-derived growth factor-AA/BB*)

PDGF-bb - Fator de crescimento derivado de plaquetas-bb (*Platelet-derived growth factor-bb*)

RANTES - *Regulated on activation normal T Cell expressed and secreted*

RM - Ressonância Magnética

RNA - Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

SBF - Substância Branca Frontal

sICAM-1 - Molécula solúvel de adesão intercelular-1 (*soluble intercellular adhesion molecule-1*)

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SIRI - Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune

SNC - Sistema Nervoso Central

sVCAM-1 - Molécula solúvel vascular de adesão celular 1 (*soluble vascular cell adhesion molecule-1*)

TARVc - Terapia Antirretroviral Combinada

TBSS - *Tract-Based Spatial Statistics*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor- α*)

UNAIDS - *United Nations Programme on HIV/AIDS*

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

WHO - *World Health Organization*

1. Introdução

A infecção pelo HIV permanece como um importante problema de saúde pública global. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que exista um total de 35,3 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (UNAIDS/WHO, 2013, Global Report). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, foram estimados 656.701 casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida até 2012 (Ministério da Saúde, 2012).

A implementação da TARVc (*Highly Active Antiretroviral Therapy* – Terapia Antirretroviral de Alta Eficácia, também denominada de Terapia Antirretroviral Combinada - TARVc) mudou história natural da infecção pelo HIV, em meados de 1996, o que resultou em significativa redução da morbidade e mortalidade da população infectada pelo HIV (Dore e cols., 2002). Como consequência a um melhor controle clínico dos pacientes infectados pelo HIV, novos desafios tem surgido relacionados a um maior risco de ocorrência de doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos, osteoporose, alterações hepáticas, alteração da função renal, além de alteração e perda das funções neurocognitivas (Deeks SG, 2011).

A manifestação neurológica mais frequente na infecção pelo HIV é uma condição crônica, neurodegenerativa, caracterizada por distúrbios cognitivo, motor e comportamental. Atualmente, HAND (*HIV - Associated Neurocognitive Disorders - HANDs*) é terminologia mais aceita, classificando indivíduos de acordo com diferentes graus de distúrbios neurocognitivos (Antinori e cols., 2007). As HANDs são estratificadas em: (1) déficit cognitivo assintomático – DCA; (2) déficit cognitivo leve – DCL; e (3) demência associada ao HIV - DAH. O diagnóstico das HANDs é predominantemente clínico, com metodologias pouco sensíveis, o que muitas vezes torna esta uma condição subdiagnosticada.

A fisiopatologia envolvida na ocorrência das HANDs ainda não está elucidada,

sendo os principais mecanismos propostos: (1) efeito direto do HIV *per se* e neurotoxicidade indireta das próprias proteínas virais; (2) replicação viral persistente no SNC, em função da baixa penetração dos ARVs; (3) infiltração de Linfócitos T CD8⁺ ativados no SNC; (4) neurotoxicidade direta dos próprios ARVs (Jaeger e cols., 2012).

Dessa forma, as HANDs surgem como um conjunto de alterações, de diagnóstico essencialmente clínico, e que não apresentam estratégia terapêutica específica. Neste contexto tornam-se necessários estudos que busquem compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia das HANDs, podendo impactar diretamente num melhor manejo clínico dos pacientes infectados pelo HIV.

1.1 - A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

Os primeiros casos de pacientes portadores de uma síndrome de imunodeficiência adquirida foram descritos a partir de uma série de casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* (atualmente denominado *P. jiroveci*), em homossexuais masculinos em Los Angeles, Califórnia, 1981 (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*, 1981). Apenas em 1987 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou a primeira droga para tratamento da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immune deficiency Virus – HIV*), a Zidovudina (AZT), baseado na diminuição da mortalidade de pacientes infectados pelo HIV sintomáticos (Fischl e cols., 1987). A partir de então foram sucessivamente desenvolvidas e liberadas novas drogas para uso, e, em 1996, foi acrescentada ao esquema antirretroviral a classe dos inibidores de protease (IP), mudando a história natural da doença, e dando origem ao termo HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy – Terapia Antirretroviral de Alta Eficácia*), também chamada de Terapia Antirretroviral Combinada (TARVc).

Atualmente a infecção pelo HIV-1, embora melhor controlada, permanece como um importante problema de saúde pública global. De acordo com a Organização Mundial de

Saúde (OMS), estima-se que exista um total de 35,3 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, com cerca de 70% dos casos concentrados no continente africano (UNAIDS/WHO, 2013, Global Report). Na América Latina, estima-se que existam 1,5 milhões de pessoas infectadas, sendo esta a terceira região em números de casos, estando atrás apenas da África Subsaariana e Sul, e Sudeste da Ásia (UNAIDS/WHO, 2013, Global Report). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, foram estimados 656.701 casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida até 2012 (Ministério da Saúde, 2012).

O uso da TARVc resultou em uma significativa redução da morbidade e mortalidade da população infectada pelo HIV (Dore e cols., 2002), com melhora na qualidade de vida e de sobrevivência (Jaquet A e cols., 2013). Como resultado, novos desafios se apresentam no manejo dos pacientes infectados pelo HIV, associados tanto ao seu envelhecimento, como aos efeitos da exposição prolongada aos antirretrovirais (Deeks, e cols., 2008; De Cock e cols., 2012).

Como consequência, os pacientes infectados pelo HIV apresentam um maior risco de desenvolverem afecções não diretamente associadas ao vírus, como doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos, osteoporose, alterações hepáticas, alteração da função renal, além de alteração e perda das funções neurocognitivas (Deeks SG, 2011).

1.2 - HIV e Inflamação Sistêmica

Um conceito já bem estabelecido é que a progressão da doença causada pelo HIV parece ser, pelo menos em grande parte, mediada por uma depleção de células T CD4⁺ de memória localizadas no trato gastrintestinal (Guadalupe M e cols., 2003; Mattapallil JJ e cols., 2005), cuja recuperação ocorre de maneira mais lenta do que se observa no sangue periférico, até mesmo quando em uso de TARVc (Guadalupe M e cols., 2003; Mehandru S e cols.; 2006). Esta depleção de células T CD4⁺ do epitélio intestinal leva a um aumento da translocação microbiana (Brenchley JM e cols., 2006), e à liberação de

componentes bacterianos na corrente sanguínea destes indivíduos, sendo, então, responsável por um estado pró-inflamatório persistente (Baroncelli S, e cols.; 2009).

Além disso, são descritas alterações do sistema imune adaptativo que compõem um estado denominado imunossenescência (Deeks SG, 2011). Essas alterações incluem: (1) diminuição do potencial regenerativo das células T CD4⁺ de memória (Teixeira L e cols., 2011); (2) aumento da atividade das células T específicas contra Citomegalovírus (CMV), sugerindo atividade de infecção, mesmo que subclínica (Naeger DM e cols., 2010).

Deste modo, a infecção pelo HIV, mesmo que clinicamente controlada, levaria a um estado pró-inflamatório persistente (Nasi M e cols., 2014), responsável pela imunossenescência que, a longo prazo, cursa com o desenvolvimento de doenças com sintomatologia clínica.

O estado pró-inflamatório persistente observado pode interferir e estar relacionado com o desenvolvimento das alterações neurocognitivas. Mediadores pró-inflamatórios, como a Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), que participam das reações de fase aguda (Dinarello, 2000), desempenham papel importante na modulação dos sistemas neural, neuroendócrino e comportamental.

Condições clínicas agudas, que cursam com aumento de mediadores inflamatórios no sistema nervoso central (SNC), geram uma série de sintomas comportamentais e alterações psicológicas que, em conjunto, são denominados "*Sickness Behavior Syndrome*", ou Síndrome do Comportamento Doentio (Dantzer, 2004). Podemos dizer que a exposição a patógenos (vírus, bactérias e parasitas) capazes de ativar a resposta imune aguda resulta em uma liberação aumentada de mediadores inflamatórios, gerando alterações no SNC, que levam a uma diminuição do comportamento exploratório, alteração da percepção da dor, anedonia, além de diminuição das habilidades cognitivas, aprendizagem e memória. Em condições infecciosas agudas, estas alterações que

compõem a “*Sickness Behavior Syndrome*” são de caráter transitório e, muitas vezes, não reconhecidas como condição patológica.

Em condições infecciosas que cursam com quadros clínicos graves com múltiplas disfunções orgânicas, como no caso da sepse bacteriana, é descrita uma disfunção cerebral aguda, conhecida com encefalopatia associada à sepse (Siami S e cols., 2008). Os mecanismos aí envolvidos apresentam disfunções mitocondriais e vasculares, estresse oxidativo, alterações de neurotransmissores, inflamação e morte celular (Bozza FA e cols., 2013).

A neuroinflamação prolongada também é descrita como causa de deterioração cognitiva observada em doenças de evolução crônica, como a Doença de Alzheimer (Griffin WS, 2013). Foi descrito em modelo murino o envolvimento da Interleucina 12 (IL-12), em resposta à proteína Beta Amiloide, no desenvolvimento da Doença de Alzheimer. Nesse modelo, o bloqueio da via de sinalização da IL-12 diminui a produção da proteína Beta Amiloide, podendo, portanto, atenuar o desenvolvimento e o déficit cognitivo na Doença de Alzheimer (Vom Berg J, e cols., 2012).

O HIV é capaz de gerar uma infecção viral crônica, que leva a um aumento da liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos, o que pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios cognitivos nesta população, podendo, portanto, estar associado ao desenvolvimento das HANDs.

1.3 - HANDs – HIV - Associated Neurocognitive Disorders

Dentre as doenças crônico-degenerativas observadas nos pacientes infectados pelo HIV, as alterações cognitivas ocupam um ponto central, pois afetam a qualidade de vida, interferindo, também, na capacidade laborativa e na sobrevivência desta população.

As síndromes neurológicas associadas ao HIV podem ser classificadas em três categorias: doença neurológica primária, onde o próprio vírus é necessário e suficiente

para causar a doença; doença neurológica secundária, ou oportunista, condições em que o HIV interage com outros patógenos, resultando em infecções oportunistas ou tumores; e doença neurológica relacionada ao tratamento, como no caso da Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune (SIRI) (*Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome - IRIS*) (Singer e cols., 2010).

A manifestação neurológica mais frequente na infecção pelo HIV é uma condição crônica, neurodegenerativa, caracterizada por distúrbios cognitivo, motor e comportamental. Diversos nomes foram utilizados para descrever esta síndrome, como o complexo demência-AIDS (CDA), complexo cognitivo-motor ligado ao HIV (CCMHIV), declínio cognitivo-motor menor ligado ao HIV (DCMHIV) (American Academy of Neurology, 1991).

Atualmente, HAND (*HIV - Associated Neurocognitive Disorders - HANDs*) é terminologia mais aceita, classificando indivíduos de acordo com diferentes graus de distúrbios neurocognitivos (Antinori e cols., 2007). As HANDs são estratificadas em: (1) déficit cognitivo assintomático – DCA; (2) déficit cognitivo leve – DCL; e (3) demência associada ao HIV - DAH. Seus critérios diagnósticos incluem: paciente infectado pelo HIV, com comprometimento neurocognitivo, na ausência de condições confundidoras, como infecção oportunista no sistema nervoso central (SNC), neurosífilis, uso de substâncias tóxicas, delirium, distúrbios tóxico-metabólicos, doença psiquiátrica e demência relacionada ao envelhecimento.

1.4 - Epidemiologia das HANDs

A descrição da demência associada ao HIV, apresentação mais severa dentre as HANDs, ocorreu no início da epidemia, em pacientes com contagens de Linfócitos T CD4⁺ abaixo de 200 células/mm³ (Antinori e cols., 2007).

A introdução da TARVc resultou na diminuição de 50% na incidência dos quadros de Demência Associada ao HIV, concomitante ao aumento da incidência das formas mais brandas de apresentação das HANDs (Sacktor e cols., 2001).

Heaton e colaboradores, através do estudo CHARTER (*CNS HIV Antiretroviral Therapy Effects Research*), avaliando uma amostra de 1555 pacientes infectados pelo HIV, observaram uma prevalência de 33% de pacientes com déficit cognitivo assintomático, 12% portadores de déficit cognitivo leve, e apenas 2% com demência associada ao HIV (Heaton RK e cols., 2010). Estes dados demonstram que as formas mais brandas das HANDs (DCL e DCA) vêm se tornando mais frequentes que as formas mais graves (DAH).

Diferenças nas prevalências das formas brandas de disfunção cognitiva podem decorrer da metodologia diagnóstica utilizada; porém, a prevalência das formas leve/moderada é consistentemente maior nos indivíduos infectados pelo HIV do que na população geral (Mind Exchange Working Group. Assessment, diagnosis, and treatment of HIV-associated neurocognitive disorder: a consensus report of the mind exchange program, 2013).

A despeito do impacto da TARVc na redução da prevalência da Demência associada ao HIV, as formas mais brandas das HANDs persistem, e estão associadas à perda da capacidade de desempenhar atividades diárias mais complexas, piora da qualidade de vida, além de maior dificuldade de inserção no mercado de trabalho e pior adesão ao TARVc (Letendre SL e cols., 2010).

1.5 - Fisiopatologia das HANDs

A entrada do HIV no SNC ocorre desde a fase aguda, quando o HIV infecta principalmente macrófagos e micróglia, principalmente através de monócitos infectados (Kaul e cols., 2001). Aparentemente, a infecção pelo HIV nestas células não parece ser

causa suficiente para o início da neurodegeneração; além disso, eventos relacionados à infecção pelo HIV de células do sistema imune periférico parecem exercer papel importante na fisiopatogênese da demência associada ao HIV (Kaul e cols., 2001).

A barreira hematoencefálica também parece ser um componente relevante na penetração do HIV no SNC e na fisiopatogênese das HANDs, e seu comprometimento ocorre precocemente no curso da infecção, durante a fase virêmica, como consequência da circulação do vírus ou de proteínas virais no sangue periférico.

Quimiocinas produzidas por células da micróglia e astrócitos, incluindo o MCP1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*), regulam a migração de células mononucleares infectadas do sangue periférico através da barreira hematoencefálica. Além da quimiotaxia, a migração de células infectadas para o SNC envolve aumento de expressão de moléculas no endotélio vascular (como a VCAM-1, Vascular Cell-Adhesion Molecule-1). Outra via de entrada do HIV no SNC pode ocorrer através de macrófagos infectados, estimulados pela liberação de TNF- α (Kaul M e cols., 2001).

Dessa forma, dentre os principais mecanismos propostos como envolvidos na fisiopatologia das HANDs, podemos enumerar: (1) efeito direto do HIV *per se* e neurotoxicidade indireta das próprias proteínas virais; (2) replicação viral persistente no SNC, em função da baixa penetração dos ARVs; (3) infiltração de Linfócitos T CD8⁺ ativados no SNC; (4) neurotoxicidade direta dos próprios ARVs (Jaeger e cols., 2012).

(1) Efeito direto do HIV *per se* e neurotoxicidade indireta das próprias proteínas virais

Além dos seus efeitos sistêmicos prejudiciais sobre o sistema imunológico, o HIV parece entrar no cérebro logo após o acometimento do sistema imune periférico (Kaul M e cols., 2006). Também faz parte dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das HANDs a ação de proteínas virais (Tat e gp120) e, conseqüentemente, de mediadores

pró-inflamatórios produzidos por células da microglia e macrófagos. Os principais esquemas de TARVc atuam bloqueando as proteases (Inibidores de Protease) e/ou impedindo a ação da transcriptase reversa (Inibidores de Transcriptase Reversa Nucleosídeo e Não Nucleosídeo), de modo que estas drogas não bloqueiam a produção das proteínas virais precoces como Tat, Rev e Nef, denominadas "virotoxins" (Nath, 2002).

No caso da proteína Tat, mesmo sob o uso regular da TARVc e com controle adequado da replicação viral, as células infectadas liberam esta proteína no espaço extracelular, onde parece exercer efeitos neurotóxicos por interação com as células vizinhas (Chauhan e cols., 2003; Li e cols., 2009). Durante a replicação do HIV em astrócitos, Tat é produzida como um produto inicial, tornando astrócitos resistentes ao stress oxidativo, o que os torna um reservatório ideal para a sobrevivência do genoma viral. Pequenas quantidades de Tat são suficientes para causar lesão neuronal excitotóxica que inclui disfunção mitocondrial e morte neuronal. Assim, astrócitos infectados pelo HIV desempenham, provavelmente, um papel crítico na neuropatogênese da infecção pelo HIV (Chauhan A e cols., 2003).

Em modelos experimentais, foi observado que a injeção intracerebroventricular de gp120 aumenta os níveis de IL-1 β , alterando memória de camundongos. No entanto, estes efeitos não são observados quando gp120 desnaturado é administrado em um grupo controle (Pugh e cols., 2000). Ainda utilizando modelos experimentais, no caso ratos transgênicos que expressam em seu genoma proteínas virais (gp120 e Tat), foi possível observar que, mesmo na ausência de replicação viral, esses animais apresentaram níveis mais elevados de mediadores inflamatórios no cérebro (IL-1 β e TNF- α) e de derivados de ácido araquidônico (COX-2 - Ciclooxigenase-2 e 5-LOX - 5-lipoxigenase); por outro lado apresentavam um déficit em fatores neurotróficos como o BDNF (Rao e cols., 2011). Analogamente, esse modelo experimental pode ser comparado

ao dano neurológico que persiste em pacientes infectados pelo HIV, em uso de TARVc, com replicação viral suprimida no sangue periférico, sugerindo que a presença de proteínas estruturais do HIV-1 no SNC se correlaciona com desenvolvimento das HANDs.

(2) Replicação Viral Persistente no Sistema Nervoso Central (SNC)

O uso de TARVc geralmente restaura os níveis de linfócitos T CD4⁺, além de reduzir a viremia para níveis abaixo dos detectáveis pelos métodos convencionais. No entanto, mecanismos ainda não totalmente elucidados são responsáveis por uma viremia residual: manutenção da replicação viral, mesmo a despeito de TARVc, sugerindo uma supressão incompleta da replicação viral; e a liberação de novos vírus a partir de reservatórios estáveis, não alcançados em doses farmacologicamente ativas pelos ARVs disponíveis (Shen e cols., 2008).

Define-se reservatórios como um tipo celular ou localização anatômica em que o vírus persiste como uma cinética de replicação estável, e resultam da capacidade do genoma do HIV-1 se integrar ao genoma das células hospedeiras (Coiras e cols., 2010). Os principais locais anatômicos que funcionam como reservatórios para o HIV são o tecido linfóide associado ao intestino (gut-associated lymphoid tissue - GALT) e o Sistema Nervoso Central (SNC) (Coiras e cols., 2010).

Além do SNC ser um reservatório, muitos esquemas de TARVc apresentam uma baixa penetração através da Barreira Hematoencefálica (BHE), o que dificulta a manutenção de níveis terapêuticos destas drogas no cérebro. Além disso, já foi demonstrado que uma baixa aderência à TARVc, com níveis subterapêuticos dos ARVs, está relacionada com o desenvolvimento de resistência do HIV (Sethi AK, e cols., 2003). Assim, o SNC pode ser um local que propicie o desenvolvimento de cepas resistentes, por ter um alcance limitado dos ARVs.

Airoldi e colaboradores não observaram diferenças entre os níveis de RNA viral do HIV no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com e sem HANDs. No entanto, concentrações aumentadas de MIP-1 β e IL-6 no LCR foram observadas no LCR de pacientes com diagnóstico de HANDs. A introdução de TARVc levou a uma redução significativa dos níveis de RNA viral no líquido, porém não resultou em redução de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando que, provavelmente, embora reduzida, a replicação viral não tenha sido totalmente suprimida (Airoldi e cols., 2012).

(3) Infiltração do SNC por monócitos infectados e por Linfócitos T CD8 ativados

Monócitos infectados pelo HIV possuem maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, quando comparados com monócitos não infectados (Persidsky e cols., 1999), e de se tornarem macrófagos perivasculares de longa duração, persistentemente infectados. Diferentes populações celulares do SNC podem ser infectadas pelo HIV, incluindo células da glia como micróglia, astrócitos, células endoteliais e do plexo coroide (Wiley CA, e cols., 1986). Como os neurônios e oligodendrócitos são raramente infectados pelo HIV, os mecanismos indiretos são aceitos na fisiopatogênese dos danos neuronais (Kaul M, e cols., 2006).

Os mecanismos do hospedeiro para o controle da replicação viral no SNC não estão completamente compreendidos; no entanto, modelos animais indicam que as células T CD8⁺ entram no SNC, no início do curso da infecção, onde persistem em um estado hiperativado (Marcondes e cols., 2001; Marcondes e cols., 2007). Estas células T, cronicamente ativadas, podem contribuir para o desenvolvimento de alterações neurodegenerativas, tanto por efeito citotóxico direto gerado pela morte de células infectadas no SNC, como através de mecanismos indiretos.

(4) Neurotoxicidade direta pelos antirretrovirais (ARV)

Atualmente é reconhecido que a função neurocognitiva melhora em pacientes infectados pelo HIV com a introdução da TARVc (Robertson KR, e cols., 2004; McCutchan JA, e cols., 2007). Embora os ARVs propiciem um controle adequado na replicação viral plasmática, não apresentam a mesma eficácia no SNC. A busca por esquemas antirretrovirais com maior penetração no SNC podem estar associados a um risco aumentado de neurotoxicidade por essas drogas.

Dentre as classes de antirretrovirais, os Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos (ITRNs) podem causar dano axonal, através da indução de lesão mitocondrial e rearranjo de microtúbulos (Robinson e cols., 2007) e aumentar o estresse oxidativo, induzindo toxicidade (Opii WO e cols., 2007).

Já na classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeo (ITRNN), o Efavirenz, um fármaco amplamente utilizado e definido como droga de primeira linha para o tratamento de pessoas infectadas pelo HIV (Ministério da Saúde, Brasil, 2013), foi associado à ocorrência de efeitos secundários neurológicos em mais de 50% dos pacientes (Staszewski S e cols., 1999). No entanto, recentemente, uma revisão sistemática demonstrou que o risco de deterioração cognitiva secundária ao uso do Efavirenz é reduzido. Além disso, os autores demonstraram que esta droga é comparável aos outros ARVs na capacidade de restaurar as alterações neurocognitivas (Declodt, EH, e cols., 2013).

Robertson e colaboradores avaliaram 15 antirretrovirais, *in vitro*, quanto ao dano neuronal, e observaram que as drogas que teriam maior efeito neurotóxico seriam Abacavir, Efavirenz, Etravirina, Nevaripina, e Atazanavir, enquanto os menores efeitos neurotóxicos seriam encontrados com Darunavir, Entricitabina, Tenofovir e Maraviroque (Robertson K e cols., 2012).

Este mesmo grupo avaliou os efeitos da interrupção da TARVc sobre a capacidade cognitiva, e observou melhora do quadro neurocognitivo após a interrupção dos antirretrovirais, sugerindo que a toxicidade das próprias drogas participassem do declínio cognitivo na população analisada (Robertson e cols., 2010).

Contudo, embora o uso dos antirretrovirais possa ter algum grau de toxicidade ao SNC, conforme descrito, já foi demonstrado que pacientes infectados pelo HIV, que interromperam seu uso, apresentaram aumento da prevalência de disfunção cognitiva (Muñoz-Moreno JA, e cols., 2010). Deste modo, embora o uso de ARVs não seja capaz de reverter integralmente as alterações neurocognitivas associadas ao HIV (Joska JA e cols., 2010), o seu uso traz benefícios na função cognitiva destes pacientes.

1.6 - Diagnóstico de HAND

(1) Diagnóstico Clínico

O diagnóstico das alterações neurocognitivas associadas ao HIV é predominantemente clínico e, por isso, suas formas mais brandas de apresentação (DCL e DCA) são, muitas vezes, subdiagnosticadas.

As principais ferramentas disponíveis para o rastreio das HANDs são: (1) *HIV Dementia Scale (HDS)* (Power C, e cols., 1995; Bottiggi KA e cols., 2007; Morgan EE e cols., 2008); (2) *The International HIV Dementia Scale (IHDS)* (Sacktor NC e cols., 2005; Njamnshi AK e cols., 2008); (3) *Total Recall Measure of the Hopkins Verbal Learning Test– Revised* (Carey CL e cols., 2004); (4) *Grooved Pegboard Test* (Carey CL e cols., 2004); (5) *Executive Interview* (Berghuis JP, e cols., 1999) e (6) *Cognitive Functional status subscale of the The Medical Outcomes Study HIV (MOS-HIV)* (Knippels HM e cols., 2002). Estas ferramentas subestimam a real prevalência das HANDs, principalmente por apresentarem uma baixa sensibilidade para as formas mais brandas de déficits neurocognitivos (Mind Exchange Working Group, 2007).

Uma avaliação neuropsicológica ampla é o padrão aceito para a avaliação das HANDs, e deve incluir uma bateria de testes de, pelo menos, cinco de seis domínios neurocognitivos: verbal/linguagem, atenção/memória de trabalho, abstração/função executiva, aprendizagem, velocidade de processamento de informação, e habilidade motora (Antinori A, e cols., 2007). Para isto, utilizam-se instrumentos validados e padronizados para o diagnóstico das HANDs, aplicados e interpretados por profissionais qualificados.

A atual recomendação do Ministério da Saúde do Brasil é semelhante às da Sociedade Europeia (European AIDS Clinical Society, 2015), onde a avaliação da presença das HANDs se dá pela testagem de, no mínimo, três esferas cognitivas no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV: memória, lentificação psicomotora e atenção. É também recomendado que esta avaliação seja repetida anualmente em pacientes com fatores de risco para a ocorrência das HANDs, como: nadir de células CD4⁺, ou contagem atual de CD4⁺ abaixo de 350 células/mm³; idade superior a 50 anos; coinfeção pelo vírus da hepatite C; diabetes ou resistência à insulina; doença cardiovascular e baixo nível de escolaridade (Ministério da Saúde, 2013).

Podemos observar que, embora ao longo dos últimos anos tenha havido um maior esforço para o diagnóstico, principalmente das mais precoces, o que existe disponível são ferramentas de investigação clínica. As metodologias utilizadas são pouco sensíveis, o que faz com as HANDs sejam condições subdiagnosticadas.

(2) Biomarcadores

A própria infecção pelo HIV é capaz de deflagrar a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas, e foi demonstrado que, já na infecção aguda, citocinas plasmáticas seriam capazes de prever o prognóstico a longo prazo e evolução da doença causada pelo vírus (Roberts L e cols., 2010). Estudos avaliando biomarcadores

em pacientes infectados pelo HIV demonstraram que estes podem ser utilizados como preditores de risco cardiovascular, de progressão da doença, e de prognóstico quando frente a um quadro infeccioso (Schleicher e cols., 2005; Lau e cols., 2006; Kuller e cols., 2008; Ross e cols., 2009).

A busca por biomarcadores associados ao diagnóstico e desenvolvimento das HANDs é de fundamental importância para a compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos, além de poder incrementar com maior sensibilidade e especificidade o já existente arsenal diagnóstico e de evolução prognóstica das HANDs, atualmente limitado a critérios clínicos e sindrômicos de baixa sensibilidade e especificidade limitada.

A maioria dos biomarcadores avaliados no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes infectados pelo HIV em estudos de HANDs pode ser agrupada em três categorias: viral, imunes e marcadores neurais. Como protótipo de marcador viral, podemos citar o RNA do HIV, que indica infecção ativa no SNC; como marcador neural, o neurofilamento de cadeia leve (NFL – *Neurofilament light chain protein*) que, quando detectado, indica a ocorrência de injúria axonal, porém sem definir o agente causal; o MCP1 seria o marcador imune que, quando detectado, indica imunoativação intratecal, representando um mediador de lesão do SNC pelo HIV (Adaptado de Price RW e cols., 2007).

Neopterin e a proteína neurofilamentosa (NFL) no LCR podem servir como ferramentas úteis no monitoramento de acometimento do SNC na infecção pelo HIV-1, contribuindo para o diagnóstico das HANDs, e também para a avaliação da eficácia da terapia antirretroviral no SNC (Mellgren A e cols., 2007; Hagberg L e cols., 2010).

Um dos problemas encontrados na avaliação de biomarcadores no líquido LCR de pacientes infectados pelo HIV foi a escolha de uma abordagem baseada em um único marcador, com intuito de suprir a dificuldade diagnóstica (Price RW e cols., 2007). No entanto, em função dos diversos mecanismos envolvidos na patogênese das HANDs, a

escolha de um painel, ou combinação de biomarcadores no LCR, parece ser uma estratégia mais adequada na busca de uma ferramenta diagnóstica (Gisslen M e cols., 2007).

Yuan e colaboradores (2013), avaliando o LCR de indivíduos infectados pelo HIV, com e sem déficit cognitivo, observaram que níveis elevados de Interleucina-8 (IL-8), MCP1, GCS-F e *Interferon-inducible protein-10* (IP-10) estão associados à presença de disfunção cognitiva, e sugeriram que uma composição que funcione como um painel de biomarcadores possa auxiliar no diagnóstico das HANDs (Yuan L, e cols., 2013).

Em relação aos biomarcadores plasmáticos, o estado pró-inflamatório desencadeado por processos patológicos apresenta efeitos negativos sobre a função cognitiva (Reichenberg e cols., 2001). Por questões de facilidade técnica e aplicação prática, seria extremamente vantajoso desenvolver um biomarcador dosado em sangue periférico que pudesse refletir e auxiliar na definição prognóstica das disfunções neurocognitivas dos pacientes infectados pelo HIV.

Na era pré-TARVc a contagem plasmática de células CD4⁺ e a quantificação do RNA Viral foram usadas como importantes marcadores e preditores das HANDs, sendo, ainda hoje, a contagem do nadir de CD4⁺ um importante marcador de risco de desenvolvimento de HANDs (Cysique Lae cols., 2004; Robertson KR e cols., 2007; Heaton RK e cols., 2011). A mensuração do HIV-RNA plasmático como preditor de HANDs parece ser uma ferramenta pouco útil, principalmente em função de uma frequente dissociação entre viremia e a infecção/replicação viral no SNC. No entanto, foi demonstrado que níveis mais elevados de DNA viral genômico extraído de células mononucleares periféricas (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMC) estiveram relacionados ao diagnóstico de demência associada ao HIV (Shiramizu B e cols., 2005).

O aumento nos níveis plasmáticos de CD14 solúvel (sCD14), um marcador de ativação monocítica, foi associado à ocorrência de HANDs, principalmente em pacientes

com doença avançada e HIV-RNA detectável no plasma; no entanto, a mesma associação não foi observada em pacientes com HIV-RNA abaixo do limite de detecção (Ryan LA, e cols., 2011; Lyons JL e cols., 2011; Kamat A e cols., 2012),

Cohen e colaboradores observaram que a elevação plasmática de IP-10 se associou à ocorrência de alterações cognitivas em pacientes infectados pelo HIV (Cohen RA e cols., 2011). Estes mesmos autores sugerem, porém, a importância de se pesquisar não apenas biomarcadores isolados, mas um conjunto de biomarcadores, como um possível método que auxilie no diagnóstico das HANDs (Cohen RA e cols., 2011).

Deste modo, embora tenhamos avançado na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatogênese das HANDs, e incluindo a participação de múltiplos mediadores inflamatórios neste processo, ainda não se tem conhecimento de um biomarcador capaz de diagnosticar e estratificar, de maneira precisa e confiável, as alterações cognitivas nos pacientes infectados pelo HIV.

(3) Neuroimagem

Ainda não existem métodos diagnósticos disponíveis, com alta sensibilidade e especificidade, para detecção precoce das alterações cognitivas nos pacientes infectados pelo HIV; o diagnóstico ainda é feito através de avaliações clínicas. Os avanços das técnicas de Ressonância Magnética permitem um maior entendimento dos correlatos anatômicos e funcionais do cérebro *in vivo*, o que pode auxiliar no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes portadores de patologias neurológicas. Neste contexto, as técnicas de neuroimagem, principalmente relacionadas à Ressonância Magnética, surgem como uma alternativa possível para o diagnóstico das HANDs (Masters MC e Ances BM, 2014).

Ressonância Magnética (RM): Neuroimagem estrutural

A ressonância magnética estrutural cumpre um papel fundamental na análise anatômica do encéfalo no contexto dos distúrbios cognitivos, não apenas dando subsídios para o diagnóstico de HANDs, mas também permitindo descartar os possíveis diagnósticos diferenciais que determinem perda cognitiva, tais como processos expansivos tumorais, vasculares ou quadros inflamatórios /infecciosos.

Em períodos anteriores ao da Terapia Antirretroviral Combinada (TARVc), como logo após sua implementação, há relatos de perda volumétrica dos gânglios da base, do córtex posterior e na substância branca como um todo, nos pacientes infectados pelo HIV, quando comparados com pacientes não HIV (Aylward EH, e cols., 1993; Heindel WC, e cols., 1994; Dewey J, e cols., 2010).

Bonnet e colaboradores avaliaram uma coorte de 400 pacientes infectados pelo HIV e relataram presença de atrofia de substância cinzenta já nos estágios iniciais da doença (Bonnet F e cols., 2013). A atrofia cerebral (substâncias branca e cinzenta) já foi demonstrada anteriormente por Stout e colaboradores no paciente infectado pelo HIV, identificada nos estágios iniciais da doença, e apresentando evolução com o avançar da infecção pelo vírus (Stout JC, e cols., 1998).

Podemos, portanto, dizer que as análises volumétricas podem apresentar alterações já em estágios precoces, bem como ao longo da progressão da doença pelo HIV.

Ressonância Magnética: Espectroscopia de prótons (¹H-ERM)

A espectroscopia de prótons por RM proporciona a análise bioquímica não invasiva do tecido cerebral, *in vivo*, com avaliação qualitativa e quantitativa de vários metabólitos cerebrais:

- **N-acetilaspartato (NAA)** – marcador presente apenas nos neurônios, refletindo viabilidade, densidade e funcionalidade neuronal, não sendo encontrado nas células

gliais. Apresenta maior concentração no córtex cerebral, em comparação à substância branca (Kwo-On-Yuen PF e cols., 1994; Schuff N e cols., 1999);

- **Creatina + Fosfocreatina (Cr)** – reflete o metabolismo energético das células cerebrais, espelhando a saúde da utilização e armazenamento da energia sistêmica. É considerado metabólito de referência individual para quantificar outros metabólitos do parênquima cerebral, já que seus níveis permanecem estáveis em diversas situações patológicas;

- **Glutamina + Glutamato (Glx)** – Glutamina: marcador astrocitário; Glutamato: neurotransmissor;

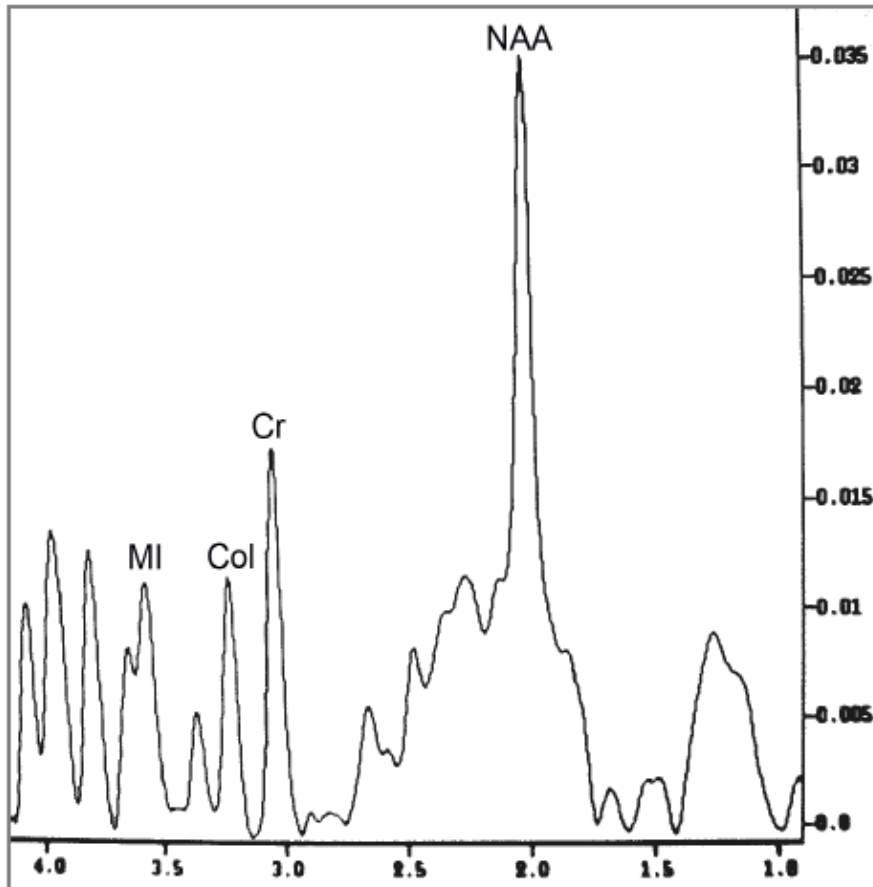
- **Mioinositol (MI)** – quase exclusivamente observado nas células gliais, onde funciona como um importante osmólito; também é um precursor da mielina, e pode servir como um agente desintoxicante no cérebro e no fígado;

- **Compostos colina associados (Col)** – é um precursor limitante da síntese da acetilcolina; precursor da fosfatidilcolina das membranas celulares. É considerado um marcador da quebra e reparação das membranas celulares.

Uma das vantagens da ERM reside na possibilidade de se quantificar a perda e/ou dano neuronal reversível através da mensuração do NAA, mesmo quando a ressonância magnética estrutural ainda é normal (Shonk TK, e cols., 1995; Ross BD, e cols., 1997; Firbank MJ, e cols., 2002), podendo revelar, por exemplo, despovoamento neuronal (diminuição dos níveis de NAA) em relação ao tecido normal em casos de demência (Rudkin & Arnold, 1999).

A Figura 1.1 demonstra os principais metabólitos observados na ¹H-ERM (Castillo M e cols., 1996; Ross RD e cols., 1997).

Figura 1.1: Curva metabólica da espectroscopia de prótons de um indivíduo normal. A distribuição dos diferentes metabólitos é observada ao longo do eixo x (dispersão química, em partes por milhão – ppm), demonstrando os seguintes metabólitos: NAA (2.02 ppm), Cr (3.0 ppm), Col (3.2 ppm) e MI (3.56 ppm). A amplitude de cada pico metabólito é definida no eixo y (unidades arbitrárias de intensidade) (Adaptado de Castillo M e col., 1996; Ross RD e cols., 1997).



Em relação ao HIV, a ERM é um consistente método de neuroimagem utilizado antes e após a implementação da TARVc. Chang e colaboradores, avaliando uma coorte de pacientes nunca antes expostos à TARVc, observaram níveis elevados de mioinositol e colina na substância branca do lobo frontal, e diminuição dos níveis de creatina nos gânglios da base. Este achado foi associado à gravidade da demência (Chang L, e cols., 2002).

Sailasuta e colaboradores, avaliando uma população com infecção recente/aguda pelo HIV, observaram níveis elevados de colina nos gânglios da base de indivíduos infectados, quando comparados a controles não HIV, e a pacientes com infecção crônica. Além disto, neste mesmo estudo foi observada a reversão desta elevação após a implementação da TARVc (Sailasuta N, e cols., 2012).

Deste modo, a espectroscopia por RM parece ser uma ferramenta valiosa no auxílio diagnóstico de quadros de alterações cognitivas, e também uma maneira de se avaliar a resposta ao tratamento de pacientes infectados pelo HIV, podendo, portanto, ser esta uma metodologia importante no manejo dos pacientes com HANDs.

Ressonância Magnética: DTI – *Diffusion Tensor Imaging*

O *Diffusion Tensor Imaging*, DTI, é um método mais recente e promissor na avaliação e caracterização microestrutural, cada vez mais utilizado para a avaliação da integridade de substância branca (Alexander AL, e cols., 2007).

A avaliação da integridade da substância branca de pacientes infectados pelo HIV foi realizada por uma série de autores (Li C, e cols.; 2011; Tate DF, e cols, 2011; Towgood KJ, e cols., 2012). Em sua maioria, estudos utilizando DTI demonstraram que a infecção pelo HIV leva a um aumento da Difusividade Média (*Mean Diffusivity* - MD) e a uma diminuição da Anisotropia Fracional (*Fractional Anisotropy* – FA) na avaliação dos tratos da substância branca, incluindo o corpo caloso e substância semioval (Hoare J, e cols., 2012; Stubbe-Drger B, e cols., 2012; Du H, e cols., 2012; Zhu T, e cols., 2013), com discretas diferenças de localização da referida alteração, de acordo com cada estudo. Esta técnica foi aplicada por Gongvatana e colaboradores, que evidenciaram aumento de MD e diminuição de FA em todo o cérebro de pacientes infectados pelo HIV, quando comparados a um grupo de voluntários não HIV (Gongvatana A e cols., 2011).

Alguns estudos avaliaram o efeito dos antirretrovirais sobre os parâmetros do DTI; porém, os resultados encontrados carecem de robustez (uso de controles não comparáveis e resultados controversos) (Pfefferbaum A e cols., 2009; Chen Y e cols., 2009; Wright PW e cols.; 2012).

Deste modo, podemos dizer que o DTI é, atualmente, o método mais sensível para detecção de alterações de substância branca. Dados anatômicos conferidos por técnicas quantitativas avançadas de RM podem ser correlacionados a funções específicas do cérebro, como em testes motores ou cognitivos. Estas técnicas poderão ser empregadas para uma maior compreensão das alterações neurocognitivas dos pacientes infectados pelo HIV, buscando correlações entre achados clínicos, radiológicos e laboratoriais (CD4⁺, RNA viral e citocinas inflamatórias).

1.7 - Tratamento das HANDs

Atualmente o uso da TARVc é a melhor opção terapêutica disponível para os pacientes infectados pelo HIV e, por conseguinte, o mais indicado para controlar, ou retardar, o desenvolvimento das HANDs. Já foi demonstrado que a TARVc é capaz de diminuir a prevalência de alterações cognitivas, 19% vs. 16%, resultando em um aumento relativo das formas mais brandas, classificadas como assintomáticas, 25% vs. 36% (Heaton RK e cols., 2011). No entanto, o uso da TARVc não é suficientemente capaz de prevenir o desenvolvimento e progressão dos danos neurocognitivos nesses pacientes (Letendre SL, e cols., 2010).

Whitehead e colaboradores avaliaram o neurodesenvolvimento de crianças expostas à infecção pelo HIV, o que permitiu observar que estas apresentam um pior desempenho cognitivo do que aquelas não HIV e que, mesmo após a introdução da TARVc, estas crianças persistem com pior desempenho cognitivo (Whitehead N e cols., 2014). Estes dados sugerem que a TARVc pode evitar atrasos no desenvolvimento cognitivo; no entanto, seu uso não reverte completamente o dano neurológico já presente

antes de sua implementação. Estes achados corroboram os conceitos atuais de um início cada vez mais precoce da TARVc, após o diagnóstico da infecção pelo HIV.

As drogas antirretrovirais atualmente disponíveis apresentam diferentes graus de penetração no SNC. A baixa penetração da TARVc no SNC resulta em controle inadequado da replicação viral neste local (Edén A e cols., 2010), contribuindo para o desenvolvimento das HANDs. Deste modo, mesmo os pacientes que apresentam supressão viral plasmática prolongada, em função do uso da TARVc, estão expostos à ocorrência das HANDs (Simioni e cols., 2010).

Letendre e colaboradores, junto com o *CHARTER group (CNS HIV Antiviral Therapy Effects Research)*, propuseram em 2008, uma pontuação (*score*) que possibilita classificar os esquemas de antirretrovirais em uso, em função da capacidade destes em penetrar o SNC (Letendre S, e cols., 2008). O referido *score* é denominado *CNS penetration effectiveness (CPE)*, resumido na Tabela 1.1. Esta estratégia é uma tentativa de se atingir uma maior supressão viral no SNC (Cuisini A e cols., 2013).

Tabela 1.1: Grau de penetração de Antirretrovirais no SNC, denominado *CNS Penetration Effectiveness Score (CPE)* (Letendre SL e cols., 2010)

<i>CNS Penetration Effectiveness Score (CPE)</i>	4	3	2	1
Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos (ITRN)	Zidovudina	Abacavir Entricitabina	Didanosina Lamivudina Estavudina	Tenofovir
Inibidores da Transcriptase Reversa Não-nucleosídeos (ITRN)	Nevirapina	Delavirdina Efavirenz	Etravirina	
Inibidores de Protease (IP)	Indinavir/r	Darunavir/r Fosamprenavir/r Indinavir Lopinavir/r	Atazanavir Atazanavir/r Fosamprenavir/r	Nelfinavir Ritonavir Saquinavir/r Tipranavir/r
Inibidores de Fusão/Inibidores de Entrada		Maraviroque		Enfuvirtida
Inibidores de Integrase		Raltegravir		

CNS = Central Nervous System; r = Potencializado com Ritonavir

Quanto maior a pontuação no esquema, maior a penetração dos ARVs ao SNC.

Posteriormente foi demonstrado que o uso de esquemas de antirretrovirais com um corte (*cutoff*) de 7 pontos, ou seja, que pontuem no escore mais de 7 pontos (escore >7), estiveram associados a uma menor incidência de HIV-RNA detectável no LCR (Letendre S, e cols., 2010). Por um outro lado, a utilização de TARVc guiada pelo CPE não levou à melhora na disfunção cognitiva, instalada anteriormente à implementação da TARVc (Marra CM e cols., 2009). Dessa forma, as evidências são insuficientes para que o CPE seja formalmente indicado para a escolha de um esquema antirretroviral; no entanto, é recomendável que seu uso seja considerado.

Evidências recentes sugerem o início precoce de TARVc em todos os pacientes infectados pelo HIV, a despeito de suas contagens de células CD4⁺ (INSIGHT START Study Group e cols., 2105; Lodi S, e cols., 2015). Esta estratégia possivelmente poderá promover redução da resposta inflamatória persistente, que parece estar relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neoplasias, doenças metabólicas, e também das HANDs.

As HANDs – *HIV - Associated Neurocognitive Disorders* – surgem como um conjunto de alterações, de diagnóstico essencialmente clínico, composto por critérios subjetivos, e que também não apresentam uma estratégia terapêutica específica. Neste contexto tornam-se necessários estudos que busquem uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia das HANDs, bem como estratégias para o reconhecimento precoce do acometimento neurocognitivo, o que pode impactar num melhor manejo clínico, diagnóstico e terapêutico dos pacientes infectados pelo HIV.

2. Objetivos geral e específicos

Objetivo geral

Avaliar as relações entre disfunção cognitiva, resposta inflamatória sistêmica e alterações morfológicas e metabólicas cerebrais em uma população de pacientes infectados pelo HIV, não SIDA, sem exposição prévia à TARVc, visando à identificação de biomarcadores diagnósticos e prognósticos da disfunção cognitiva nesta população.

Objetivos específicos

- Descrever a frequência de alterações neurocognitivas em pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos.
- Quantificar as concentrações plasmáticas de biomarcadores inflamatórios e neurodegenerativos, e correlacionar seus níveis com achados neurocognitivos.
- Relacionar o grau de comprometimento neurocognitivo com a presença alterações morfológicas, metabólicas e de conectividade por neurimagem.

3. Materiais e métodos

3.1 - Aspectos éticos

Este estudo foi realizado em acordo com a Declaração de Helsinque. Foi obtido Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), por escrito, de todos os voluntários, antes que qualquer procedimento relativo ao estudo fosse realizado. O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas aprovou o protocolo de estudo (CAAE 0040.0.009.000-09) (Anexo 2). Os pacientes que se recusaram a participar, ou que, por algum critério, foram excluídos, não foram prejudicados pela não participação do estudo.

3.2 - Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, observacional, no qual selecionamos, por conveniência, dentre os cerca de 2.000 pacientes infectados pelo HIV, em acompanhamento ambulatorial no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ Rio de Janeiro/RJ), um grupo de pacientes que não apresentavam nenhum sintoma relacionado à infecção pelo HIV e não faziam uso de antirretrovirais, pois não tinham indicação de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde vigentes na ocasião (Ministério da Saúde, Brasil, 2008).

Após a inclusão, os pacientes foram submetidos a avaliação neurocognitiva, a avaliação de imagem do encéfalo por RNM e tiveram amostra de plasma coletada. Estes procedimentos, detalhados a seguir, foram realizados dentro de um período máximo de 15 dias, desde a inclusão no estudo.

3.3 - Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

- Ter infecção pelo HIV comprovada, de acordo com os critérios do Programa Nacional de DST e AIDS - Programa Nacional de DST e AIDS (Ministério da Saúde, Brasil, 2008), assintomáticos.

Foram considerados assintomáticos os pacientes que não apresentavam queixas e/ou sintomas detectáveis pela avaliação médica regular, realizada pelo Infectologista, nem na inclusão, nem em relatos prévios.

- Idade maior ou igual a 18 anos.

- Ter compreendido, concordado e assinado, espontaneamente, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão

- O paciente ser portador de doenças psiquiátricas ou neurológicas. Esta informação foi obtida através de questionamento ao paciente e/ou a partir de informações contidas no prontuário.

- Relato verbal e/ou no prontuário de uso de substâncias psicoativas nas últimas seis semanas; usuários ativos de drogas, incluindo história de ingestão abusiva de bebidas alcoólicas.

- Uso prévio de antirretrovirais.

- Infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV).

Além dos pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, incluiu-se, como controle das análises dos biomarcadores plasmáticos, um grupo de voluntários saudáveis (n=8), não HIV, pareados por sexo e idade.

3.4 - Coleta de amostras de plasma e dados clínicos

Após a assinatura do TCLE, os pacientes e os controles incluídos tiveram amostras de sangue colhidas (10ml) através de punção venosa. As amostras de plasma (citrato) e de sangue total (EDTA) foram divididas em alíquotas para análises posteriores, e armazenadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunofarmacologia no Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

As variáveis demográficas dos pacientes incluídos - clínicas e laboratoriais - foram coletadas através de entrevista, e complementados por consulta ao sistema de prontuário eletrônico do INI, conforme formulário padrão (Anexo 3). O prontuário eletrônico do INI nos permite a visualização de consultas médicas e de exames laboratoriais realizados ambulatorialmente. Consideramos o valor da contagem de linfócitos TCD4⁺ o mais próximo da inclusão.

3.5 - Avaliação neurocognitiva

Os pacientes infectados pelo HIV foram submetidos a uma bateria de testes aplicados por um Neurologista especialista em avaliação neurocognitiva, que incluiu: Teste de Substituição Dígitos-Símbolos (*Digit Symbol Test* - DS) (Sheridan LK e cols., 2006), Testes de Trilhas Parte (A e B) *Trail making test A/B* (TRAIL A e B) (Strauss E, e cols., 2000), Prancha de Pinos Chanfrados (*Grooved Pegboard*) com a mão dominante (GPM D) e com a mão não dominante (GPM ND) (Power C e cols., 1995), *Rey auditory verbal learning test* 1 e 2 (RAVLT/REV 1 e 2), (Schoenberg MR e cols., 2006) e teste de Fluência Verbal (FV) (Gladsjo, JA e cols., 1999) e a Escala Internacional de Demência em HIV (*International HIV Dementia Scale* - HIDS) (Sacktor NC e cols., 2005).

Utilizamos como controle (padrão de normalidade) um banco de dados de voluntários (n=120), pareados por sexo, gênero e escolaridade, aplicados pelo mesmo Neurologista (Rodrigues RA, e cols., 2013).

A avaliação neurocognitiva contemplou seis domínios da cognição: atenção e velocidade de processamento de informação, coordenação motora, memória, linguagem, funções visuespaciais/visuoconstrutivas e habilidade motora. Na Tabela 3.1, seguem os testes que compõem a avaliação neurocognitiva, agrupados em função dos domínios avaliados.

Tabela 3.1: Avaliação neurocognitiva, agrupados em função dos domínios avaliados

Velocidade de Processamento de Informação e Atenção

- Teste de Substituição Dígitos-Símbolos (*Digit Symbol Test - DS*)

(Sheridan, L.K., e cols.; 2006)

- Testes de Trilhas Parte (A e B) *Trail making test A/B* (TRAIL A e B)

(Strauss, E., e cols., 2000)

Coordenação Motora

- Teste da Prancha de Pinos Chanfrados (*Grooved Pegboard*)

(Power, C., e cols., 1995)

Memória

- *Rey auditory verbal learning test 1 e 2* (RAVLT/REV 1 e 2)

(Schoenberg, M.R., e cols., 2006)

Linguagem

- Fluência Verbal (FV)

(Gladsjo, J.A., e cols., 1999)

Funções Visuespaciais / Visoconstrutivas

- Teste de Substituição Dígitos-Símbolos (*Digit Symbol Test - DS*)

(Sheridan, L.K., e cols.; 2006)

Habilidade Motora

- Teste da Prancha de Pinos Chanfrados (*Grooved Pegboard*)

(Power C, e cols., 1995)

Após a avaliação neurocognitiva, os pacientes foram classificados como normais (N), ou como portadores de alguma alteração cognitiva; estes, subdivididos em três grupos: déficit cognitivo assintomático (DCA); déficit cognitivo leve (DCL) e demência associada ao HIV (DAH) (Antinori e cols., 2007).

Os pacientes com DCA não apresentaram queixas cognitivas, porém apresentaram testes alterados em dois ou mais domínios da cognição, em mais de um desvio-padrão da média aritmética considerada como normal ou controle. Os pacientes classificados como portadores de DCL apresentaram queixas leves, e testes alterados em dois ou mais domínios da cognição, em mais de um desvio-padrão da média aritmética considerada como normal ou controle. Os pacientes com DAH apresentaram queixas importantes, e testes alterados em dois ou mais domínios da cognição, em dois desvios-padrões da média aritmética considerada como normal ou controle. Esses critérios diagnósticos ficaram conhecidos como critérios de Frascati (Antinori A e cols., 2007), e se encontram resumidos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Critérios de classificação de transtornos neurocognitivos relacionados com o HIV - HANDs

Déficit Cognitivo Assintomático (DCA)	<p>Alteração de Teste Neurocognitivo (NC) em dois ou mais (≥ 2) domínios cognitivos, que não pode ser explicada por doença oportunista do SNC, doenças sistêmicas, doenças psiquiátricas, distúrbios de uso de substâncias ou medicamentos com efeitos no SNC.</p> <p>Sem relato de comprometimento funcional das atividades da vida diária.</p>
Déficit Cognitivo Leve (DCL)	<p>Alteração de Teste Neurocognitivo (NC) em dois ou mais (≥ 2) domínios cognitivos, > 1 Desvio-Padrão (DP) abaixo da média do controle, que não pode ser explicada por doença oportunista do SNC, doenças sistêmicas, doenças psiquiátricas, distúrbios de uso de substâncias ou medicamentos com efeitos no SNC.</p> <p>Comprometimento funcional leve das atividades da vida diária, que não se explica por fatores de confundimento.</p>
Demência Associada ao HIV (DAH)	<p>Alteração de Teste Neurocognitivo (NC) em dois ou mais (≥ 2) domínios cognitivos, > 2 Desvio-Padrão (DP) abaixo da média do controle, que não pode ser explicada por doença oportunista do SNC, doenças sistêmicas, doenças psiquiátricas, distúrbios de uso de substâncias ou medicamentos com efeitos no SNC.</p> <p>Comprometimento funcional severo, demonstrado ou relatado, das atividades da vida diária, que não se explica por fatores de confundimento.</p>

Adaptado de Antinori A, e colaboradores, 2007.

Para as análises posteriores, os pacientes com déficit neurocognitivo assintomático (DCA) e portadores de déficit cognitivo leve (DCL) foram agrupados (DCA / DCL). Portanto, as análises foram realizadas considerando apenas três grupos: normal (N); déficit neurocognitivo assintomático e déficit cognitivo leve (DCA / DCL), e demência associada ao HIV (DAH).

3.6 - Dosagem de biomarcadores plasmáticos

A dosagem dos biomarcadores plasmáticos foi feita através da técnica Multiplex/Luminex, técnica comparável ao Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Vignali DA, 2000; de Jager W, e cols., 2003; Khan SS e cols., 2004). O uso desta técnica nos possibilita uma dosagem simultânea de diferentes citocinas, a partir de alíquotas de 50µl de plasma.

Medimos, por esta técnica, 37 biomarcadores no plasma de todos os pacientes, e dos controles não HIV: 27 marcadores inflamatórios e 10 biomarcadores neurodegenerativos. Os marcadores inflamatórios quantificados foram: Interleucina 1β [IL-1β], IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Fator de Crescimento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor* – FGF), eotaxina, Fator Estimulador de Crescimento de Colônias de Granulócitos (*granulocyte colony-stimulating factor* - G-CSF), fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos-macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - GM-CSF), Interferon-gama, Proteína induzível pelo interferon-gama 10 (*IFN-gamma-inducible protein 10* - IP-10), proteína quimiotática de monócitos 1 (*monocyte chemoattractant protein 1* - MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos-1alfa (*macrophage inflammatory protein-1alfa* - MIP-1α), proteína inflamatória de macrófagos-1beta (MIP-1β), fator de crescimento derivado de plaquetas-bb (*Platelet-derived growth factor-bb* - PDGF-bb), RANTES (*regulated on activation normal T Cell expressed and secreted*), fator de necrose tumoral alfa (*tumor*

necrosis factor- α - TNF- α), e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O ensaio de mensuração dos biomarcadores foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Os marcadores neurodegenerativos analisados foram: fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* - BDNF), catespina D, mieloperoxidase (MPO), inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1 (*plasminogen activator inhibitor type 1* - PAI-1), PDGF-AA, PDGF-AA/BB, RANTES, molécula solúvel de adesão intercelular-1 (*soluble intercellular adhesion molecule-1* - sICAM-1), molécula de adesão celular neural (*neural cell adhesion molecule* - NCAM) e molécula solúvel vascular de adesão celular 1 (*soluble vascular cell adhesion molecule-1* - sVCAM-1). O ensaio dos marcadores neurodegenerativos foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Para a análise, foram considerados apenas os marcadores com níveis detectáveis acima de 75% de todas as amostras, totalizando 12 biomarcadores: IL1- β , PDGF-BB, IP-10, BDNF, Catespina D, MPO, PAI-1, PDGF-AA, PDGF-AA/BB, RANTES, sICAM-1 e NCAM.

3.7 - Neuroimagem: aquisição de dados, processamento e análise

Antes da aquisição, foi obtido um segundo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico para o procedimento de aquisição de imagem através da Ressonância Magnética (Anexo 4). Não foi previsto o uso de nenhum tipo de anestesia para a aquisição das imagens por ressonância magnética, o que não interferiu no estudo.

As imagens de Ressonância Magnética do crânio foram adquiridas em equipamento de 3 Tesla Achieva 3 (Philips Medical Systems, Holanda), utilizando uma bobina de crânio com 8 canais projetada tanto para a avaliação estrutural, quanto para do tensor de difusão e da espectroscopia de prótons. Imagens anatômicas de referência

foram adquiridas com sequências: gradiente-eco T1 3D sagital isotrópica (TR/TE = 7.2/3.4ms; matriz/FOV = 240/240mm; “flip angle” = 8°; tamanho do voxel de 1mm; com 170 cortes sagitais), spin-eco T2 no plano coronal (TR/TE = 754/16ms, matriz = 256 x 256, FOV= 230 x 230mm, flip angle = 18, 26 cortes com espessura de 5mm e com 0.5mm de gap e); e DWi (“single-shot diffusion-weighted images”) no plano axial com TR/TE = 2854/66ms, matriz= 192 x 153, FOV= 230 x 230mm, 24 cortes com espessura de 4mm e com 1mm de gap, e Imagem do Tensor de Difusão (“Diffusion Tensor Image” - DTI) (TR / TE = 5582/65ms., FOV = 240/240mm, matriz = 96 x 95, 60 cortes com espessura de 2,5mm sem intervalo, com aquisição em 32 direções, utilizando fator b de 1.000sec/mm².

Baseando-se nas imagens anatômicas obtidas, os dois volumes espectroscópicos de interesse (voxel – medindo 25mm x 25mm x 25mm) escolhidos foram dispostos de forma a incluir o córtex frontal, o córtex parietal pósteromedial e do cíngulo posterior. Neste, utilizaram-se o bordo posterior do esplênio do corpo caloso e a fissura parieto-occipital como referenciais anatômicos para seu posicionamento. Estas regiões priorizam a avaliação cortical, onde há maior concentração dos corpos neuronais. A região do córtex parietal pósteromedial e do cíngulo posterior é amplamente escolhida na avaliação de pacientes com declínio cognitivo e quadros demenciais (Risacher SL e Saykin AJ., 2013).

A aquisição da espectroscopia utilizou a técnica “point-resolved spectroscopy volume selection” (PRESS); a supressão de água foi realizada com o método de excitação a 90° graus, com TR/TE/NEX de 2000ms/31ms/96. Cada estudo espectroscópico levou 3 minutos e 18 segundos para ser adquirido. A análise espectral foi realizada utilizando o software de espectroscopia fornecido pelo fabricante do sistema de RM. Os seguintes picos metabólicos foram identificados: N-acetilaspártato (NAA), creatina + fosfocreatina (Cr), compostos colina associados (Col) e mioinositol (MI); e as seguintes

razões metabólicas foram analisadas: NAA/Cr, Col/Cr, MI/Cr e MI/NAA. A concentração relativa dos metabólitos utilizando razões é uma ferramenta confiável, fácil de realizar e de replicar. A creatina é considerada um metabólito estável, e seu uso, nas razões metabólicas, visa simplificar o procedimento da ERM, permitindo a comparação entre diferentes indivíduos.

Foram também realizadas aquisição e análises através da Imagem do Tensor de Difusão (*Diffusion Tensor Image*). As imagens do tensor de difusão são obtidas através da observação dos movimentos das moléculas de água, denominados movimentos brownianos, que compõem o tecido cerebral. As moléculas de água se difundem de maneira randômica - difusão randômica da água - também chamada de “self-diffusion” ou difusão própria, e as características microscópicas do meio são fundamentais na determinação do efeito macroscópico da difusão a ser observado, ou seja, o movimento molecular é afetado pelo meio em que ele ocorre, o que, no caso de tecidos biológicos, depende diretamente da estrutura e arquitetura dos mesmos.

Neste caso, podemos imaginar, por exemplo, um meio em que uma barreira de mielina hidrofóbica restringe a difusão das moléculas da água através da mesma. Neste meio, a difusão não ocorre igualmente em todas as direções, exibindo propriedade anisotrópica, diferentemente de um meio isotrópico, em que não existe restrição alguma e em que as moléculas se deslocam igualmente em todas as direções, como ocorre com o líquido presente no interior dos ventrículos cerebrais (Figura 3.1).

Figura 3.1: RM anatômica e ponderada em difusão

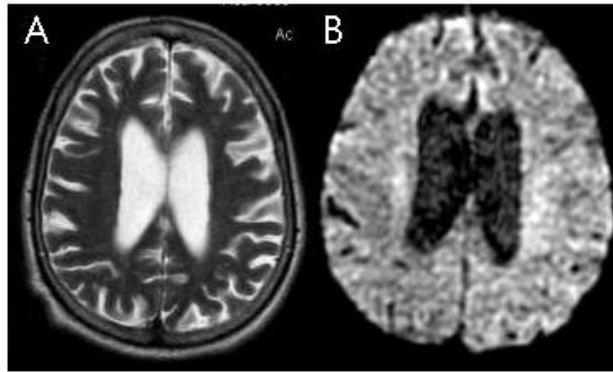


Figura 3.1: RM estrutural anatômica, ponderada em T2 (A) e ponderada em difusão (B), no plano axial de indivíduo normal.

A difusibilidade por ressonância magnética (RM) é quantificada, partindo do princípio de que o deslocamento das moléculas deve estar relacionado à intensidade de sinal medida pela RM. Em 1965, Stejskal e Tanner, utilizando uma sequência de pulso gradiente spin eco (SE), pela primeira vez mediram difusão com um experimento de RM, baseados no conceito de que os spins (ou próton de hidrogênio da água), movendo-se na direção do gradiente do campo magnético, são expostos a diferentes intensidades de campo magnético, dependendo da posição que ocupam ao longo do eixo de um gradiente (Stejskal e Tanner, 1965).

O mapa de difusibilidade em um corte axial de um cérebro humano normal é representado na Figura 3.2 B. A anisotropia mede o quanto a difusão em uma das direções é preponderante em relação às outras. Existem vários índices de anisotropia, sendo Anisotropia Fracional (*Fractional Anisotropy*) o índice mais comumente usado. O mapa de FA em um corte axial de um cérebro humano normal é representado na Figura 3.2 C. O mapa de FA codificado em cores, baseado na direção dos vetores, em um corte axial de um cérebro humano normal é representado na Figura 3.2 D.

Figura 3.2: Mapas derivados da Imagem do Tensor de Difusão

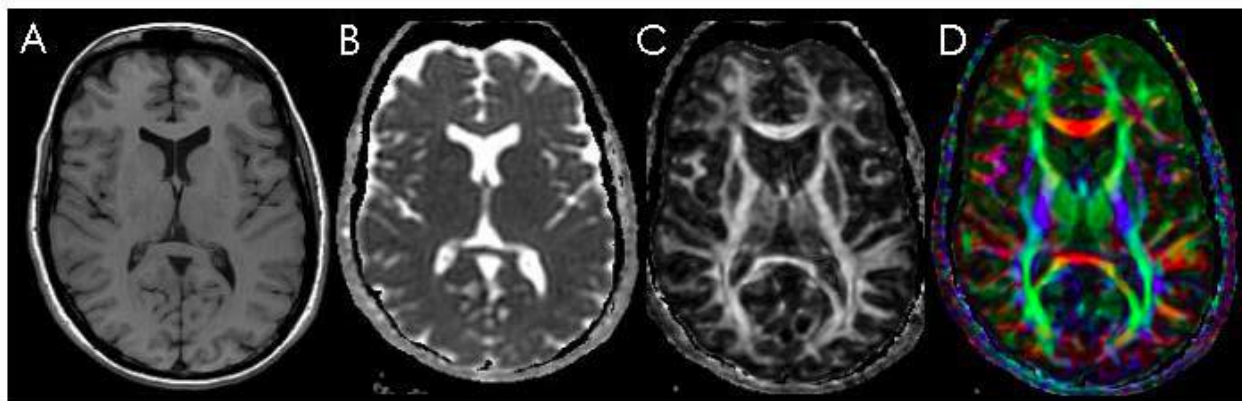


Figura 3.2: Imagens de ressonância magnética (RM) de indivíduo-controle no plano axial de mesma localização. A. RM ponderada em T1; B. mapa de difusibilidade Trace – independente da direção; C. mapa de anisotropia fracional (FA); D. mapa de FA codificado em cores, segundo orientação dos feixes: fibras em disposição látero-lateral em vermelho, fibras em disposição ântero-posterior em verde e fibras em disposição supero-inferior em azul.

Para cada paciente incluído, antes de estimar os mapas de difusão, todas as imagens foram visualmente inspecionadas para artefatos. Imagens com e sem difusão foram co-registradas, para corrigir artefatos de movimento e minimizar efeitos de distorção sobre a leitura. O tensor de difusão para cada voxel foi calculado com base nos vetores próprios (v_1 , v_2 , v_3) e valores próprios (λ_1 , λ_2 , λ_3), usando uma montagem multivariada e diagonalização. Posteriormente, os mapas de Anisotropia Fracional (*Fractional Anisotropy*) e Difusividade Média (*Mean Diffusivity*) foram calculados segundo valores próprios, utilizando mapas com códigos de cores, gerados a partir dos valores de FA e de três elementos do vetor de v_1 para visualizar a orientação dos tratos de substância branca (FSL 4.0 software FMRIB) (Jiang e cols., 2006;. & Pajevic Pierpaoli, 1999). Imagens de FA e MD foram extraídas do cérebro (Brain Extraction Tool, FSL) e registradas em um espaço comum (MNI152), utilizando um registro restrito, não linear (Image Registration Toolkit) (Rueckert e cols., 1999) (BET, DTIFit Toolbox, parte da FSL software 4.0 FMRIB). Os dados derivados de FA e MD foram analisados empregando áreas prioritárias de regiões de interesse (regions of interest – ROI) (Jiang e cols., 2006;

Tovar-Moll e cols., 2009) e voxel a voxel em todo o cérebro (TBSS) (Smith e cols., 2006; Simonyan e cols., 2008).

Utilizando o *Tract-Based Spatial Statistics* (TBSS) (FMRIB Software Library, FSL; Smith e cols., 2004), procurou-se por diferenças globais da substância branca nos grupos através de análises estatísticas de FA e MD de todo o cérebro (Voxelwise whole-brain analysis), investigando voxel-a-voxel. As imagens de FA foram alinhadas com a imagem obtida no primeiro paciente incluído, passando esta a ser a imagem alvo, registrada no padrão MNI152, e definida através do volume cerebral não segmentado, como 1x1x1mm, usando o volume não segmentado e segmentado. Em seguida, ambos, o trato não linear e as transformações afins da imagem de destino, foram aplicados às imagens de FA de cada paciente incluído. Imagens de FA alinhados, rearrumadas, foram calculadas para criar a média de FA de todos os pacientes incluídos. A média de FA foi, então, utilizada para gerar molde de trato, que representa os intervalos compartilhados por todos os pacientes da amostra (Smith e cols., 2006). Finalmente, os dados registrados de FA de cada indivíduo foram "projetados" para o molde gerado a partir das médias de FA, obtendo-se os dados finais FA, estruturados. Todos estes procedimentos também foram feitos para criar um molde referente às imagens do MD. Para testar diferenças estatísticas locais, de imagens de FA e MD, cada voxel foi comparado, utilizando inferência não paramétrica, baseada em randomização com 5.000 permutas aleatórias (FSL randomize tool, Nichols e cols., 2002), em cada voxel dos dados resultantes do molde criado a partir das médias (Smith e cols., 2004 e 2006). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$, utilizando comparação baseada em *cluster*, Threshold-Free Cluster Enhancement, Smith e cols., 2009), corrigidos para múltiplas comparações (Familywise Error Rate, FWE).

3.8 - Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism, versão 6.0 para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As variáveis demográficas foram expressas como mediana e intervalo interquartil (IQ 25-75%). Os valores dos biomarcadores foram expressos como mediana, mínimo e máximo.

A comparação entre os resultados de Testes Neurocognitivos foi feita através de ANOVA, comparando as médias dos grupos entre si (N vs DCA/DCL vs DAH). Para comparação das dosagens de biomarcadores plasmáticos entre os pacientes infectados pelo HIV e voluntários sadios (não HIV) utilizamos o *Mann Whitney Test* (não paramétrico e não pareado). Quando comparamos os níveis dos biomarcadores entre os três grupos neurocognitivos (N vs DCA/DCL vs DAH), utilizamos ANOVA, analisando todos os grupos entre si. Para a análise da espectroscopia, obtida na ressonância magnética, entre os três grupos neurocognitivos (N vs DCA/DCL vs DAH), utilizamos ANOVA.

As análises estatísticas relativas à Tractografia (DTI) foram descritas na seção específica da metodologia de processamento e análise dos dados referentes a imagem.

4. Resultados

4.1 - Características clínicas dos pacientes incluídos

Foram incluídos 52 pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, que até o momento da inclusão não haviam apresentado nenhuma intercorrência clínica relacionada ao vírus.

A mediana de idade da população incluída foi de 33 anos (IQR, 25-75: 28 – 43,75), com 34 pacientes do sexo masculino, representando 65% da amostra. A mediana da contagem de linfócitos T CD4⁺ foi de 578 células/mm³ e da mensuração do RNA viral de 5.944 cópias/ml. A mediana do tempo decorrido desde o diagnóstico da infecção pelo HIV e a inclusão no estudo foi de 32,5 meses (IQR, 25-75: 15,5 – 57). As características demográficas da população incluída estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Dados clínicos e demográficos dos pacientes infectados pelo HIV assintomáticos incluídos

N=52	
Idade (anos)	33 (28,00 – 43,75)
Sexo masculino (%)	34 (65)
Escolaridade (anos de estudo)	11 (8 - 12)
Contagem de linfócitos T CD4 ⁺ (células/mm ³)	578 (432 - 743)
RNA Viral (cópias /ml)	5.944 (748,50-20.246,00)
Tempo decorrido desde o diagnóstico da infecção pelo HIV (meses)	32,50 (14,50-57)

Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil (IQR, 25-75).

Incluimos uma população predominantemente jovem, com a maioria (65%) do sexo masculino. Os pacientes apresentaram a imunidade consideravelmente preservada, evidenciada por uma mediana da contagem de linfócitos T CD4⁺ elevada (578 células/mm³), mesmo sem o uso de antirretrovirais.

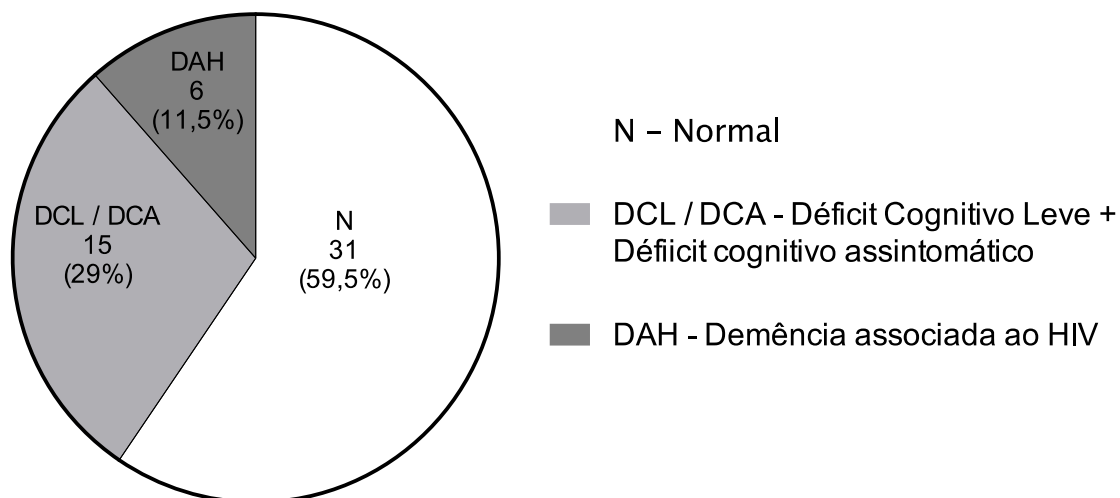
4.2 - Avaliação neurocognitiva

Os pacientes incluídos em nosso estudo foram submetidos a uma avaliação neurocognitiva, composta por uma bateria de testes e realizada por um especialista. Os resultados numéricos dos testes neurocognitivos estão expostos no Anexo 5.

Os pacientes foram agrupados em função dos resultados dos testes neurocognitivos e, então, classificados como normais (N), ou como portadores de alguma alteração cognitiva, subdivididos em: Déficit Cognitivo Assintomático (DCA) / Déficit Cognitivo Leve (DCL) e Demência Associada ao HIV (DAH).

Dentre os pacientes incluídos, 31(59,5%) apresentaram desempenho cognitivo normal (N), 15(29%) pacientes foram classificados como DCL / DCA, e 6(11,5%) foram classificados como portadores de DAH, conforme demonstrado na Figura 4.1.

Figura 4.1: Distribuição dos pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, agrupados em função da avaliação neurocognitiva.



É importante ressaltar que todos os pacientes incluídos neste estudo não apresentavam quaisquer sintomas ou sinais neurológicos detectáveis através da avaliação clínica de rotina no momento da inclusão. Deste modo, podemos observar: dos 52 pacientes incluídos em nosso estudo, 27(40,5%) apresentavam algum tipo de distúrbio cognitivo que, apesar de detectável através de testes direcionados para a função cognitiva, não foi identificado através da avaliação médica/clínica realizada de forma rotineira.

Após a realização da avaliação neurocognitiva, comparamos os resultados dos testes entre estes três grupos (N vs DCA / DCL vs DAH), de acordo com o apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Comparação dos resultados dos testes neurocognitivos dos pacientes infectados pelo HIV assintomáticos, agrupados em função da avaliação neurocognitiva: Normal (N); Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA); Demência associada ao HIV (DAH).

Teste neurocognitivo	N 59,5% (N=31)	DCL + DCA 29% (N=15)	DAH 11,5% (N=6)
DS	41 (17-63)	34 (18 – 53) *	11.5 (0 – 32) * +
TRAIL A	32,00 (17 – 78)	35,50 (12 – 88)	72,00 (40 – 159) * +
TRAIL B	77 (36 – 208)	91(36 – 180)	180 (151 – 180) * +
Fluência Verbal	20 (13 – 31)	15 (10 – 37)	12,5 (9 – 19) *
GPMD	65 (50 – 91)	71,5 (57 – 110)	104 (80 - 235) * +
GPMND	75 (61 – 115)	77 (62 – 101)	130 (106 – 305) * +
RAVLT1/REY1	5 (3 – 8)	4 (2 – 7) *	4,5 (4 – 7)
RAVLT5/REY5	12 (9 – 15)	10 (7 – 15)	7,5 (5 – 11) * +
REV1	10 (6 – 15)	8 (2 – 14)	4,5 (2 – 11) *
REV2	10 (6 – 15)	9 (2 – 15)	5,5 (2 – 11) *
Escala Internacional de Demência pelo HIV (EID-HIV)			
EID - HIV	11,5 (9-12)	11 (8,5 – 12)	8,75 (3 – 10) * +

(*) ou (+) se $p < 0,05$ - ANOVA, com múltiplas comparações entre as médias de cada coluna dos grupos neurocognitivos entre si. (*) Comparada ao grupo Normal (N) e (+) Comparada ao grupo Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA). Valores expressos como mediana, mínimo e máximo. Testes: DS: *Digit Symbol Test*, TRAIL A e B: *Trail making test* parte A e B; Teste de Fluência Verbal (FV); *Grooved Pegboard* com a mão dominante (GPMD) e com a mão não dominante (GPMND); *Rey auditory verbal learning test* 1 e 2 (RAVLT1 e 2), Rey Auditory Verbal Learning Test, primeira e segunda evocação, REV1 e REV2, respectivamente, e Escala Internacional de Demência pelo HIV (EID-HIV).

Observamos, portanto, que os pacientes infectados pelo HIV incluídos e que foram classificados como portadores de DAH apresentaram alterações em todos os domínios da cognição avaliados (atenção e velocidade de processamento de informação, coordenação motora, memória, linguagem, funções visuespaciais/visuoconstrutivas e habilidade motora), quando comparados aos pacientes classificados como portadores de DCL/DCA, e também quando comparados aos pacientes classificados como normais do ponto de vista cognitivo.

Além disso, o padrão dos déficits encontrados em nosso estudo foi consistente com a descrição em literatura (Ances BM e cols., 2007), compatível com um processo de degeneração subcortical, característica da infecção pelo HIV, que se manifesta através de alterações comportamentais, declínio cognitivo e comprometimento da função motora.

Os pacientes que avaliamos, quando submetidos à Escala Internacional de Demência pelo HIV (EID-HIV), também foram classificados como portadores de DAH. A EID-HIV (Sacktor NC, e cols., 2005) é uma ferramenta de aplicação mais fácil que a descrita por Antinori e colaboradores (Antinori e cols., 2007), embora seja um método já validado e descrito na literatura.

4.3 - Dosagem dos biomarcadores plasmáticos

Testamos 37 biomarcadores plasmáticos, incluindo biomarcadores inflamatórios e neurodegenerativos, e analisamos aqueles que foram detectados em, no mínimo, 75% das amostras testadas, conforme demonstrado em Tabela anexa (Anexo 6). Foram analisados, portanto, 12 biomarcadores, sendo estes: IL-8, PDGF-BB, IP-10, BDNF, Catepsina D, MPO, PAI-1, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, sICAM-1 e NCAM. Os valores de todas as dosagens de forma individualizada, dos pacientes infectados pelo HIV e dos controles (não HIV), estão expostos no Anexo 7.

Comparamos os níveis plasmáticos de 12 biomarcadores entre pacientes HIV assintomáticos e controle (não HIV), conforme demonstrado na Tabela 4.3. Observamos níveis plasmáticos estatisticamente mais elevados ($p < 0,05$) nos pacientes infectados pelo HIV, quando comparados com os voluntários não HIV, sendo este aumento observado em nove dos doze biomarcadores analisados: PDGF-BB, IP-10, BDNF, Catepsina D, PAI-1, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, sICAM-1 (Tabela 4.3).

Em análise posterior, comparamos os níveis destes biomarcadores entre os pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, agrupados em função da avaliação neurocognitiva (Normal - N; Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático - DCL + DCA; Demência associada ao HIV – DAH) (Tabela 4.4). Não houve diferença significativa nos níveis de biomarcadores quando comparados entre os três grupos neurocognitivos (N vs DCL / DCA vs DAH) (Tabela 4.4).

Tabela 4.3: Concentrações plasmáticas de biomarcadores de pacientes infectados pelo HIV, comparados a um grupo controle, não HIV.

Biomarcador (pg/mL)	Controle não HIV (Voluntários sadios) (N=8)	Pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos (N=52)	p valor ^a
IL-8	0,77 (0,42 – 2,48)	1,20 (0,30 – 10,49)	0,29
PDGF-bb	131,4 (64,19 – 4239)	2590 (66,94 – 43747)	0,0013
IP-10	228,7 (101,4 – 336,4)	956,7 (169,4 – 19953)	<0,0001
BDNF	186,2 (53,39 – 1432)	1407 (20,62 – 7955)	0,02
Catepsina D	55850 (28343 – 115311)	120679 (20837 - 325957)	0,0013
MPO	15384 (2819 – 47337)	16333 (3704 – 218318)	0,44
PAI-1	11448 (5115 – 78470)	40497 (3426 - 168194)	0,01
PDGF-AA	269,4 (136,7 – 2393)	2455 (33,73 – 12895)	0,004
PDGF-AB/BB	2905 (471 – 31216)	23875 (33,04 – 106998)	0,022
RANTES	7787 (2615 – 22386)	19416 (1299 – 188278)	0,007
sICAM-1	51384 (30386 – 156283)	98921 (14811 – 232268)	0,01
NCAM	154614 (63620 – 358784)	188940 (27688 - 342771)	0,96

^a – Mann Whitney test: Teste não paramétrico, comparando medianas entre os grupos. Valores expressos em pg/ml (mediana, mínimo e máximo).

IL-8 (Interleucina-8); PDGF (*Platelet-derived growth factor-bb*) – PDGF-bb, PDGF-AA, PDGF-AA/BB; IP-10 (*IFN-gamma-inducible protein 10* - IP-10), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*); MPO (mieloperoxidase); PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*); sICAM-1 (*soluble intercellular adhesion molecule-1*); NCAM (*neural cell adhesion molecule*).

Tabela 4.4: Concentrações plasmáticas de biomarcadores de pacientes sem uso prévio de antirretroviral, agrupados em função da avaliação neurocognitiva: Normal (N); Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA); Demência associada ao HIV (DAH).

Biomarcador (pg/ml)	N 59,5% (N=31)	DCL + DCA 29% (N=15)	DAH 11,5% (N=6)	p valor ^a
IL-8	1,09 (0,30 – 10,49)	1,13 (0,42-1,91)	1,46 (0,67-5,11)	0,53
PDGF-bb	2918,00 (69,90 – 43747,00)	1546,00 (66,94 – 14602,00)	5102,00 (1224,00 – 18416,00)	0,56
IP-10	1007,00 (169,40-19953,00)	695,50 (284,10 – 2787,00)	941,40 (190,40 – 14013,00)	0,34
BDNF	1465,00 (77,02 – 7406,00)	1361,00 (41,07 – 7955,00)	1232,00 (20,62 – 3731,00)	0,91
Catepsina D	135814,00 (45468,00 – 325957,00)	101384,00 (20837,00 – 175941,00)	117460,00 (39937,00 – 194936,00)	0,11
MPO	13458,00 (4534,00 – 218318,00)	24706,00 (3958,00 – 146765,00)	23151,00 (3704,00 – 153510,00)	0,56
PAI-1	44697,00 (9348,00 – 166021,00)	36395,00 (7031,00 – 168194,00)	39298,00 (3426,00 – 115938,00)	0,99
PDGF-AA	2285,00 (345,80 – 12895,00)	2522,00 (33,73 – 10417,00)	1835,00 (116,20 – 8703,00)	0,90
PDGF-AB/BB	23387,00 (836,80 – 106.998)	24244,00 (33,04 – 97908,00)	23108,00 (164,20 – 82210,00)	0,92
RANTES	18069,00 (8562,00 – 188278,00)	19859,00 (1299,00 – 76849,00)	13270,00 (2490,00 – 21431,00)	0,43
sICAM-1	112888,00 (14811,00 – 232268,00)	98921,00 (26863,00 – 227665,00)	81122,00 (34129,00 – 188424,00)	0,53
NCAM	203230,00 (35479,00 – 301593,00)	157049,00 (27688,00 – 342771,00)	150642,00 (56363,00 – 245171,00)	0,40

a. ANOVA

Os valores são expressos em pg/ml, como mediana, mínimo e máximo.

IL-8 (Interleucina-8); PDGF (*Platelet-derived growth fator-bb*) – PDGF-bb, PDGF-AA, PDGF-AA/BB; IP-10 (*IFN-gamma-inducible protein 10 - IP-10*), BDNF (*brain-derived neurotrophic fator*); MPO (mieloperoxidase); PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*); sICAM-1 (*soluble intercellular adhesion molecule-1*); NCAM (*neural cell adhesion molecule*).

Nossos dados, portanto, demonstraram que, embora os pacientes incluídos fossem assintomáticos, apresentaram uma maior atividade inflamatória, evidenciada através da dosagem de biomarcadores, quando comparados com controles (voluntários não HIV). Isto nos sugere que apesar de os pacientes incluídos apresentarem imunidade relativamente preservada, com mediana de CD4⁺ de 578 células/mm³, apresentam uma maior atividade inflamatória, se comparados à população não HIV.

No entanto, quando comparamos os biomarcadores entre os pacientes agrupados em função da avaliação cognitiva, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sugerindo que a avaliação de biomarcadores plasmáticos, seja citocinas/quimiocinas ou marcadores neurodegenerativos, não discriminaram os pacientes infectados pelo HIV que apresentavam déficit cognitivo.

4.4 - Avaliação de neuromimagem através de Ressonância Magnética

Analisando o parênquima cerebral por RM, dos 52 pacientes incluídos, observamos que 30,77% não apresentavam alterações. Dos pacientes que apresentaram algum tipo de alteração no parênquima, detectada pela RM (Tabela 4.5), 67,40%, classificados na Tabela 4.5 como B, D e F, apresentaram áreas esparsas na substância branca periventricular e subcortical, de significado inespecífico. Três pacientes (5,77%) apresentam “presença de lesão focal”, que foram descritas como focos puntiformes, também de significado inespecífico.

Além destes, 3 pacientes (5,77%) foram classificados como “outros”, representados na Tabela 4.5 como I, e estes apresentam achados radiológicos, também de significado inespecífico: (1) persistência dos cavuns dos septos pelúcido e vergae - uma variante da normalidade; (2) formações císticas agrupadas, de limites definidos e contornos levemente bocelados, separadas por finos septos, medindo o

conjunto cerca de 1,5 x 0,6cm; (3) formação cística com teor proteico elevado na loja pineal, com 0,9cm de diâmetro, podendo corresponder a calcificação.

Deste modo, acreditamos que nossas análises de neuroimagem estrutural com avaliação do parênquima cerebral, embora tenham detectado alterações, estas são de significado inespecíficos, e não se associam nem explicam o déficit cognitivo dos pacientes incluídos. Além disso, o fato de terem apresentado a integridade preservada da macroestrutura cerebral aumenta a validade e a robustez dos dados das análises subsequentes: espectroscopia e DTI.

Tabela 4.5: Classificação de Avaliação do Parênquima, através de técnicas de neuroimagem, por Ressonância Magnética, de pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos

Classificação de Avaliação do Parênquima	N	%
A Parênquima encefálico com sinal preservado	16	30,77
B Áreas esparsas de hipersinal em T2 e Flair na substância branca periventricular	10	19,23
C Extensas áreas de hipersinal em T2 e Flair na substância branca periventricular	1	1,92
D Áreas esparsas de hipersinal em T2 e Flair na substância branca subcortical	7	13,46
E Extensas áreas de hipersinal em T2 e Flair na substância subcortical	1	1,92
F Áreas esparsas de hipersinal em T2 e Flair na substância branca periventricular e subcortical	11	21,15
G Extensas áreas de hipersinal em T2 e Flair na substância branca periventricular e subcortical	0	0,00
H Presença de lesão focal	3	5,77
I Outros	3	5,77
TOTAL	52	100%

Além de avaliarmos as sequências anatômicas dos pacientes incluídos, avaliamos também, através da espectroscopia, metabólitos ajustados para creatina, nos lobos frontal e parietal posterior. Os metabólitos medidos foram: Relação Mio-Inositol/N-acetil aspartato (MI/NAA), MI, Compostos contendo Colina e NAA, no lobo frontal e no lobo parietal posterior.

O Mio-Inositol é considerado um marcador de gliose, uma alteração da substância branca cerebral, evidenciada pela ressonância magnética, geralmente proveniente de microangiopatia cerebral, que se associa com rarefação mielínica. O N-acetil-aspartato é um metabólito exclusivo de neurônios, utilizado como um marcador de densidade e de viabilidade neuronais, e a sua concentração diminui em escala proporcional ao dano celular. Os compostos contendo colina (Cho) participam do metabolismo das membranas celulares, o que pode refletir seu “turn over”. Deste modo, um aumento nos níveis de colina pode estar associado a um aumento na síntese de membranas, ou, mesmo, aumento da população celular, visto em alguns tumores e em situações de destruição da mielina.

Não observamos diferenças significativas entre os metabólitos cerebrais (MI/NAA, MI, Compostos contendo Colina e NAA) mensurados pela espectroscopia no lobo frontal, dos pacientes infectados pelo HIV e agrupados em função da avaliação cognitiva.

No lobo parietal-posterior, analisando os mesmos metabólitos, observamos uma tendência de redução dos níveis de NAA nos pacientes classificados como portador de DAH, quando comparados aos demais grupos neurocognitivos (1,42 vs 1,33 e 1,46 vs 1,33) (Tabela 4.6). Uma redução nos níveis de NAA é descrita como um indicador não específico de insulto neuronal, o que está de acordo com nossos dados, uma vez que encontramos os menores valores nos pacientes com diagnóstico de Demência Associada ao HIV (DAH).

Além disso, observamos um aumento na relação dos níveis de MI/NAA (Mio-Inositol / N-acetil-aspartato) no grupo de pacientes classificados como portadores de Demência Associada ao HIV (DAH), quando comparado aos demais grupos neurocognitivos (N e DCL/DCA) (Tabela 4.6). A associação de redução dos níveis de NAA com aumento de MI, acarretando um aumento da relação MI/NAA, foi inicialmente descrita em demência do tipo Alzheimer; posteriormente foi observada em outras demências, inclusive nos quadros de DAH.

Em nossa amostra, os pacientes com critérios para DAH apresentavam, no lobo posterior, uma tendência à redução dos níveis de NAA. Além disso, também no lobo posterior, os pacientes classificados como DAH apresentavam um aumento significativo da relação MI/NAA quando comparados aos demais grupos neurocognitivos (0,40 vs 0,33 vs 0,34) (Tabela 4.6).

As alterações observadas na espectroscopia foram raras, não sendo capazes de diferenciar os pacientes em relação à classificação neurocognitiva. No entanto, o aumento significativo da relação MI/NAA no lobo posterior evidenciou uma alteração do padrão da atividade metabólica cerebral, associado pacientes classificados como portador de DAH.

Tabela 4.6: Metabólitos ajustados para creatina, medidos através de espectroscopia, nos lobos frontal e parietal posterior, de pacientes agrupados de acordo com a avaliação neurocognitiva: Normal (N); Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA); Demência Associada ao HIV (DAH).

Metabólito e localização	N 59,5% (N=31)		DCL + DCA 29% (N=15)		DAH 11,5% (N=6)		p valor ^a
Lobo Frontal							
Mio-Inositol / N-acetil aspartato	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	0,32	0,08	0,34	0,06	0,35	0,11	0,62
Mio-Inositol	0,47	0,09	0,52	0,07	0,48	0,08	0,31
Compostos contendo Colina	0,67	0,08	0,64	0,04	0,66	0,07	0,63
N-acetil aspartato	1,49	0,13	1,51	0,12	1,38	0,20	0,17
Lobo Parietal-Posterior							
Mio-Inositol / N-acetil aspartato	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	0,34	0,04	0,33	0,04	0,40*	0,10	0,03
Mio-Inositol	0,48	0,05	0,49	0,03	0,52	0,09	0,15
Compostos contendo Colina	0,55	0,06	0,53	0,03	0,59	0,08	0,14
N-acetil aspartato	1,42	0,11	1,46	0,14	1,33	0,18	0,11

^a ANOVA

Todos os metabólitos mensurados expressam valores em relação à creatina. Pacientes classificados como portadores com Demência Associada ao HIV (DAH) apresentaram maior valor da relação Mio-Inositol / N-acetil aspartato quando comparados com pacientes com avaliação neurocognitiva normal (N) e portadores de Déficit Cognitivo Leve + Déficit cognitivo assintomático (DCL + DCA) - ANOVA. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas demais comparações entre os grupos. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (DP).

Além das sequências anatômicas e da espectroscopia, foram realizadas aquisição de imagens através do tensor de difusão (*Diffusion Tensor Image* - DTI) por RM e fascigrafia, avaliando a Difusividade Média (*Mean Diffusivity* - MD) e a Anisotropia Fracional (*Fractional Anisotropy* – FA). O DTI é um método que se baseia na quantificação do movimento direcional da água, sendo capaz de mapear os feixes de substância branca, caracterizando a integridade da microestrutura do tecido.

Os grupos foram comparados aos pares. Não houve diferença significativa, nem na FA nem na MD, entre os pacientes normais e portadores de Déficit Cognitivo Leve + Déficit Cognitivo Assintomático (DCL / DCA).

Quando comparamos os valores de anisotropia fracional (FA - fractional anisotropy) entre pacientes com avaliação cognitiva normal (N) e pacientes portadores de Demência Associada ao HIV (DAH), observamos diferentes graus de anormalidades simétricas no corpo caloso (CC), na coroa radiada do tálamo anterior (esquerda e direita), no trato costicoespinal (esquerda e direita), fórceps maior e menor, fascículo fronto-occipital inferior (esquerda e direita), e fascículo uncinado (esquerda e direita) ($p < 0,05$) (Figura 4.2 A).

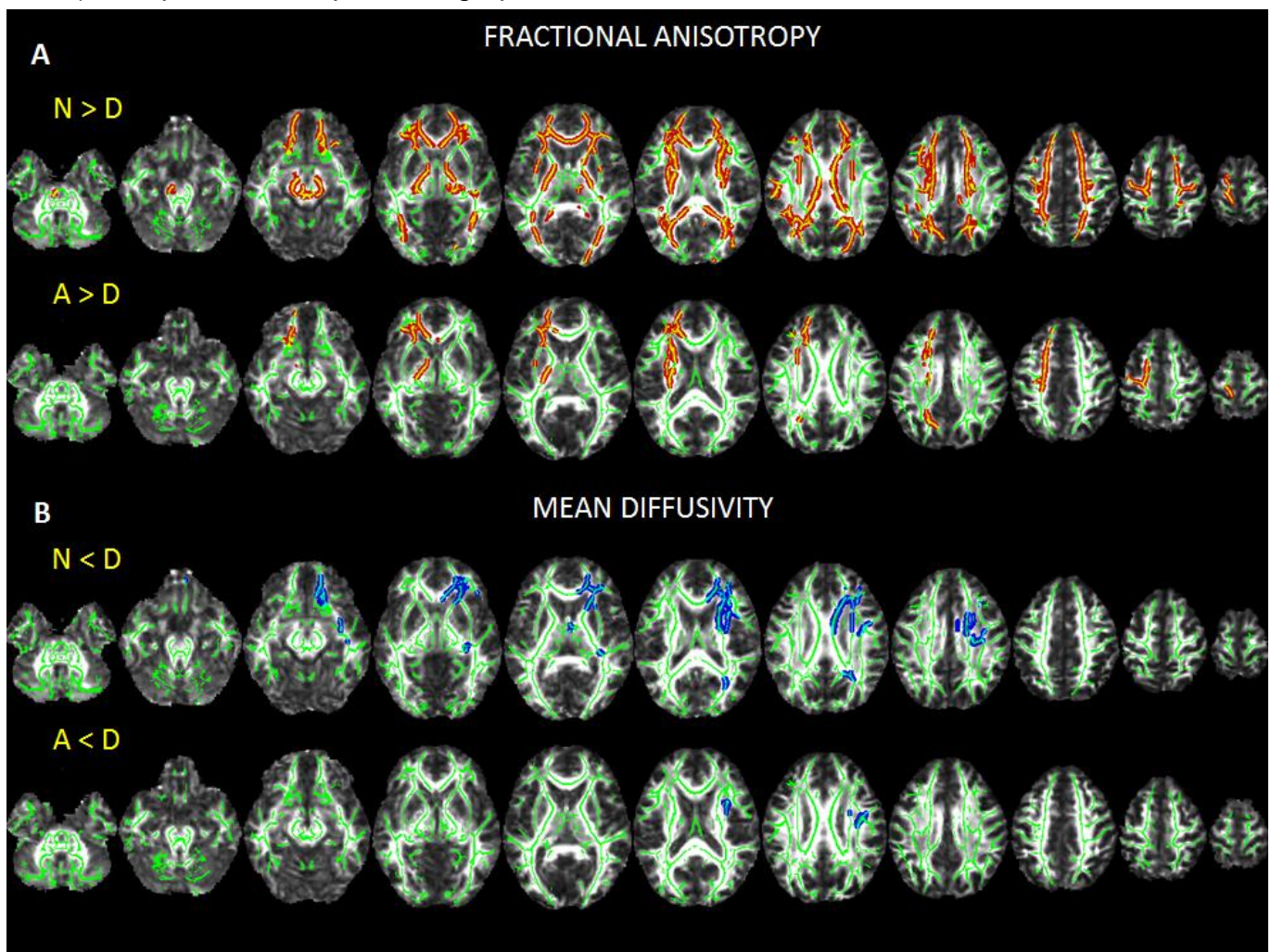
No entanto, quando comparados os valores de FA entre os pacientes classificados como DCL/DCA e pacientes com DAH, observamos anormalidades estatisticamente significativa predominando no lado esquerdo, no CC, na radiação do tálamo anterior, fórceps menor, e trato corticoespinal (Figura 4.2 A).

A comparação da difusividade média (mean diffusivity - MD) entre indivíduos Normais (N) e portadores de Demência Associada ao HIV (DAH) foi capaz de detectar diferenças significativas ($p < 0,05$ - limiar: 0,95) no corpo caloso (CC), na coroa radiada do tálamo (à direita), no trato corticoespinal (à direita), no fórceps menor, predominantemente no lado direito e no fascículo fronto-occipital inferior (à direita).

Comparando os grupos DCL/DCA com os DAH, observou-se discreta diferença significativa no fascículo longitudinal superior (Figura 4.2 B).

O DTI se apresentou capaz de evidenciar diferenças na integridade dos tratos de substância branca, de maneira precoce, tanto entre pacientes com DAH vs N, quanto entre aqueles com DAH e DCL/DCA.

Figura 4.2 (A e B): Clusters de voxels de pacientes sem exposição prévia ao uso de antirretrovirais, agrupados de acordo com avaliação neurocognitiva (normal – N; Déficit Cognitivo Leve + Déficit Cognitivo Assintomático – DCL/DCA; Demência Associada ao HIV - DAH), comparados aos pares de grupos.



Clusters de voxels com diferença significativamente estatística ($p < 0,05$, FWE corrigido para múltiplas comparações usando TFCE (Threshold-Free Cluster Enhancement) em pacientes sem exposição prévia aos antirretrovirais, agrupados de acordo com avaliação neurocognitiva (normal – N; Déficit Cognitivo Leve + Déficit Cognitivo Assintomático – A; Demência Associada ao HIV - D), comparados aos pares de grupos. As alterações significativas são evidenciadas em vermelho na análise da FA (FA - fractional anisotropy) (A) e em azul na análise da MD (mean diffusivity) (B).

Nossos resultados demonstraram que, apesar de termos incluído pacientes infectados pelo HIV clinicamente assintomáticos, encontramos uma prevalência de alterações cognitivas em 40,5% da amostra. Além disso, nossos resultados demonstram que as técnicas de neuroimagem se mostraram ferramentas úteis no diagnóstico precoce do déficit cognitivo, principalmente por técnicas mais avançadas, como o DTI.

5. Discussão

Ao longo do tempo, após a implementação da terapia antirretroviral combinada, observou-se uma melhora no manejo clínico do paciente infectado pelo HIV. Deste modo, a infecção pelo vírus vem, gradativamente, adquirindo características de doença crônica, com pacientes acompanhados por um longo período de tempo, favorecendo, então, o surgimento de complicações não diretamente relacionadas à imunodeficiência, como doenças cardiovasculares, neoplasias não associadas ao próprio vírus, osteoporose, alterações hepáticas, alteração da função renal, além do comprometimento das funções cognitivas, denominadas HANDs (*HIV-associated neurocognitive disorders*) (Deeks SG, 2011).

Com o objetivo de obtermos uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das HANDs, avaliamos uma coorte de pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, que não haviam sido expostos ao tratamento com antirretrovirais. Os pacientes incluídos foram submetidos a uma avaliação neurocognitiva, tiveram amostra de plasma coletada para dosagem de biomarcadores, além de terem realizado exames de imagem (ressonância magnética) do encéfalo. No entanto, apesar de termos incluído pacientes considerados assintomáticos por uma avaliação clínica rotineira, 40,5% da amostra apresentaram a capacidade cognitiva comprometida, de acordo com os critérios descritos por Antinori e colaboradores (2007). Observamos uma baixa detecção de biomarcadores inflamatórios circulantes que não foi capaz de discriminar os graus de comprometimento cognitivo dos pacientes incluídos. As análises dos exames de ressonância magnética não nos evidenciaram alterações macroestruturais que explicassem o déficit cognitivo observado; no entanto, as análises da espectroscopia e da tractografia evidenciaram alterações compatíveis com insulto neuronal e distúrbios de conectividade de substância branca nos pacientes

com DAH. Deste modo, pelo fato de termos avaliado pacientes sem a interferência do uso de antirretrovirais, nem de infecções oportunistas, acreditamos que o principal mecanismo envolvido na ocorrência das HANDs seja decorrente de ação direta e indireta do próprio vírus.

Encontramos 40,5% de prevalência de HANDs na população avaliada. Destes, 15(29%) pacientes apresentavam Déficit Cognitivo Leve ou Déficit cognitivo Assintomático (DCL + DCA), enquanto os demais, 6 pacientes (11,5%), apresentavam quadro de Demência Associada ao HIV (DAH).

A prevalência das HANDs tem sido motivo de controvérsias, uma vez que contempla um largo espectro de alterações, com critérios diagnósticos muitas vezes subjetivos (Albright AV, e cols., 2003; Cysique LA, e cols., 2004; McArthur JC, e cols., 2010; Simioni S, e cols., 2010; Harezlak J, e cols., 2011; Fernandes Filho SM, e cols., 2012; de Almeida SM, e cols.; 2013; Rodrigues RA, e cols., 2013). Além disso, os estudos que avaliaram a ocorrência das HANDs foram realizados em populações heterogêneas, com estados imunológico e virológico variados (Linfócitos T CD4⁺ e quantificação do RNA viral), e com pacientes em diferentes estágios da infecção pelo HIV (Robertson KR, e cols., 2007; McArthur JC, e cols., 2010; Harezlak J, e cols., 2011).

Estudos relatam que, após a implementação da TARVc, foi possível observar uma maior prevalência das formas menos graves de acometimento cognitivo, DCA e DCL, em relação às formas mais graves, DAH (Robertson KR, e cols., 2007; Heaton RK e cols., 2010).

Avaliamos uma população não exposta à TARVc, assintomática. Observamos uma maior prevalência das formas mais brandas de distúrbios cognitivos relacionados ao HIV (DCL e DCA – 29%), quando comparada às formas mais graves (DAH – 11,5%). O fato de termos incluído pacientes assintomáticos explica a maior ocorrência

das formas menos graves (DCL e DCA), quando comparadas às formas mais graves (DAH).

Becker e colaboradores relataram que a prevalência de distúrbios cognitivos em pacientes infectados pelo HIV aumenta concomitantemente com a idade (Becker JT e cols., 2004). No entanto, não acreditamos que isto tenha interferido em nossa prevalência, uma vez que incluímos pacientes com uma mediana de idade de 33 anos, ou seja, uma população predominantemente jovem, o que demonstra que a idade não se apresentou como uma variável de confundimento que tenha interferido em nossos resultados.

Estudos que avaliaram a prevalência de HANDs, em pacientes infectados pelo HIV em coortes no Brasil, observaram uma variação de 36,5 a 62% (Fernandes Filho SM, e cols., 2012; de Almeida SM, e cols., 2013; Rodrigues RA, e cols., 2013). Esses estudos avaliaram populações distintas entre si, com metodologias individualizadas, tornando, portanto, difícil a comparação destes dados entre si, bem como em relação aos dados por nós encontrados.

Rodrigues e colaboradores avaliaram a prevalência de HANDs em uma amostra de 187 pacientes infectados pelo HIV, com e sem exposição aos antirretrovirais, em acompanhamento ambulatorial no INI/FIOCRUZ. Estes autores observaram uma prevalência de HANDs de 52,4%, e uma prevalência de DAH de 15%. Neste trabalho, assim como no nosso, foram excluídos os pacientes com infecção oportunista e doenças psiquiátricas e/ou neurológicas. No entanto, diferentemente da nossa abordagem, também avaliaram pacientes em uso de TARVc, com menor contagem de linfócitos T CD4⁺ (mediana de CD4⁺: 392 células/mm³), o que explica terem observado uma maior prevalência das HANDs quando comparados aos nossos dados (52 vs 40,5%) (Rodrigues RA e cols., 2013).

Além de avaliarem a prevalência das HANDs, Rodrigues e colaboradores (2013) validaram, em uma coorte de pacientes brasileiros, o uso da Escala Internacional de Demência pelo HIV (EID-HIV; *International HIV Dementia Scale – IHDS*), uma ferramenta mais simples que a escala descrita por Antinori e colaboradores (2007). Ao utilizarmos um valor de corte (*cutoff*) de 11 pontos (≤ 11) na EID-HIV para rastreio de HANDs, como sugerido pelos autores, detectamos 74% dos pacientes com algum grau de alteração cognitiva. Estes dados corroboram a validação da EIH-HIV, descrita pelo referido trabalho, e nos apontam para uma ferramenta de triagem mais simples para detecção das HANDs.

Uma característica que diferencia nossos dados da maioria dos estudos é o fato de termos avaliado uma população mais homogênea, sem exposição prévia aos antirretrovirais. No entanto, como nosso critério de inclusão contemplava pacientes infectados pelo HIV assintomáticos, sem comorbidades neurológicas, a prevalência de 40,5% das HANDs, não detectáveis através da avaliação clínica de rotina, nos evidenciou que a ocorrência de HANDs é frequente subdiagnosticada.

Os mecanismos envolvidos na ocorrência das HANDs ainda não são bem estabelecidos. No entanto, a inflamação sistêmica, a toxicidade pelos antirretrovirais e ação direta do próprio HIV estão envolvidas na patogênese dos distúrbios cognitivos nos pacientes infectados pelo vírus.

A inflamação sistêmica tem sido descrita como capaz de favorecer o desenvolvimento de condições neurodegenerativas, tais como a esclerose múltipla e a doença de Alzheimer (Perry VH e cols., 2003), além de interferir no desenvolvimento de alterações cognitivas na população geral (Reichenberg e cols., 2001; Strandberg TE e cols., 2003). Boasso e Sherer descrevem que a ativação crônica da imunidade inata faz parte da imunopatogênese da síndrome da imunodeficiência humana (Boasso e

Shearer, 2008), o que também contribui para o desenvolvimento das HANDs (Anderson E e cols., 2001).

Marcadores inflamatórios foram descritos como estando associados à progressão da infecção pelo HIV (Lau e cols., 2006; Kuller e cols., 2008). Atualmente já é bem estabelecido que a própria infecção pelo HIV conduz à ativação crônica do sistema imune, mantendo um estado pró-inflamatório persistente (Mogensen e cols., 2010; Airoidi e cols., 2012), com o aumento dos níveis de citocinas circulantes no sangue periférico e no sistema nervoso central, o que parece contribuir para o desenvolvimento das HANDs (Reichenberg e cols., 2001; Strandberg TE e cols., 2003). Deste modo, analisamos mediadores, inflamatórios e neurodegenerativos, no momento da inclusão no estudo, buscando compreender de que modo estão envolvidos no desenvolvimento, bem como na possibilidade de auxiliarem no diagnóstico das HANDs.

Em nossas análises, a maioria dos biomarcadores inflamatórios (88%) apresentavam níveis plasmáticos abaixo do limite de detecção. Acreditamos que a pouca detecção destes biomarcadores estava relacionada com o perfil de pacientes incluídos: indivíduos infectados pelo HIV assintomáticos, sem doenças definidoras de quadros de SIDA, e, portanto, sem um importante acometimento da imunidade.

Ao compararmos níveis plasmáticos de biomarcadores, inflamatórios e neurodegenerativos entre os pacientes incluídos e voluntários não HIV, observamos concentrações significativamente maiores nos pacientes infectados pelo HIV. Estudos anteriores que compararam dosagens de biomarcadores entre HIV e não HIV também encontraram resultados semelhantes (Cohen e cols., 2011; Pedersen KK, e cols., 2013).

Observações anteriores sobre a relação de mediadores inflamatórios e alterações cognitivas apresentaram resultados controversos. Harezlak e colaboradores avaliaram um grupo de pacientes infectados pelo HIV, em uso regular de

antirretrovirais, e demonstraram que, apesar do uso da TARVc, persistiram os distúrbios dentro de um contexto de uma doença crônica e estável, associados com um aumento da atividade inflamatória no SNC (Harezlak J e cols., 2011). Por um outro lado, Pedersen e colaboradores avaliaram uma população de pacientes infectados pelo HIV, em uso de TARVc, com viremia controlada; observaram que os níveis de citocinas plasmáticas não estiveram associados com a redução da função cognitiva (Pedersen KK, e cols., 2013).

Deste modo, embora o estado pró-inflamatório persistente já tenha sido descrito como um mecanismo associado ao desenvolvimento de distúrbios cognitivos associados ao HIV (Harezlak J e cols., 2011), nossos dados não sugerem que a inflamação sistêmica tenha sido determinante para a ocorrência das HANDs.

Existe uma busca por um biomarcador, preferencialmente plasmático, que possa identificar, e até mesmo classificar o grau de declínio cognitivo dos pacientes infectados pelo HIV. O nadir da contagem de células CD4⁺ é bem estabelecido como sendo um marcador de prognóstico e evolução da infecção pelo HIV (Miller V e cols., 1999; Brey S e cols., 2012). Tem sido proposto como um preditor para o desenvolvimento das HANDs na era pós HAART (Robertson KR e cols., 2007; Ellis RJ, e cols., 2011; Heaton RK e cols., 2011). Em nossa coorte, a contagem de células CD4⁺ não esteve associada ao diagnóstico de HANDs, o que pode ser explicado pela alta contagem de células CD4⁺ da população avaliada.

Sun e colaboradores avaliaram pacientes infectados pelo HIV, já em uso de terapia antirretroviral, buscando a identificação de biomarcadores capazes de detectar a ocorrência das HANDs. Neste trabalho, os autores observaram uma prevalência de HANDs de 38,6%; no entanto, os biomarcadores plasmáticos (LPS, sCD14 e ApoE) não foram capazes de discriminar o comprometimento da função cognitiva nestes pacientes (Sun B e cols., 2010).

Kamat e colaboradores identificaram um conjunto de biomarcadores (CXCL9, CXCL10, sIL-2R, e sCD14) que, concomitantemente, marcaram um estado de ativação imune nos pacientes infectados pelo HIV (Kamat A e cols., 2013). Não existe, ainda, na literatura, um painel de biomarcadores que possam identificar a ocorrência das HANDs. Cassol e colaboradores (2013) avaliaram uma coorte de pacientes em uso de antirretrovirais, e consideraram que, pelo caráter multifatorial de elementos que contribuem para o desenvolvimento das HANDs, não seja possível identificar um único biomarcador capaz de diagnosticar os quadros de HANDs (Cassol E e cols., 2013).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*), uma neurotrofina envolvida na regulação neuronal, é bem descrita como atuante na neuroproteção. Na infecção pelo HIV é descrita uma diminuição nos níveis de BDNF, o que pode ser um mecanismo envolvido na patogênese das HANDs (Avdoshina V e cols., 2011).

Em quadros de infecção viral aguda, foram observados níveis aumentados de BDNF no líquido de pacientes com diagnóstico de meningoencefalite pelo vírus Epstein-Barr. Este aumento esteve relacionado com a severidade do dano cerebral dos pacientes com meningoencefalite pelo vírus Epstein-Barr (Chiaretti A e cols., 2014). Em modelos experimentais de sepse, níveis aumentados de BDNF estiveram associado com uma melhor performance cognitiva, sugerindo um mecanismo de proteção cognitiva desempenhado pelo BDNF (Biff D e cols., 2013).

Observamos níveis séricos de BDNF mais elevados nos pacientes infectados pelo HIV, quando comparados com os não HIV. Acreditamos que este aumento seja um mecanismo compensatório, de proteção, principalmente por serem os pacientes com a infecção pelo HIV ainda em estágio inicial, sem comprometimento importante da imunidade. Nossos dados diferem dos encontrados por Avdoshina e colaboradores, quando compararam os níveis de BDNF no plasma de pacientes HIV vs não HIV,

observaram o inverso: níveis mais baixos de BDNF nos pacientes infectados pelo vírus. Esta diferença foi provavelmente pelas características da amostra avaliada pelo referido autor: pacientes com imunodeficiência avançada e cerca de 50% usuários de drogas, o que pode ter afetado as dosagens de BDNF (Avdoshina V e cols., 2011).

Ao compararmos os níveis de biomarcadores plasmáticos entre os pacientes infectados pelo HIV, agrupados de acordo com a avaliação cognitiva (N vs DCL+DCA vs DAH), não observamos diferenças significativas. Pelo caráter transversal do nosso estudo, não conseguimos definir se o aumento de biomarcadores observado nos pacientes infectados pelo HIV, quando comparados aos não HIV, teve uma relação causal nas alterações cognitivas.

Quando comparamos os níveis de BDNF entre os pacientes infectados pelo HIV, observamos uma tendência de níveis mais baixos nos pacientes com DAH, quando comparados aos demais grupos. Embora não tenhamos observado diferença significativa, os níveis mais baixos de BDNF no plasma dos pacientes com DAH corroboram a hipótese de que a infecção pelo HIV diminui os níveis de BDNF, e que esta diminuição está relacionada ao desenvolvimento das HANDs.

Embora estudos tenham descrito alterações precoces nos biomarcadores plasmáticos em pacientes infectados pelo HIV, em nosso estudo estes não parecem estar precocemente relacionados ao desenvolvimento das HANDs, e nem mesmo se mostraram capazes de auxiliar no seu diagnóstico.

Até o momento, não existe nenhum tratamento voltado especificamente para a reversão ou controle das HANDs. No entanto, a TARVc é a única medida que comprovadamente diminuiu a prevalência das HANDs (Sacktor cols., 2001; Heaton RK e cols., 2011). Além disso, a TARVc promove uma melhora dos quadros de disfunção cognitiva (Robertson KR, e cols., 2004; McCutchan JA, e cols., 2007), sem, entretanto,

impedir completamente o desenvolvimento ou a progressão das HANDs (Joska JA, e cols.; 2010; Letendre SL, e cols., 2010; Harezlak J, e cols., 2011).

Apesar de os antirretrovirais propiciarem um controle adequado na replicação viral plasmática, e atualmente seu uso ser mandatório, é descrito que estas drogas podem cursar com toxicidade neuronal, sendo um possível mecanismo relacionado com o desenvolvimento das HANDs.

Efeitos secundários neurológicos causados pelos antirretrovirais já foram demonstrados (Clifford DB, e cols., 2005; Robertson e cols., 2010). Os Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos (ITRNs) podem causar dano axonal através da indução de lesão mitocondrial e rearranjo de microtúbulos (Robinson e cols., 2007). Os ITRNs também são descritos como capazes de aumentar o estresse oxidativo, induzindo maior toxicidade, e este pode ser um mecanismo envolvido no desenvolvimento da Demência Associada ao HIV (Opii WO e cols., 2007). O Efavirenz, um Inibidor da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeo (ITRNN), é capaz de promover efeitos secundários neurológicos em mais de 50% dos pacientes (Staszewski S, e cols., 1999).

Estudos recentes, avaliando a população infectada pelo HIV, recomendam o início cada vez mais precoce da TARVc, mesmo a despeito de altas contagens de células CD4⁺, pois seu uso está relacionado a uma maior sobrevida, maior período sem o desenvolvimento dos quadros de SIDA, maior período de supressão viral, além de uma menor taxa de transmissão do vírus (Panos G, e cols., 2008; Grinsztejn B, e cols., 2014; INSIGHT START Study Group, e cols., 2015; Lodi S, e cols., 2015). No Brasil, as diretrizes do Ministério da Saúde, vigentes no período em que iniciamos nosso estudo, não recomendavam o início de TARVc em pacientes assintomáticos com contagem de CD4⁺ acima de 350 células/mm³ (Ministério da Saúde, Brasil, 2008). Pelas diretrizes mais atuais do Ministério da Saúde, de 2013, estimula-se que o início da TARVc ocorra

de maneira mais precoce, independente da sintomatologia e da contagem de células CD4⁺ (Ministério da Saúde, Brasil, 2013).

Deste modo, como os antirretrovirais têm capacidade para gerar um efeito de neurotoxicidade direta, acreditamos que a avaliação de um grupo de pacientes sem uso prévio de antirretrovirais elimine os efeitos confundidores sobre distúrbios cognitivos, nos fornecendo uma avaliação com menos interferências externas sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das HANDs.

Além da inflamação sistêmica e da toxicidade pelos antirretrovirais, a ação direta do HIV sobre o SNC é um mecanismo bem descrito, associado ao desenvolvimento das HANDs. A barreira hematoencefálica (BHE) desempenha um papel importante, funcionando como uma separação fisiológica entre o SNC e a circulação periférica, mantendo o cérebro como um santuário. A infecção pelo HIV leva à perda de continuidade da barreira hematoencefálica (Ivey e cols., 2009), com infiltração precoce do vírus ao SNC (An SF e cols., 1999).

Já foi demonstrado que o próprio HIV apresenta tropismo pelo SNC, sendo neuroinvasivo, neurotrópico e neurovirulento (Patrick MK e cols., 2002), e que a entrada do vírus no SNC ocorre desde a fase aguda de infecção, principalmente através da utilização de monócitos infectados (Meltzer MS e cols., 1990; Kaul M e cols., 2001).

Dentre os mecanismos envolvidos na patogênese das HANDs, podemos destacar o efeito direto do HIV *per se*, e neurotoxicidade indireta das próprias proteínas virais, principalmente Tat e gp120. Embora os neurônios não se infectem pelo HIV-1, expressam receptores de superfície (CCR5 e CXCR4); são, então, ativados por proteínas virais (Tat e gp120) e mediadores inflamatórios liberados por células do sistema imune no SNC (Gendelman HE e cols., 1994), levando a dano neuronal (Everall IP e cols., 1993), mecanismo central no desenvolvimento das HANDs.

A exposição de pericitos à proteína viral Tat 1 leva a um aumento da expressão de PDGF-bb (*Platelet-derived growth factor-bb*) (Niu F e cols., 2014). E, embora a PDGF-bb participe do desenvolvimento de pericitos, já foi constatado que, em altas concentrações pode cursar com perda de pericitos (Hosaka K e cols., 2013), o que pode estar relacionado à quebra de BHE. Em nossos resultados, observamos uma tendência de elevação dos séricos de PDGF-bb nos pacientes com DAH, quando comparados aos demais grupos, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento das HANDs neste grupo.

A população por nós avaliada não apresentou um padrão de biomarcadores plasmáticos compatíveis com um estado pró-inflamatório exacerbado. Pelas características da nossa amostra - pacientes assintomáticos e sem uso de antirretrovirais -, acreditamos que o RNA viral circulante tenha atingido o SNC, sendo este o principal mecanismo responsável pelos distúrbios cognitivos que observamos.

Além da análise de biomarcadores plasmáticos, foram realizadas sequências anatômicas e técnicas mais avançadas de ressonância magnética cerebral, incluindo a Espectroscopia e Imagem do Tensor de Difusão (*Diffusion Tensor Image*).

Nossa avaliação da ressonância magnética estrutural não evidenciou diferenças de volume cerebral quando comparamos os pacientes infectados pelo HIV, agrupados de acordo com a avaliação neurocognitiva (normal, DCL+DCA e DAH). Também não observamos alterações estruturais que explicassem os achados de alterações neurocognitivas que encontramos.

Heaps e colaboradores observaram que pacientes infectados pelo HIV com diagnóstico de HANDs, quando comparados com pacientes não HIV, apresentavam volumes cerebrais menores. Além disto, estes mesmos autores, de maneira semelhante aos nossos dados, quando compararam o volume cerebral entre pacientes infectados pelo HIV, com e sem o diagnóstico de HANDs, não observaram diferenças

estatisticamente significativas na ressonância magnética estrutural (Heaps JM e cols., 2015).

Bonnet e colaboradores avaliaram uma coorte de pacientes infectados pelo HIV, em diferentes estágios da doença; observaram, através da ressonância magnética, que a presença de alteração neurocognitiva esteve associada à diminuição da substância cinzenta (Bonnet e cols., 2013).

Assim, embora estudos, utilizando ressonância magnética estrutural de pacientes com HANDs, mostrem atrofia em substância branca (Risacher e cols., 2013), esses achados não foram capazes de diferenciar precocemente o estado neurocognitivo dos pacientes infectados pelo HIV.

Além da neuroimagem estrutural, avaliamos também a espectroscopia de prótons por RM dos pacientes incluídos. Observamos um aumento na relação dos níveis de MI/NAA (Mio-Inositol / N-acetil-aspartato) no grupo de pacientes classificados como portadores de Demência Associada ao HIV (DAH), quando comparado aos demais grupos neurocognitivos (N e DCL/DCA).

Na espectroscopia, a concomitante redução dos níveis de NAA e a elevação dos níveis de MI acarretam um aumento da relação MI/NAA, inicialmente descrita como uma ferramenta capaz de auxiliar no diagnóstico de demência na Doença de Alzheimer; foi atribuído o valor de 0,52 na relação MI/NAA como possível ferramenta diagnóstica de Doença de Alzheimer (Shonk TK, e cols., 1995). Posteriormente, outros autores constataram que a relação de MI/NAA não foi capaz de discriminar portadores da Doença de Alzheimer dos controles normais (Silveira de Souza A e cols., 2011).

Observamos uma relação MI/NAA de 0,40 nos pacientes classificados como portadores de DAH. Esta relação foi significativamente maior nos pacientes com DAH, quando comparada aos demais grupos cognitivos (N e DCL+DCA, 0,34 e 0,33, respectivamente). Além de esta relação não estar padronizada como ferramenta

diagnóstica de quadros demenciais associados ao HIV, o fato de termos realizado exames em um aparelho de Ressonância Magnética de 3 Tesla também impediria a comparação desses achados com o proposto por Shonk e colaboradores, que usaram um equipamento com 1,5 Tesla (Shonk TK e cols., 1995).

Estudos que avaliaram populações mais heterogêneas que o nosso, observaram alterações na espectroscopia relacionadas com alterações cognitivas. Chang e colaboradores avaliaram pacientes com contagem de $CD4^+$ <500 células/mm³, correlacionando metabólitos cerebrais, função cognitiva e RNA viral no plasma. Os autores observaram que baixas contagens de células $CD4^+$ e elevados níveis do RNA viral no plasma estiveram associados com aumento de Mio-Inositol (MI) na substância branca frontal, o que, por sua vez, se relacionou à presença de déficit na função executiva. Estes dados sugerem que fatores sistêmicos, como a quantificação do RNA viral, podem conduzir à proliferação e ativação de células gliais, o que pode contribuir para déficits em funções executivas nos pacientes infectados pelo HIV (Chang e cols., 2002).

Valcour e colaboradores avaliaram uma coorte de pacientes infectados pelo HIV; estes, como na população que avaliamos, não haviam sido expostos à terapia antirretroviral e apresentavam uma média de contagem de células $CD4^+$ de 236 células/mm³. Embora não tenham utilizado TARVc previamente, apresentavam contagem de $CD4$ inferior ao observado por nós, o que demonstra um maior comprometimento da imunidade nos pacientes deste estudo. Os autores observaram uma prevalência de HANDs de 46%, o que esteve associado a alterações compatíveis com injúria neuronal, observadas pela espectroscopia, como diminuição da N-Acetil Aspartato e aumento nos níveis de Mio-Inositol (Valcour VG, e cols., 2013).

Além das avaliações de neuroimagem estrutural e espectroscopia de prótons por ressonância magnética, avaliamos também a imagem do tensor de difusão - DTI –

Diffusion Tensor Imaging. O DTI apresenta uma maior sensibilidade para detecção de ruptura da integridade microestrutural da substância branca, podendo fornecer uma indicação precoce do desenvolvimento dos quadros de DAH (Berger e Avison, 2001). Estratégias como DTI têm sido utilizadas na tentativa de quantificar a lesão cerebral que pode não ser evidente em técnicas de imagens convencionais, e nem através de exames físicos de rotina (Wu e cols., 2006). Além disso, o DTI nos fornece uma evidência indireta de que a inflamação, afetando fibras da substância branca, seu citoesqueleto ou constituintes da mielina é, pelo menos, um mecanismo através do qual a infecção pelo HIV afeta o cérebro (Pfefferbaum e cols., 2007).

Analisando o DTI nos pacientes incluídos, os valores de FA (*Fractional Anisotropy*) estiveram significativamente reduzidos em algumas regiões, especialmente no corpo caloso (CC) e na substância branca frontal (SBF) nos pacientes infectados pelo HIV classificados como portadores de DAH, quando comparados aos demais grupos cognitivos. Assim como no FA, a análise do MD (*Mean Diffusivity*) nos evidenciou valores médios significativamente maiores nos pacientes com diagnóstico de Demência Associada ao HIV.

Filippi e colaboradores avaliaram 10 pacientes infectados pelo HIV, em um grupo bem mais heterogêneo que nossa amostra, com importante dispersão na contagem de linfócitos T CD4⁺, variando de 6 a 1536 células/mm³; encontraram resultados semelhantes aos nossos em relação ao DTI (Filippi CG e cols., 2001). Assim como em nossa observação, os referidos autores não detectaram pela ressonância magnética convencional alterações que sugerissem acometimento de substância branca embora, através da análise do DTI, tenham verificado alterações na substância branca subcortical e no corpo caloso (Filippi CG e cols., 2001). Estes dados sugerem, assim como os nossos, que, apesar de avaliações de neuroimagem estrutural muitas vezes não apresentarem alterações, o DTI é capaz de evidenciar, de maneira mais precoce,

achados que possam explicar os distúrbios cognitivos nos pacientes infectados pelo HIV.

Correa DG e colaboradores compararam pacientes infectados pelo HIV, com e sem comprometimento da função executiva; observaram que o DTI é capaz de detectar anormalidades na substância branca em pacientes com avaliação estrutural aparentemente normal (Corrêa DG e cols., 2015).

Wright e colaboradores avaliaram a integridade da substância branca de pacientes com infecção aguda pelo HIV, com uma mediana de tempo decorrido, desde a infecção até a análise, de 4,1 meses, e observaram que estes pacientes mantiveram íntegra sua microestrutura (Wright PW e cols., 2015). Estes dados nos sugerem que, embora o vírus atinja precocemente o SNC, a substância branca permanece íntegra na infecção aguda pelo HIV, quando avaliada pelo DTI.

Estes mesmos autores, avaliando pacientes cronicamente infectados pelo HIV, observaram que esses apresentam alteração de integridade de substância branca, e que esta perda se correlacionou com biomarcadores de infecção e inflamação (mensuração plasmática de RNA viral; contagem de células T CD4⁺) (Wright PW, e cols., 2015).

Já é bem estabelecido que lesão axonal se associa com o prognóstico neurológico em doenças da substância branca e em infecções do sistema nervoso central (Medana e cols., 2003). Deste modo, as relações observadas entre as reduções de FA e a ocorrência de déficits cognitivos nos pacientes infectados pelo HIV podem ser resultantes de lesão axonal, decorrente, provavelmente, de insultos neuronais deflagrados pelo próprio vírus.

Uma limitação do nosso estudo é o fato de não termos realizado coleta de líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes incluídos. Não o fizemos pelo fato de todos os participantes serem neurologicamente assintomáticos. Biomarcadores do

LCR, incluindo a quantificação do RNA viral, poderiam fornecer dados mais robustos relacionados a disfunção cerebral.

Avaliando uma coorte de pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos, observamos uma prevalência de 40,5% de HANDs, associada a uma baixa detecção de biomarcadores inflamatórios. Além disso, os biomarcadores não foram capazes de diferenciar os graus de comprometimento cognitivo dos pacientes incluídos. Nas análises estruturais do SNC, através de ressonância magnética, observamos alterações compatíveis com insulto neuronal e distúrbios de conectividade. Acreditamos, portanto que, por não termos influência de infecções oportunistas, nem do uso de antirretrovirais em uma população jovem, o principal mecanismo envolvido no desenvolvimento das HANDs nos pacientes avaliados seria a ação direta do próprio HIV.

6. Conclusões

Em uma população de pacientes infectados pelo HIV, clinicamente assintomáticos, encontramos uma prevalência de alterações cognitivas de 40,5%. Dentre os pacientes incluídos, 29% apresentaram Déficit Cognitivo Leve e/ou Déficit cognitivo assintomático, e 11,5 foram classificados com Demência Associada ao HIV.

Os pacientes com DAH apresentaram alterações nos seis domínios cognitivos avaliados (atenção e velocidade de processamento de informação, coordenação motora, memória, linguagem, funções visoespaciais/visuoconstrutivas e habilidade motora).

Os pacientes infectados pelo HIV apresentaram concentrações aumentadas de mediadores inflamatórios circulantes, quando comparados aos controles (não HIV); os biomarcadores não foram capazes de diferenciar os pacientes quanto ao grau de comprometimento de sua capacidade cognitiva.

As análises dos exames de Ressonância Magnética não nos evidenciaram alterações macroestruturais compatíveis com o déficit cognitivo observado. No entanto, os dados da tractografia evidenciaram alterações compatíveis com insulto neuronal e distúrbios de conectividade de substância branca.

Existem, nos pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos e sem um comprometimento importante da imunidade, alterações cognitivas subdiagnosticadas. Dentre os principais mecanismos que estão envolvidos na fisiopatologia das HANDs, a toxicidade pelo próprio vírus parece ser o mais precoce e importante, o que sugere estar relacionado com as alterações de conectividade de substância branca observada nos pacientes com HANDs.

7. Referências

Airoldi M, Bandera A, Trabattoni D, Tagliabue B, Arosio B, Soria A, Rainone V, Lapadula G, Annoni G, Clerici M, Gori A. Neurocognitive impairment in HIV-infected naïve patients with advanced disease: the role of virus and intrathecal immune activation. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:467154.

Albright AV, Soldan SS, González-Scarano F. Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol*. 2003 Apr;9(2):222-7.

Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*. 2007 Jul;4(3):316-29.

An SF, Groves M, Gray F, Scaravilli F: Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, 58(11):1156–1162.

Ances BM, Ellis RJ. Dementia and neurocognitive disorders due to HIV-1 infection. *Semin Neurol*. 2007 Feb;27(1):86-92.

Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D, Mefford M, Morgello S, Singer EJ, Wolinsky SM, Gabuzda D. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One*. 2008 Jun 25;3(6):e2516.

Anderson E, Zink W, Xiong H, Gendelman HE. HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Oct 1;31 Suppl 2:S43-54.

Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 2007; 69:1789–99.

Avdoshina V, Garzino-Demo A, Bachis A, Monaco MC, Maki PM, Tractenberg RE, Liu C, Young MA, Mocchetti I. HIV-1 decreases the levels of neurotrophins in human lymphocytes. *AIDS*. 2011 May 15;25(8):1126-8.

Aylward EH, Henderer JD, McArthur JC, et al. Reduced basal ganglia volume in HIV-1-associated dementia: results from quantitative neuroimaging. *Neurology*. Oct; 1993 43(10):2099–2104.

Baker JV, Neuhaus J, Duprez D, Kuller LH, Tracy R, Belloso WH, De Wit S, Drummond F, Lane HC, Ledergerber B, Lundgren J, Nixon DE, Paton NI, Neaton JD; INSIGHT SMART Study Group. Changes in inflammatory and coagulation biomarkers: a randomized comparison of immediate versus deferred antiretroviral therapy in patients with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 Jan 1;56(1):36-43.

Baroncelli S, Galluzzo CM, Pirillo MF, Mancini MG, Weimer LE, Andreotti M, Amici R, Vella S, Giuliano M, Palmisano L. Microbial translocation is associated with residual viral replication in HAART-treated HIV+ subjects with <50copies/ml HIV-1 RNA. *J Clin Virol*. 2009 Dec;46(4):367-70.

Becker JT, Lopez OL, Dew MA, Aizenstein HJ. Prevalence of cognitive disorders differs as a function of age in HIV virus infection. *AIDS*. 2004 Jan 1;18 Suppl 1:S11-8.

Berghuis JP, Uldall KK, Lalonde B. Validity of two scales in identifying HIV-associated dementia. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 21:134–40.

Biff D, Petronilho F, Constantino L, Vuolo F, Zamora-Berridi GJ, Dall'Igna DM, Comim CM, Quevedo J, Kapczinski F, Dal-Pizzol F. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock*. 2013 Jul;40(1):45-8.

Boasso A, Shearer GM. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol*. 2008 Mar;126(3):235-42. Epub 2007 Oct 3. Review.

Boissé L, Gill MJ, Power C. HIV infection of the central nervous system: clinical features and neuropathogenesis. *Neurol Clin*. 2008 Aug;26(3):799-819, x. doi: 10.1016/j.ncl.2008.04.002.

Bonnet F, Amieva H, Marquant F, Bernard C, Bruyand M, Dauchy FA, Mercié P, Greib C, Richert L, Neau D, Catheline G, Dehail P, Dabis F, Morlat P, Dartigues JF, Chêne G; S CO3 Aquitaine Cohort. Cognitive disorders in HIV-infected patients: are they HIV-related? *AIDS*. 2013 Jan 28;27(3):391-400.

Bottiggi KA, Chang JJ, Schmitt FA, et al. The HIV Dementia Scale: predictive power in mild dementia and HAART. *J Neurolog Sci* 2007; 260:11–15.

Bozza FA, D'Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock*. 2013 May;39 Suppl 1:10-6.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365-71.

Carey CL, Woods SP, Rippeth JD, et al. Initial validation of a screening battery for the detection of HIV-associated cognitive impairment. *Clin Neuropsychol* 2004; 18:234–48.

Cassol E, Misra V, Morgello S, Gabuzda D. Applications and limitations of inflammatory biomarkers for studies on neurocognitive impairment in HIV infection. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Dec;8(5):1087-97. doi: 10.1007/s11481-013-9512-2.

Castillo M, Kwock L, Mukherji SK. Clinical applications of proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996 Jan;17(1):1-15.

Chang L, Ernst T, Witt MD, Ames N, Gaiefsky M, Miller E. Relationships among brain metabolites, cognitive function, and viral loads in antiretroviral-naïve HIV patients. *Neuroimage*. 2002 Nov;17(3):1638-48

Chauhan A, Turchan J, Pocernich C, Bruce-Keller A, Roth S, Butterfield DA, Major EO, Nath A. Intracellular human immunodeficiency virus Tat expression in astrocytes promotes astrocyte survival but induces potent neurotoxicity at distant sites via axonal transport. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):13512-9.

Chen Y, An H, Zhu H, et al. White matter abnormalities revealed by diffusion tensor imaging in non-demented and demented HIV+ patients. *NeuroImage*. Oct 1; 2009 47(4):1154–1162.

Chiaretti A, Capozzi D, Mariotti P, Valentini P, Manni L, Buonsenso D, Fantacci C, Ferrara P. Increased levels of neurotrophins in the cerebrospinal fluid of children with Epstein-Barr virus meningoencephalitis. *Int J Infect Dis*. 2014 Mar;20:52-7.

Clifford DB, Evans S, Yang Y, Acosta EP, Goodkin K, Tashima K, Simpson D, Dorfman D, Ribaldo H, Gulick RM. Impact of efavirenz on neuropsychological performance and symptoms in HIV-infected individuals. *Ann Intern Med*. 2005 Nov 15;143(10):714-21.

Cohen RA, de la Monte S, Gongvatana A, Ombao H, Gonzalez B, Devlin KN, Navia B, Tashima KT. Plasma cytokine concentrations associated with HIV/hepatitis C coinfection are related to attention, executive and psychomotor functioning. *J Neuroimmunol*. 2011 Apr;233(1-2):204-10.

Coiras M, Lopez-Huertas MR, Alcami J. HIV-1 latency and eradication of long-term viral reservoirs. *Discov Med*. 2010 Mar;9(46):185-91. Review.

Corrêa DG, Zimmermann N, Doring TM, Wilner NV, Leite SC, Cabral RF, Fonseca RP, Bahia PR, Gasparetto EL. Diffusion tensor MR imaging of white matter integrity in HIV-positive patients with planning deficit. *Neuroradiology*. 2015 May;57(5):475-82.

Cusini A, Vernazza PL, Yerly S, Decosterd LA, Ledergerber B, Fux CA, Rohrbach J, Widmer N, Hirschel B, Gaudenz R, Cavassini M, Klimkait T, Zenger F, Gutmann C, Opravil M, Günthard HF; Swiss HIV Cohort Study. Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013 Jan 1;62(1):28-35.

Cysique LA, Maruff P, Brew BJ. Prevalence and pattern of neuropsychological impairment in human immunodeficiency virus infected/acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS) patients across pre and post-highly active antiretroviral therapy eras: a combined study of two cohorts. *J Neurovirol*. 2004;10:350–7.

de Almeida SM, Ribeiro CE, de Pereira AP, Badiee J, Cherner M, Smith D, Maich I, Raboni SM, Rotta I, Barbosa FJ, Heaton RK, Umlauf A, Ellis RJ. Neurocognitive impairment in HIV-1 clade C- versus B-infected individuals in Southern Brazil. *J Neurovirol.* 2013 Dec;19(6):550-6.

De Cock KM, Jaffe HW, Curran JW. The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS.* 2012 Jun 19;26(10):1205-13. doi: 10.1097/QAD.0b013e328354622a. Review.

de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan;10(1):133-9.

Decloedt EH, Maartens G. Neuronal toxicity of efavirenz: a systematic review. *Expert Opin Drug Saf.* 2013 Nov;12(6):841-6.

Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med.* 2011;62:141-55. doi: 10.1146/annurev-med-042909-093756. Review.

Deeks, Effros RB, Fletcher CV, Gebo K, Halter JB, Hazzard WR, Horne FM, Huebner RE, Janoff EN, Justice AC, Kuritzkes D, Nayfield SG, Plaeger SF, Schmader KE, Ashworth JR, Campanelli C, Clayton CP, Rada B, Woolard NF, High KP. Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis.* 2008 Aug 15;47(4):542-53.

Dewey J, Hana G, Russell T, et al. Reliability and validity of MRI-based automated volumetry software relative to auto-assisted manual measurement of subcortical structures in HIV-infected patients from a multisite study. *NeuroImage.* Jul 15; 2010 51(4):1334–1344.

Du H, Wu Y, Ochs R, et al. A comparative evaluation of quantitative neuroimaging measurements of brain status in HIV infection. *Psychiatry research.* Jul 30; 2012 203(1):95–99.

Edén A, Fuchs D, Hagberg L, Nilsson S, Spudich S, Svennerholm B, Price RW, Gisslén M. HIV-1 viral escape in cerebrospinal fluid of subjects on suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1819-25.

Elbirt D, Mahlab-Guri K, Bezalel-Rosenberg S, Gill H, Attali M, Asher I. HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). *Isr Med Assoc J.* 2015 Jan;17(1):54-9.

Ellis RJ, Badiee J, Vaida F, Letendre S, Heaton RK, Clifford D, Collier AC, Gelman B, McArthur J, Morgello S, McCutchan JA, Grant I; CHARTER Group. CD4 nadir is a predictor of HIV neurocognitive impairment in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS.* 2011 Sep 10;25(14):1747-51.

Epple HJ, Zeitz M. HIV infection and the intestinal mucosal barrier. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jul;1258:19-24.

European AIDS Clinical Society. Guidelines for treatment of HIV infected adults in Europe. <http://www.europeanaidsclicinalsociety.org>. Accessed Jul 14, 2015.

Everall IP, Luthert PJ, Lantos PL. Neuronal number and volume alterations in the neocortex of HIV infected individuals. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993 May;56(5):481-6.

Fernandes Filho SM, de Melo HR. Frequency and risk factors for HIV-associated neurocognitive disorder and depression in older individuals with HIV in northeastern Brazil. *Int Psychogeriatr*. 2012 Oct;24(10):1648-55.

Filippi CG, Ulug AM, Ryan E, Ferrando SJ, van Gorp W. Diffusion tensor imaging of patients with HIV and normal-appearing white matter on MR images of the brain. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001 Feb;22(2):277-83.

Firbank MJ, Harrison RM, O'Brien JT. A comprehensive review of proton magnetic resonance spectroscopy studies in dementia and Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002;14(2):64-76.

Gendelman HE, Lipton SA, Tardieu M, Bukrinsky MI, Nottet HS. The neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol*. 1994 Sep;56(3):389-98.

Gisslen M, Hagberg L, Rosengren L, BJ, Cinque P, Spudich S, Price RW. Defining and evaluating HIV-related neurodegenerative disease and its treatment targets: a combinatorial approach to use of cerebrospinal fluid molecular biomarkers. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007 Mar;2(1):112-9.

Gladsjo, J.A., et al., *Norms for letter and caegory fluency: Demographic corrections for age, education, and ethnicity*. *Assessment*, 1999. 6(2): p. 147-178.

Gongvatana A, Cohen RA, Correia S, et al. Clinical contributors to cerebral white matter integrity in HIV-infected individuals. *Journal of neurovirology*. Oct; 2011 17(5):477-486

Griffin WS. Neuroinflammatory cytokine signaling and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013 Feb 21;368(8):770-1.

Grinsztejn B, Hosseinipour MC, Ribaud HJ, Swindells S, Eron J, Chen YQ, Wang L, Ou SS, Anderson M, McCauley M, Gamble T, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Pilotto JH, Godbole SV, Chariyalertsak S, de Melo MG, Mayer KH, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Makhema J, Mills LA, Panchia R, Sanne I, Gallant J, Hoffman I, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Havlir D, Cohen MS; HPTN 052-ACTG Study Team. Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: results from the phase 3 HPTN 052 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014 Apr;14(4):281-90.

Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency

virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2003 Nov;77(21):11708-17.

Harezlak J, Buchthal S, Taylor M, Schifitto G, Zhong J, Daar E, Alger J, Singer E, Campbell T, Yiannoutsos C, Cohen R, Navia B; HIV Neuroimaging Consortium. Persistence of HIV-associated cognitive impairment, inflammation, and neuronal injury in era of highly active antiretroviral treatment. *AIDS*. 2011 Mar 13;25(5):625-33.

Hasse B, Ledergerber B, Furrer H, Battegay M, Hirschel B, Cavassini M, Bertisch B, Bernasconi E, Weber R; Swiss HIV Cohort Study. Morbidity and aging in HIV-infected persons: the Swiss HIV cohort study. *Clin Infect Dis*. 2011 Dec;53(11):1130-9.

Heaps JM, Sithinamsuwan P, Paul R, Lerdlum S, Pothisri M, Clifford D, Tipsuk S, Catella S, Busovaca E, Fletcher JL, Raudabaugh B, Ratto-Kim S, Valcour V, Ananworanich J; SEARCH 007/011 study groups. Association between brain volumes and HAND in cART-naïve HIV+ individuals from Thailand. *J Neurovirol*. 2015 Apr;21(2):105-12.

Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR Jr, Woods SP, Ake C, Vaida F, Ellis RJ, Letendre SL, Marcotte TD, Atkinson JH, Rivera-Mindt M, Vigil OR, Taylor MJ, Collier AC, Marra CM, Gelman BB, McArthur JC, Morgello S, Simpson DM, McCutchan JA, Abramson I, Gamst A, Fennema-Notestine C, Jernigan TL, Wong J, Grant I; CHARTER Group. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology*. 2010 Dec 7;75(23):2087-96.

Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, McCutchan JA, Letendre SL, Leblanc S, Corkran SH, Duarte NA, Clifford DB, Woods SP, Collier AC, Marra CM, Morgello S, Mindt MR, Taylor MJ, Marcotte TD, Atkinson JH, Wolfson T, Gelman BB, McArthur JC, Simpson DM, Abramson I, Gamst A, Fennema-Notestine C, Jernigan TL, Wong J, Grant I; CHARTER Group; HNRC Group. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol*. 2011 Feb;17(1):3-16.

Heindel WC, Jernigan TL, Archibald SL, Achim CL, Masliah E, Wiley CA. The relationship of quantitative brain magnetic resonance imaging measures to neuropathologic indexes of human immunodeficiency virus infection. *Archives of neurology*. Nov; 1994 51(11):1129–1135.

Hoare J, Westgarth-Taylor J, Fouche JP, et al. A diffusion tensor imaging and neuropsychological study of prospective memory impairment in South African HIV positive individuals. *Metabolic brain disease*. Sep; 2012 27(3):289–297.

Hosaka K, Yang Y, Seki T, Nakamura M, Andersson P, Rouhi P, Yang X, Jensen L, Lim S, Feng N, Xue Y, Li X, Larsson O, Ohhashi T, Cao Y. Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nat Commun*. 2013;4:2129.

INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, Avihingsanon A, Cooper DA, Fätkenheuer G, Llibre JM, Molina JM, Munderi P, Schechter M, Wood R, Klingman KL, Collins S, Lane HC, Phillips AN, Neaton JD. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med*. 2015 Aug 27;373(9):795-807.

Ivey NS, MacLean AG, Lackner AA. Acquired immunodeficiency syndrome and the blood-brain barrier. *J Neurovirol*. 2009 Apr;15(2):111-22

Jaeger LB, Nath A. Modeling HIV-associated neurocognitive disorders in mice: new approaches in the changing face of HIV neuropathogenesis. *Dis Model Mech*. 2012 May;5(3):313-22.

Jaquet A, Garanet F, Balestre E, Ekouevi DK, Azani JC, Bognounou R, Dah E, Kondombo JC, Dabis F, Drabo J. Antiretroviral treatment and quality of life in Africans living with HIV: 12-month follow-up in Burkina Faso. *J Int AIDS Soc*. 2013 Dec 18;16:18867.

Joska JA, Gouse H, Paul RH, Stein DJ, Flisher AJ. Does highly active antiretroviral therapy improve neurocognitive function? A systematic review. *J Neurovirol*. 2010 Mar;16(2):101-14.

Kamat A, Lyons JL, Misra V, Uno H, Morgello S, Singer EJ, Gabuzda D. Monocyte activation markers in cerebrospinal fluid associated with impaired neurocognitive testing in advanced HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 Jul 1;60(3):234-43.

Kamat A, Misra V, Cassol E, Ancuta P, Yan Z, Li C, Morgello S, Gabuzda D. A plasma biomarker signature of immune activation in HIV patients on antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2012;7(2):e30881.

Kaul M, Garden GA, Lipton SA. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*. 2001 Apr 19;410(6831):988-94.

Kaul M, Lipton SA. Mechanisms of neuronal injury and death in HIV-1 associated dementia. *Curr HIV Res*. 2006 Jul;4(3):307-18.

Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP Jr. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004 Sep;61(1):35-9.

Knippels HM, Goodkin K, Weiss JJ, Wilkie FL, Antoni MH. The importance of cognitive self-report in early HIV-1 infection: validation of a cognitive functional status subscale. *AIDS* 2002; 16:259–67.

Kuller LH, Tracy R, Belloso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, Ledergerber B, Lundgren J, Neuhaus J, Nixon D, Paton NI, Neaton JD; INSIGHT SMART Study Group. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med*. 2008 Oct 21;5(10):e203.

Kwo-On-Yuen PF, Newmark RD, Budinger TF, Kaye JA, Ball MJ, Jagust WJ. Brain N-acetyl-L-aspartic acid in Alzheimer's disease: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Brain Res.* 1994 Dec 26;667(2):167-74.

Lau B, S. R., Kingsley LA, Post W, Palella FJ, Visscher B, Gange SJ (2006). "C-Reactive Protein Is a Marker for Human Immunodeficiency Virus Disease Progression." *Arch Intern Med* 166: 64-70.

Letendre S, FitzSimons C, Ellis R, et al. Correlates of CSF viral loads in 1221 volunteers of the CHARTER cohort. [Abstract 172.] 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). 2010, San Francisco, USA.

Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, et al.; the CHARTER Group. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol* 2008;65: 65-70.

Letendre SL, Ellis RJ, Ances BM, McCutchan JA. Neurologic complications of HIV disease and their treatment. *Top HIV Med.* 2010 Apr-May;18(2):45-55.

Li C, Zhang X, Komery A, Li Y, Novembre FJ, Herndon JG. Longitudinal diffusion tensor imaging and perfusion MRI investigation in a macaque model of neuro-AIDS: a preliminary study. *NeuroImage.* Sep 1; 2011 58(1):286–292

Li W, Li G, Steiner J, Nath A. Role of Tat protein in HIV neuropathogenesis. *Neurotox Res.* 2009 Oct;16(3):205-20.

Lodi S, Phillips A, Logan R, Olson A, Costagliola D, Abgrall S, et al. Comparative effectiveness of immediate antiretroviral therapy versus CD4-based initiation in HIV-positive individuals in high-income countries: observational cohort study. *The Lancet HIV.* 2015. 2(8):e335–43.

Lyons JL, Uno H, Ancuta P, Kamat A, Moore DJ, Singer EJ, Morgello S, Gabuzda D. 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):371-9.

Marcondes MC, Burdo TH, Sopper S, Huitron-Resendiz S, Lanigan C, Watry D, Flynn C, Zandonatti M, Fox HS. Enrichment and persistence of virus-specific CTL in the brain of simian immunodeficiency virus-infected monkeys is associated with a unique cytokine environment. *J Immunol.* 2007 May 1;178(9):5812-9.

Marcondes MC, Burudi EM, Huitron-Resendiz S, Sanchez-Alavez M, Watry D, Zandonatti M, Henriksen SJ, Fox HS. Highly activated CD8(+) T cells in the brain correlate with early central nervous system dysfunction in simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5429-38.

Marra CM, Zhao Y, Clifford DB, et al. Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS* 2009; 23: 1359-66.

Masters MC, Ances BM. Role of neuroimaging in HIV-associated neurocognitive disorders. *Semin Neurol*. 2014 Feb;34(1):89-102.

Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1093-7.

McArthur JC, Brew BJ, Nath A. Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurol*. 2005;4(9):543–55.

McArthur JC, Steiner J, Sacktor N, Nath A. Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: Mind the gap. *Ann Neurol* 2010; 67: 699-714.

McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jan;10(1):11-23.

Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain*. 2003 Mar;126(Pt 3):515-30.

Medina DA, Gaviria M. Diffusion tensor imaging investigations in Alzheimer's disease: the resurgence of white matter compromise in the cortical dysfunction of the aging brain. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008 Aug;4(4):737-42.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, Shet A, Low A, Mohri H, Boden D, Racz P, Markowitz M. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med*. 2006 Dec;3(12):e484.

Meltzer MS, Skillman DR, Gomatos PJ, Kalter DC, Gendelman HE: Role of mononuclear phagocytes in the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Annu Rev Immunol* 1990, 8:169–194.

Mind Exchange Working Group. Assessment, diagnosis, and treatment of HIV-associated neurocognitive disorder: a consensus report of the mind exchange program. *Clin Infect Dis*. 2013 Apr;56(7):1004-17.

Mind Exchange Working Group. Assessment, diagnosis, and treatment of HIV-associated neurocognitive disorder: a consensus report of the mind exchange program. *Clin Infect Dis*. 2013 Apr;56(7):1004-17.

Ministério da Saúde, Brasil, 2008. Programa Nacional de DST e AIDS, Secretária de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV. 7ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.

Ministério da Saúde, Brasil, 2013. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.

Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010 Jun 22;7:54.

Morgan EE, Woods SP, Scott JC, et al.; the HIV Neurobehavioral Research Center (HNRC) Group. Predictive validity of demographically adjusted normative standards for the HIV Dementia Scale. *J Clin Exp Neuropsychol* 2008; 30:83–90.

Muñoz-Moreno JA, Fumaz CR, Prats A, Ferrer MJ, Negrodo E, Pérez-Alvarez N, Moltó J, Gómez G, Garolera M, Clotet B. Interruptions of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection: are they detrimental to neurocognitive functioning? *J Neurovirol*. 2010 May;16(3):208-18.

Nasi M, Pinti M, Mussini C, Cossarizza A. Persistent inflammation in HIV infection: established concepts, new perspectives. *Immunol Lett*. 2014 Oct;161(2):184-8.

Nath A. Human immunodeficiency virus (HIV) proteins in neuropathogenesis of HIV dementia. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1;186 Suppl 2:S193-8.

Nichols SL, Bethel J, Garvie PA, Patton DE, Thornton S, Kapogiannis BG, Ren W, Major-Wilson H, Puga A, Woods SP. Neurocognitive functioning in antiretroviral therapy-naïve youth with behaviorally acquired human immunodeficiency virus. *J Adolesc Health*. 2013 Dec;53(6):763-71.

Niu F, Yao H, Zhang W, Sutliff RL, Buch S. Tat 101-mediated enhancement of brain pericyte migration involves platelet-derived growth factor subunit B homodimer: implications for human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders. *J Neurosci*. 2014 Aug 27;34(35):11812-25.

Njamnshi AK, Djientcheu VDP, Fonsah JY, et al. The International HIV Dementia Scale is a useful screening tool for HIV-associated dementia/cognitive impairment in HIV-infected adults in Yaounde, Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 49:393–7.

Opii WO, Sultana R, Abdul HM, Ansari MA, Nath A, Butterfield DA. Oxidative stress and toxicity induced by the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI)--2',3'-dideoxycytidine (ddC): relevance to HIV-dementia. *Exp Neurol*. 2007 Mar;204(1):29-38.

Panos G, Samonis G, Alexiou VG, Kavarnou GA, Charatsis G, Falagas ME. Mortality and morbidity of HIV infected patients receiving HAART: a cohort study. *Curr HIV Res*. 2008 May;6(3):257-60.

Patrick MK, Johnston JB, Power C. Lentiviral neuropathogenesis: comparative neuroinvasion, neurotropism, neurovirulence, and host neurosusceptibility. *J Virol*. 2002 Aug;76(16):7923-31.

Pedersen KK, Pedersen M, Gaardbo JC, Ronit A, Hartling HJ, Bruunsgaard H, Gerstoft J, Ullum H, Nielsen SD. Persisting inflammation and chronic immune activation but intact cognitive function in HIV-infected patients after long-term treatment with combination antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013 Jul 1;63(3):272-9.

Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Feb;4(2):103-12. Review.

Persidsky Y, Ghorpade A, Rasmussen J, Limoges J, Liu XJ, Stins M, Fiala M, Way D, Kim KS, Witte MH, Weinand M, Carhart L, Gendelman HE. Microglial and astrocyte chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol*. 1999 Nov;155(5):1599-611.

Pfefferbaum A, Rosenbloom MJ, Rohlfing T, Kemper CA, Deresinski S, Sullivan EV. Frontostriatal fiber bundle compromise in HIV infection without dementia. *Aids*. Sep 24; 2009 23(15):1977–1985.

Power C, Selnes OA, Grim JA, McArthur JC. HIV Dementia Scale: a rapid screening test. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 8:273–8.

Power, C., et al., *HIV Dementia Scale: A rapid screening test*. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 1995. 8(3): p. 273-278.

Price RW, Epstein LG, Becker JT, Cinque P, Gisslen M, Pulliam L, McArthur JC. Biomarkers of HIV-1 CNS infection and injury. *Neurology*. 2007 Oct 30;69(18):1781-8.

Pugh CR, Johnson JD, Martin D, Rudy JW, Maier SF, Watkins LR. Human immunodeficiency virus-1 coat protein gp120 impairs contextual fear conditioning: a potential role in AIDS related learning and memory impairments. *Brain Res*. 2000 Apr 7;861(1):8-15.

Rao JS, Kim HW, Kellom M, Greenstein D, Chen M, Kraft AD, Harry GJ, Rapoport SI, Basselin M. Increased neuroinflammatory and arachidonic acid cascade markers, and reduced synaptic proteins, in brain of HIV-1 transgenic rats. *J Neuroinflammation*. 2011 Aug 16;8:101.

Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, Pollmächer T. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 May;58(5):445-52.

Risacher SL, Saykin AJ. Neuroimaging biomarkers of neurodegenerative diseases and dementia. *Semin Neurol*. 2013 Sep;33(4):386-416.

Roberts L, Passmore J-AS, Williamson C, Little F, Bebell LM, Mlisana K, et al. Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression: *AIDS*. 2010 Mar;24(6):819–31.

Roberts L, Passmore JA, Williamson C, Little F, Bebell LM, Mlisana K, Burgers WA, van Loggerenberg F, Walzl G, Djoba Siawaya JF, Karim QA, Karim SS. Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS*. 2010 Mar 27;24(6):819-31.

Robertson K, Kumwenda J, Supparatpinyo K, Jiang JH, Evans S, Campbell TB, Price RW, Murphy R, Hall C, Marra CM, Marcus C, Berzins B, Masih R, Santos B, Silva MT, Kumarasamy N, Walawander A, Nair A, Tripathy S, Kanyama C, Hosseinipour M, Montano S, La Rosa A, Amod F, Sanne I, Firnhaber C, Hakim J, Brouwers P; AIDS Clinical Trials Group. A multinational study of neurological performance in antiretroviral therapy-naïve HIV-1-infected persons in diverse resource-constrained settings. *J Neurovirol*. 2011 Oct;17(5):438-47.

Robertson K, Liner J, Meeker RB. Antiretroviral neurotoxicity. *J Neurovirol*. 2012 Oct;18(5):388-99.

Robertson K, Yosief S. Neurocognitive assessment in the diagnosis of HIV-associated neurocognitive disorders. *Semin Neurol*. 2014 Feb;34(1):21-6.

Robertson KR, Robertson WT, Ford S, et al. Highly active antiretroviral therapy improves neurocognitive functioning. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;36:562–566.

Robertson KR, Smurzynski M, Parsons TD, Wu K, Bosch RJ, Wu J, et al. The prevalence and incidence of neurocognitive impairment in the HAART era. *AIDS*. 2007;21:1915–21.

Robertson KR, Su Z, Margolis DM, Krambrink A, Havlir DV, Evans S, Skiest DJ; A5170 Study Team. Neurocognitive effects of treatment interruption in stable HIV-positive patients in an observational cohort. *Neurology*. 2010 Apr 20;74(16):1260-6.

Robinson B, Li Z, Nath A. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors and human immunodeficiency virus proteins cause axonal injury in human dorsal root ganglia cultures. *J Neurovirol*. 2007 Apr;13(2):160-7.

Rodrigues RA, Oliveira RL, Grinsztejn B, Silva MT. Validity of the International HIV dementia scale in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013 Jun;71(6):376-9.

Ross AC, Rizk N, O'Riordan MA, Dogra V, El-Bejjani D, Storer N, et al. Relationship between inflammatory markers, endothelial activation markers, and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2009 Oct 1;49(7):1119-27.

Ross BD, Bluml S, Cowan R, Danielsen E, Farrow N, Gruetter R. In vivo magnetic resonance spectroscopy of human brain: the biophysical basis of dementia. *Biophys Chem*. 1997 Oct;68(1-3):161-72.

Ross BD, Bluml S, Cowan R, Danielsen E, Farrow N, Gruetter R. In vivo magnetic resonance spectroscopy of human brain: the biophysical basis of dementia. *Biophys Chem*. 1997 Oct;68(1-3):161-72.

Ryan LA, Zheng J, Brester M, Bohac D, Hahn F, Anderson J, Ratanasuwan W, Gendelman HE, Swindells S. 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.

Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, et al. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multicohort collaboration. *Lancet* 2008; 371:1417–1426;

Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, Becker JT, Cohen B, McArthur JC; Multicenter AIDS Cohort Study. HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology*. 2001 Jan 23;56(2):257-60.

Sacktor NC, Wong M, Nakasujja N, et al. The International HIV Dementia Scale: a new rapid screening test for HIV dementia. *AIDS* 2005; 19:1367–74. 30.

Sacktor NC, Wong M, Nakasujja N, Skolasky RL, Selnes OA, Musisi S, et al. The International HIV Dementia Scale: a new rapid screening test for HIV dementia. *AIDS Lond Engl*. 2005 Sep 2;19(13):1367–74.

Sailasuta N, Ross W, Ananworanich J, Chalermchai T, DeGruttola V, Lerdlum S, Pothisri M, Busovaca E, Ratto-Kim S, Jagodzinski L, Spudich S, Michael N, Kim JH, Valcour V; RV254/SEARCH 010 protocol teams. Change in brain magnetic resonance spectroscopy after treatment during acute HIV infection. *PLoS One*. 2012;7(11):e49272.

Schleicher GK, Herbert V, Brink A, Martin S, Maraj R, Galpin JS, et al. Procalcitonin and C-reactive protein levels in HIV-positive subjects with tuberculosis and pneumonia. *Eur Respir J*. 2005 Apr;25(4):688-92.

Schoenberg, M.R., et al., *Test performance and classification statistics for the Rey Auditory Verbal Learning Test in selected clinical samples*. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 2006. **21**(7): p. 693-703.

Schuff N, Amend DL, Meyerhoff DJ, Tanabe JL, Norman D, Fein G, Weiner MW. Alzheimer disease: quantitative H-1 MR spectroscopic imaging of frontoparietal brain. *Radiology*. 1998 Apr;207(1):91-102.

Shen L, Siliciano RF. Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jul;122(1):22-8.

Sheridan, L.K., et al., *Normative Symbol Digit Modalities Test performance in a community-based sample*. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 2006. **21**(1): p. 23-28.

Shiramizu B, Gartner S, Williams A, Shikuma C, Ratto-Kim S, Watters M, Aguon J, Valcour V. Circulating proviral HIV DNA and HIV-associated dementia. *AIDS*. 2005 Jan 3;19(1):45-52.

Shonk TK, Moats RA, Gifford P, Michaelis T, Mandigo JC, Izumi J, Ross BD. Probable Alzheimer disease: diagnosis with proton MR spectroscopy. *Radiology*. 1995 Apr;195(1):65-72.

Siami S, Annane D, Sharshar T. The encephalopathy in sepsis. *Crit Care Clin.* 2008 Jan;24(1):67-82, viii. doi: 10.1016/j.ccc.2007.10.001.

Silveira de Souza A, de Oliveira-Souza R, Moll J, Tovar-Moll F, Andreiuolo PA, Bottino CM. Contribution of ¹H spectroscopy to a brief cognitive-functional test battery for the diagnosis of mild Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2011;32(5):351-61.

Simioni S, Cavassini M, Annoni JM, Rimbault Abraham A, Bourquin I, Schiffer V, Calmy A, Chave JP, Giacobini E, Hirschel B, Du Pasquier RA. Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS.* 2010 Jun 1;24(9):1243-50.

Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, Rachlis A, Skiest D, Stanford J, Stryker R, Johnson P, Labriola DF, Farina D, Manion DJ, Ruiz NM. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med.* 1999 Dec 16;341(25):1865-73.

Stejskal E, Tanner J. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time Dependent Field Gradient. *J Chem Phys.* 1965 42: 288–292.

Stout JC, Ellis RJ, Jernigan TL, Archibald SL, Abramson I, Wolfson T, McCutchan JA, Wallace MR, Atkinson JH, Grant I. Progressive cerebral volume loss in human immunodeficiency virus infection: a longitudinal volumetric magnetic resonance imaging study. HIV Neurobehavioral Research Center Group. *Arch Neurol.* 1998 Feb;55(2):161-8.

Strandberg TE, Pitkala KH, Linnavuori KH, Tilvis RS. Impact of viral and bacterial burden on cognitive impairment in elderly persons with cardiovascular diseases. *Stroke.* 2003 Sep;34(9):2126-31.

Strauss, E., O. Spreen, and M. Hunter, *Implications of test revisions for research.* Psychological Assessment, 2000. 12(3): p. 237-244.

Stubbe-Drger B, Deppe M, Mohammadi S, et al. Early microstructural white matter changes in patients with HIV: a diffusion tensor imaging study. *BMC neurology.* 2012; 12:23.

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. *J Neurovirol.* 2010 Mar;16(2):115-24.

Tate DF, Sampat M, Harezlak J, et al. Regional areas and widths of the midsagittal corpus callosum among HIV-infected patients on stable antiretroviral therapies. *Journal of neurovirology.* Aug; 2011 17(4):368–379.

Torres TS, Cardoso SW, Velasque Lde S, Marins LM, Oliveira MS, Veloso VG, Grinsztejn B. Aging with HIV: an overview of an urban cohort in Rio de Janeiro (Brazil) across decades of life. *Braz J Infect Dis.* 2013 May-Jun;17(3):324-31.

Towgood KJ, Pitkanen M, Kulasegaram R, et al. Mapping the brain in younger and older asymptomatic HIV-1 men: frontal volume changes in the absence of other cortical or diffusion tensor abnormalities. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*. Feb; 2012 48(2):230–241.

Valcour V, Paul R, Chiao S, Wendelken LA, Miller B. Screening for cognitive impairment in human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2011 Oct;53(8):836-42.

Valcour VG, Ananworanich J, Aagsalda M, Sailasuta N, Chalermchai T, Schuetz A, Shikuma C, Liang CY, Jirajariyavej S, Sithinamsuwan P, Tipsuk S, Clifford DB, Paul R, Fletcher JL, Marovich MA, Slike BM, DeGruttola V, Shiramizu B; SEARCH 011 Protocol Team. HIV DNA reservoir increases risk for cognitive disorders in cART-naïve patients. *PLoS One*. 2013 Jul 31;8(7):e70164.

Vignali DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1-2):243-55. Review.

Vom Berg J, Prokop S, Miller KR, Obst J, Kälin RE, Lopategui-Cabezas I, Wegner A, Mair F, Schipke CG, Peters O, Winter Y, Becher B, Heppner FL. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med*. 2012 Dec;18(12):1812-9.

Whitehead N, Potterton J, Coovadia A. The neurodevelopment of HIV-infected infants on HAART compared to HIV-exposed but uninfected infants. *AIDS Care*. 2014 Apr;26(4):497-504.

Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, Lampert PW, Oldstone MB. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(18):7089-93.

Wright PW, Heaps JM, Shimony JS, Thomas JB, Ances BM. The effects of HIV and combination antiretroviral therapy on white matter integrity. *Aids*. Jul 31; 2012 26(12):1501–1508.

Wright PW, Vaida FF, Fernández RJ, Rutlin J, Price RW, Lee E, Peterson J, Fuchs D, Shimony JS, Robertson KR, Walter R, Meyerhoff DJ, Spudich S, Ances BM. Cerebral white matter integrity during primary HIV infection. *AIDS*. 2015 Feb 20;29(4):433-42.

Wu Y, Storey P, Cohen BA, Epstein LG, Edelman RR, Ragin AB. Diffusion alterations in corpus callosum of patients with HIV. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006 Mar;27(3):656-60.

Yuan L, Qiao L, Wei F, Yin J, Liu L, Ji Y, Smith D, Li N, Chen D. Cytokines in CSF correlate with HIV-associated neurocognitive disorders in the post-HAART era in China. *J Neurovirol*. 2013 Apr;19(2):144-9.

Zhu T, Zhong J, Hu R, et al. Patterns of white matter injury in HIV infection after partial immune reconstitution: a DTI tract-based spatial statistics study. *Journal of neurovirology*. Feb; 2013 19(1):10–23.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

TÍTULO: Disfunção cognitiva e infecção pelo HIV: identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo estabelecer uma melhor compreensão das alterações neurológicas em pacientes soropositivos, para desenvolver formas mais eficientes de diagnosticar, acompanhar e tratar as alterações cerebrais associadas ao HIV. Este estudo servirá para descobrir se você tem alguma alteração cerebral, que possa ou não estar relacionada ao HIV.

PROPOSTA DO ESTUDO

O Sr(a) _____ está sendo convidado a participar deste estudo, que incluirá avaliação neurológica, da resposta imune, bem como das alterações cerebrais encontradas na ressonância magnética cerebral relacionadas a infecção pelo HIV.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Você participará de uma bateria de avaliações clínicas, com duração de cerca de 1 hora, incluindo um exame neurológico detalhado, onde serão realizados testes para verificar como seu cérebro está funcionando. Os testes avaliarão sua memória, atenção, concentração, movimento e coordenação.

Estes testes podem ter alguns incômodos relacionados as perguntas de natureza pessoal (hábitos, escolaridade, ...), um leve desconforto pelo toque do diapasão ou pelas leves batidas com o martelo de reflexo, especialmente se seus nervos estão afetados. Os clínicos que fazem os testes serão gentis e tentarão diminuir qualquer desconforto para você. Você também pode sentir-se cansado durante os testes de função cerebral. Você poderá interromper a avaliação clínica a qualquer momento durante o exame.

Será realizada a coleta de uma amostra de sangue de 10 (dez) ml, através de uma punção de veia periférica, utilizando-se material estéril e descartável. Este procedimento é semelhante à coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. Estes exames serão colhidos na entrada do estudo e após 24 e 48 semanas.

Após a análise inicial, estas amostras ficaram armazenadas por 48 meses, para eventuais necessidades de realização de novas dosagens e/ou análises. Estas amostras estarão sob a responsabilidade do coordenador do estudo, Dr. Fernando Augusto Bozza.

Além disto, será realizado um exame de imagem do cérebro, mais especificamente uma ressonância magnética do cérebro, na entrada no estudo. A repetição do exame de imagem se fará necessária apenas se ao longo do estudo você venha a apresentar algum tipo de alteração neurológica.

Os custos de transporte para a realização dos exames de imagem, fora do IPEC, serão ressarcidos com verba do orçamento do projeto.

BENEFÍCIOS

Podem haver benefícios com sua participação, pois doenças neurológicas podem ser descobertas no seu estágio inicial. Este estudo poderá ajudar a entender melhor os fenômenos ligados às alterações neurológicas no paciente infectado pelo vírus HIV, buscando a identificação de possíveis métodos capazes de fazer um diagnóstico precoce destas alterações.

DESCONFORTOS E RISCOS

Os desconfortos que podem ocorrer são aqueles relacionados a uma retirada normal de sangue para exame, como dor no local da punção venosa e formação de um hematoma local. Os exames de imagem serão realizados fora do IPEC, e antes da realização dos mesmos você será devidamente informado sobre os riscos, incômodos e contra-indicações, podendo se negar a realizá-los. Este estudo não implica em qualquer modificação do tratamento empregado ou administração de medicamentos experimentais.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NO ESTUDO

A participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar, bem como cancelar sua participação a qualquer momento do estudo. Esta decisão não afetará de nenhuma maneira os cuidados médicos que lhe serão oferecidos.

CONFIDENCIALIDADE

O seu nome não será mencionado em publicações ou relatórios produzidos para este estudo. Entretanto seu prontuário médico poderá ser consultado pelos profissionais envolvidos no estudo.

SE VOCÊ TEM DÚVIDAS

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor, telefone para o Dr. Fernando Bozza ou Dr. Marcus Tullius nos telefones 3865-9620 ou 2562-0818 (ramal 224).

CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua assinatura significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação no estudo.

Assinatura (Paciente)

Local e Data

Se o paciente não é capaz de consentir:

A sua assinatura, como representante legal do paciente, significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação do paciente no estudo.

_____ não é capaz de dar o seu consentimento.

Nome do Paciente (em letra de forma)

Nome do Representante Legal

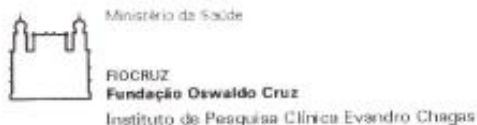
Grau de parentesco com o paciente
(em letra de forma)

Assinatura (Representante legal)

Local e Data

Anexo 2

Parecer de Aprovação no Comitê de ética em Pesquisa - CEP



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 030/2009

Protocolo 0040.0.009.000-09

1. Identificação:

Título do Projeto: "Disfunção cognitiva e infecção pelo HIV: Identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce".

Pesquisadora Responsável: Fernando Augusto Bozza.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 22/07/2009.

2. Sumário:

Visa a identificar em uma população soropositivos sem uso prévio de HAART as relações entre disfunção cognitiva, resposta inflamatória sistêmica e alterações morfológicas e metabólicas cerebrais, visando à identificação de biomarcadores diagnósticos e prognósticos da disfunção cognitiva. Este será um estudo transversal, prospectivo, onde será formada uma coorte de indivíduos soropositivos em acompanhamento na Fundação Oswaldo Cruz que não façam uso de terapia antirretroviral no momento da inclusão e que não tenham feito uso prévio da mesma. Estes pacientes serão avaliados quanto ao status imunológico (CD4 e Carga Viral), resposta inflamatória (dosagem de citocinas) e neuroimagem (ressonância magnética). As avaliações serão realizadas em três períodos distintos: na inclusão no estudo e após 24 e 48 semanas. Todos os indivíduos selecionados para o estudo serão submetidos à avaliação clínica, laboratorial, cognitiva e ressonância magnética cerebral. Trata-se de um estudo observacional, com amostra de conveniência. Estima-se que cerca de 100 pacientes serão incluídos nos 12 meses de duração do período de inclusão do estudo.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Foram elaborados, em linguagem acessível ao sujeito da pesquisa, dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, um que se refere ao projeto em geral e um segundo, específico para o procedimento de Ressonância Magnética. Este projeto foi submetido ao PIPDT do IPEC.

4. Diligências:

Não houve.

5. Parecer: APROVADO.

Data: 30 de julho de 2009.

Assinatura do Coordenador:

Lea Camillo-Coura

Dr.ª Lea Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

Anexo 3

FICHA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DO ESTUDO “Disfunção cognitiva e infecção pelo HIV: Identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce”

Nome: _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Prontuário:

Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ anos Naturalidade: _____/___

Ocupação: _____

COR/ RAÇA

1. BRANCA

2. PRETA

3. AMARELA

4. PARDA

5. INDÍGENA

ESCOLARIDADE/ ANOS DE ESTUDO

0. ANALFABETO

1. 1 A 3 ANOS

2. 4 A 7 ANOS

3. 8 A 10 ANOS

4. 11 A 14 ANOS

5. 15 ANOS OU MAIS

9. IGNORADO

DATAS E DADOS REFERENTES AO ESTUDO

Data da coleta de amostras de soro e plasma _____/_____/____

Data da realização da avaliação cognitiva (neurologia) _____/_____/____

Data da realização da Ressonância Magnética _____/_____/____

Data da realização da Punção Lombar _____/_____/____

DADOS RELACIONADOS AO HIV:

Data do diagnóstico: ___/___/___

Motivo do diagnóstico:

1. () Exames de rotina

2. () Sintomatologia não relacionada ao HIV

3. () Parceiro positivo

4. () Comportamento de risco

5. () Exames pré operatórios

6. () Doação de sangue

7. () Filho de mãe soropositiva

8. () Outros. Especificar: _____

Data do início no acompanhamento no ambulatório do IPEC: ___/___/___

DADOS LABORATORIAIS (data mais próxima possível da coleta de amostras para o estudo)

CD4		___/___/___
CD8		___/___/___
Carga Viral		___/___/___
Log Carga Viral		___/___/___
Hemoglobina		___/___/___
Hematócrito		___/___/___
Plaquetas		___/___/___
Creatinina		___/___/___
		___/___/___

VACINAS TOMADAS

1.() HAV	2.() Influenza	3.() Pneumocócica
4.() HBV	5.() Tétano	

CO-MORBIDADES

1.() Diabetes	2.() Doenças psiquiátricas	3.() Insuficiência Renal
4.() HAS	5.() DPOC	6.() Hipotireoidismo
7.() Neoplasias	8.() Dislipidemia	9.() Hipertireoidismo
10() Cardiopatias	11() Hepatite/cirrose	

MEDICAMENTOS DE USO CONTÍNUO (nome e dose)

Dados sociais

1.() Tabagismo prévio _____maços/ano	2.() Etilismo prévio	3.() Drogas ilícitas qual:_____
4.() Tabagismo atual	5.() Etilismo atual	

Anexo 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, específico para a realização de Ressonância Magnética

REGISTRO MÉDICO	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
	<ul style="list-style-type: none"> • Adulto ou responsável por participante menor de idade

INSTITUIÇÕES: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz e Rede LABS-D'Or

NÚMERO DO PROTOCOLO: 09-_____

TÍTULO DO PROTOCOLO: Disfunção Cognitiva e HIV: Identificação biomarcadores para o diagnóstico precoce

Introdução

O Senhor (a) está convidado a participar de uma pesquisa científica realizada pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz e Rede LABS-D'Or.

Primeiro, gostaríamos de esclarecer que esta participação é inteiramente voluntária, isto é, você pode optar por não participar ou se retirar a qualquer momento do estudo. Embora não haja garantia de qualquer benefício pessoal, a sua participação na pesquisa certamente ajudará para o avanço do conhecimento, que poderá ajudar também muitos outros indivíduos no futuro.

Abaixo descreveremos o projeto de pesquisa. Por favor, leia com atenção e retire suas dúvidas com o pesquisador responsável.

Justificativa

A infecção pelo HIV-1 é um problema mundial de saúde pública. Com a introdução da terapia antiretroviral de alta eficácia houve um aumento da sobrevivência destes pacientes. E com o aumento da sobrevivência, houve um aumento da ocorrência de doenças crônico-degenerativas, incluindo as neurológicas, dentre estas o complexo demência AIDS (CDA). A fisiopatologia destas alterações cognitivas nos pacientes soropositivos não está completamente caracterizada, se tendo a necessidade ainda de uma maior compreensão dos mecanismos responsáveis pelo dano cognitivo e do desenvolvimento de instrumentos objetivos para uma identificação mais precisa e precoce.

Aumentar o conhecimento sobre este tema poderá, no futuro, nos auxiliar no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e tratamentos médicos que beneficiarão pacientes soropositivos ou portadores de outras patologias.

Objetivo do estudo

Este projeto tem como objetivo investigar e descrever as alterações neurológicas, inflamatórias, anatômicas e funcionais (por técnicas de ressonância magnética) em pacientes soropositivos, sem uso prévio de antiretrovirais. Os dados colhidos neste estudo poderão ajudar a entender as relações entre disfunção cognitiva, resposta inflamatória sistêmica e alterações morfológicas e metabólicas cerebrais.

Benefícios

O principal benefício relacionado à sua participação nesta pesquisa é a contribuição que o Sr. ou a Sra. estarão dando para o entendimento de como a infecção pelo HIV pode afetar o cérebro e suas funções. Estas informações poderão ser de grande relevância para a saúde e vida de outras pessoas. Informações sobre os temas relacionados ao estudo estarão ao seu dispor, caso lhe interesse.

Procedimentos a serem realizados e possíveis desconfortos

Se o Sr. ou a Sra. aceitar participar deste deverá responder a uma série de perguntas e de testes sobre as questões de interesse a pesquisa.

Caso seja paciente, oriundo de algum serviço clínico, a fim de facilitar o estudo, o Sr. ou a Sra. nos darão, através deste Termo, o consentimento para coletar as informações diretamente da sua ficha clínica.

O Sr(a). também será submetido ao exame de Ressonância magnética. A Ressonância Magnética é um instrumento que gera imagens do cérebro de alta qualidade e que não usa raios X. Este exame possibilita estudar tanto a anatomia quanto a função do cérebro. O exame de Ressonância Magnética (RM) é realizado em uma sala especialmente preparada contendo o aparelho de RM acoplado a uma mesa de exame. O procedimento não apresenta nenhum risco para saúde do Sr. ou a Sra. O Sr. ou a Sra. deitarão em uma cama que será inserida num curto "túnel" da máquina de RM, colocara uma espécie de capacete (chamado bobina) que manterá sua cabeça em repouso. Através de um sistema de espelhos, você poderá ver o lado de fora e, no caso do estudo envolver avaliação de atividade cerebral, você verá uma tela de computador na qual diversos tipos de estímulo podem ser exibidos (por ex., frases escritas, imagens, vídeo-clips). Dependendo do estudo, esses estímulos poderão ter diferentes tipos. O procedimento é indolor e os desconfortos leves relacionados a ele são: (1) é a necessidade de permanecer deitado e imóvel durante o exame; (2) se sentir desconfortável se você não gostar de ficar em locais fechados (claustrofobia); (3) tirar todo tipo de metal que esteja portando; (4) a máquina de RM produz ruídos diversos de elevada intensidade, que podem ser desconfortáveis. O Sr. ou a Sra. poderão solicitar atenuadores de ruído durante o exame.

A RM utiliza um forte campo magnético e ondas de rádio. É um exame muito importante e freqüentemente usado para exames médicos de diversas patologias cerebrais. Ele é um exame muito seguro, mas mesmo assim estaremos prestando atenção em você durante todo o exame. Durante o exame, você pode se comunicar com as pessoas que estão controlando a máquina através de um sistema de alto-falantes, e, no caso de necessidade, você poderá pedir para parar o exame. Devido ao forte campo magnético, algumas pessoas não podem fazer o exame de ressonância magnética, a saber:

- O Sr. ou a Sra. não poderá entrar na máquina se possuir algum tipo de metal implantado no seu corpo, por exemplo, marca passo cardíaco, clips cirúrgicos intracranianos, fragmentos metálicos no corpo ou nos olhos, válvulas cardíacas, próteses metálicas ou de qualquer natureza ou implantes cocleares. Estes itens estão mencionados no questionário de segurança que você preencherá antes de entrar na máquina de RM. Por favor, nos comunique imediatamente se você possuir implantes metálicos.

- Na possibilidade de gravidez, é recomendável realização de um teste de gravidez antes de exame de ressonância magnética. Você poderá fazer o teste em casa até 24h antes do exame, e nós arcaremos com o custo. Embora a ressonância magnética seja considerada um procedimento seguro na gravidez, não existem ainda estudos extensos.

- Neste tipo de procedimento existe a possibilidade de detecção de alterações anatômicas cerebrais insuspeitadas ou sub-clínicas. Neste caso, a instituição se responsabilizará pelo fornecimento de laudo radiológico formal, sem nenhum custo econômico, porém não assumirá a responsabilidade por eventual necessidade de acompanhamento ou tratamento médico.

Para este tipo de investigação não existem métodos alternativos existentes que sejam bons e que tenham menor desconforto ou risco. Durante a sua participação na pesquisa, a qualquer tempo o Sr. ou a Sra. poderão solicitar maiores esclarecimentos sobre a mesma incluindo perguntas relacionadas a importância da pesquisa, aos métodos, etc. O Sr. ou a Sra. terão liberdade de se recusar a participar e de retirar o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

em qualquer momento da pesquisa sem que nenhum tipo de penalização ou prejuízo no seu cuidado. O Sr. e a Sra. têm garantia da equipe de pesquisa e do seu coordenador de que todos os dados coletados serão confidenciais e mantidos em sigilo. O Sr. não terá nenhum custo adicional relacionado com a sua participação no estudo. O Sr. ou a Sra. é livre para parar sua participação a qualquer momento sem nenhuma penalização ou prejuízo.

As informações coletadas durante a sua participação serão analisadas em conjunto com as informações dos outros pacientes e voluntários. O seu consentimento permite o uso dos dados coletados apenas para pesquisa científica e educação. Todos os dados relativos à sua participação serão mantidos em local reservado e seguro. Os dados poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições e publicados em revistas científicas, ou fazerem parte de material educacional. Nenhuma informação privada, ou que possa levar à identificação dos participantes será fornecida a terceiros.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso a representantes da equipe de pesquisa da Rede LABS-D'Or (contato com Débora Lima, Assistente de Pesquisa, email: dlima@rededor.com.br, tel. 21-2538-3541). A equipe pode ser contatada a qualquer momento para tirar qualquer dúvida ou para obter atualização sobre os resultados parciais da pesquisa. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Rede D'Or, Pesquisa Clínica-Hospital Copa D'Or, email: pclinica@copador.com.br, tel. 2545-3792.

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO

Acredito ter sido informado a respeito do estudo acima citado. As etapas do estudo ficaram claras para mim. Entendi que algumas pessoas não podem fazer ressonância magnética. Confirmando que não tenho impedimento de fazer o exame de ressonância magnética. Concordo voluntariamente em participar deste estudo. Recebi uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Estou ciente que a minha assinatura neste consentimento, como participante, não significa que estou renunciando aos meus direitos legais, de acordo com as leis vigentes no Brasil.

COMPLETE OS ITEM(S) ABAIXO:			
Consentimento do paciente Eu li e compreendi as explicações sobre este estudo e me foi dada a chance de discutir e fazer perguntas. Forneço aqui o meu consentimento para participação no protocolo de estudo.			
Assinatura do Paciente Adulto/Representante Legal		Local e Data	
ESTE DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO FOI APROVADO PARA USO A PARTIR DE ___ / ___ / ___			
Assinatura do Investigador		Assinatura da Testemunha	
Data		Data	

Anexo 5

Resultados dos testes neurocognitivos dos pacientes infectados pelo HIV na inclusão no estudo

TESTES NEUROCOGNITIVOS											
	DS	TRAIL A	TRAIL B	Fluência Verbal	GPMD	GPMD	RAVLT1/REY1	RAVLT5/REY5	REV1	REV2	EID-HIV
01	38	21	51	17	77	77	7	12	10	15	10,5
02	50	47	86	21	83	100	8	12	14	15	12,0
03	46	43	61	15	85	78	4	13	9	9	11,5
04	32	36	81	15	66	69	3	10	8	7	11,0
05	33	62	151	19	104	106	4	7	6	8	8,0
06	48	30	36	20	94	##	4	14	12	13	12,0
07	35	28	82	25	62	77	5	13	10	11	10,0
08	41	30	108	20	80	83	3	12	9	10	12,0
09	36	59	178	17	65	81	4	14	14	13	9,0
10	33	38	90	21	67	73	4	9	11	11	11,5
11	39	31	91	12	63	64	5	10	9	9	10,5
12	24	39	112	20	57	75	7	13	13	13	11,5
13	31	88	180	15	110	80	4	8	8	8	11,0
14	55	51	117	15	74	76	4	10	9	9	11,0
15	46	25	61	26	81	66	5	12	15	15	12,0
16	31	39	72	13	61	62	6	12	11	10	12,0
17	17	28	107	24	65	74	7	11	8	8	11,5
18	39	46	208	15	91	84	5	9	7	7	10,5
19	24	53	113	14	62	62	4	8	8	9	8,5
20	##	32	113	26	69	72	6	11	8	8	9,0
21	44	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
22	29	42	98	17	80	75	8	13	12	14	12,0
23	36	41	175	10	72	77	5	10	7	10	11,0
24	26	39	103	18	74	69	6	15	11	12	12,0
25	41	63	##	12	69	74	4	7	2	2	11,5
26	32	20	36	24	68	98	5	12	9	10	11,0
27	50	78	131	16	70	99	5	11	12	11	9,5
28	58	32	64	17	62	72	5	14	10	13	11,0
29	37	26	43	20	63	115	4	13	11	11	12,0
30	53	40	144	19	63	63	4	10	6	6	11,0
31	30	17	47	11	64	72	5	9	6	7	11,0
32	44	40	180	13	104	130	7	11	11	11	10,0
33	37	27	52	21	65	76	8	13	12	12	12,0
34	50	33	63	37	85	101	7	14	9	10	10,0
35	52	27	46	12	57	65	5	12	5	5	10,0

TESTES NEUROCOGNITIVOS												
	DS	TRAIL A	TRAIL B	Fluência Verbal	GPMD	GPMND	RAVLT1/REY1	RAVLT5/REY5	REV1	REV2	EID-HIV	
36	63	31	60	21	54	72	5	12	6	7	##	
37	32	22	77	20	64	70	8	13	11	11	##	
38	58	61	104	18	86	90	7	15	14	15	11,0	
39	18	17	43	31	65	64	7	12	10	9	12,0	
40	5	70	142	15	77	87	4	8	6	7	10,5	
41	41	141	##	19	80	168	4	8	3	2	12,0	
42	33	21	70	20	66	67	8	12	8	10	9,0	
43	38	28	55	17	64	82	5	12	8	7	9,0	
44	36	12	43	19	71	82	2	12	8	9	12,0	
45	17	42	80	16	70	80	5	9	8	7	12,0	
46	0	72	180	11	122	123	5	8	8	7	12,0	
47	57	159	##	12	##	##	5	5	2	2	12,0	
48	46	28	62	25	62	74	7	13	13	12	8,5	
49	40	34	45	22	69	77	5	9	7	7	10,0	
50	60	35	98	29	50	78	5	12	9	9	12,0	
51	38	20	41	31	53	61	5	12	12	13	12,0	
52	6	##	##	9	235	305	4	5	2	4	11,0	

DS: *Digit Symbol Test*; TRAIL A e B: *Trail making test* parte A e B; Teste de Fluência Verbal (FV); *Grooved Pegboard* com a mão dominante (GPMD) e com a mão não-dominante (GPMND); *Rey auditory verbal learning test* 1 e 2 (RAVLT1 e 2) e *Rey Auditory Verbal Learning Test*, primeira e segunda evocação, REV1 e REV2, respectivamente

Anexo 6

Percentual de detecção das citocinas pelo sistema multiplex nos grupos analisados

	Controle (Voluntários Sadios) (N=8)	Pacientes infectados pelo HIV, assintomáticos (N=52)
Marcadores inflamatórios		
01 IL-1 β	0%	0%
02 IL-1ra	12,5%	16%
03 IL-2	0%	2%
04 IL-4	25%	31%
05 IL-5	0%	2%
06 IL-6	12,5%	3%
07 IL-7	0%	3%
08 IL-8	100%	100%
09 IL-9	37,5%	14%
10 IL-10	0%	0%
11 IL-12	0%	3%
12 IL-13	0%	3%
13 IL-15	0%	10%
14 IL-17	0%	0%
15 FGF	12,5%	9%
16 EOTAXINA	62,5%	40%
17 G-CSF	25%	3%
18 GM-CSF	37,5	28%
19 INF- γ	25%	28%
20 IP-10	100%	100%
21 MCP-1	87,5%	53%
22 MIP-1 α	37,5%	38%
23 MIP-1 β	60%	55%
24 PDGF-bb	100%	98%
25 RANTES	25%	41%
26 TNF- α	0%	7%
27 VEGF	0%	3%
Marcadores neurodegenerativas		
28 BDNF	100%	100%
29 Catepsina D	100%	100%
30 MPO	100%	100%
31 PAI-1	100%	100%
32 PDGF-AA	100%	100%
33 PDGF-AB/BB	100%	100%
34 RANTES	100%	79%
35 sICAM-1	100%	100%
36 NCAM	100%	100%
37 sVCAM-1	87,5%	46%

Avaliação Neurocognitiva: Déficit Cognitivo Leve + Déficit Cognitivo Assintomático (DCL + DCA) → n = 15

	IL-8	PDGF-bb	IP-10	BDNF	Catepsina D	MPO	PAI-1	PDGF-AA	PDGF-AB/BB	RANTES	sICAM-1	NCAM
32	1,84	14602,22	679,37	5620,51	129945,80	16637,33	69618,07	10417,23	97907,70	##	56236,36	175477,10
33	1,49	8780,96	1386,67	7955,46	175941,50	13627,87	168193,90	2455,18	87258,74	##	99547,76	164485,70
34	1,52	4699,91	443,94	1502,24	101158,90	16245,36	45382,89	2960,43	24399,43	4675,11	34608,02	114753,30
35	0,95	66,94	695,51	97,67	107335,40	8091,79	17241,27	122,23	942,29	19858,85	74377,49	146070,70
36	0,83	271,35	1127,18	349,43	156759,50	26335,79	11995,42	768,52	2613,71	25735,00	227664,70	241382,10
37	0,98	1546,40	2786,98	1100,70	101383,70	9257,99	29394,60	2791,22	22187,70	##	107067,50	107552,30
38	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
39	0,59	1300,55	288,24	1681,01	62732,80	38855,63	36395,14	2522,45	27801,80	76849,35	99648,34	142497,60
40	1,13	6927,86	1334,49	1360,84	106903,20	45086,78	55969,95	3849,27	24243,86	18304,61	98921,19	301093,00
41	1,91	11297,63	2148,62	1533,98	168010,80	43640,52	92043,48	4556,39	26514,95	23787,76	221723,00	342771,00
42	1,23	10584,39	2556,53	1956,34	90581,10	146764,70	85572,63	4536,19	40257,98	32485,90	198330,10	227626,00
43	1,16	1397,29	284,11	914,71	79735,84	59348,70	20388,33	1382,00	21584,91	19415,76	62470,49	157048,50
44	0,83	1480,71	601,41	623,53	95852,22	24706,03	26072,24	1237,11	12309,55	1299,38	79347,37	149819,10
45	0,42	78,40	426,10	41,07	20837,30	3957,56	7031,33	33,73	33,04	##	26835,93	27687,95
46	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	56236,36	##

Avaliação Neurocognitiva: Demência Associada ao HIV (DAH) → n = 6

	IL-8	PDGF-bb	IP-10	BDNF	Catepsina D	MPO	PAI-1	PDGF-AA	PDGF-AB/BB	RANTES	sICAM-1	NCAM
47	5,11	18416,40	1633,91	2848,16	194936,10	117783,10	115938,40	8703,00	82210,23	##	121806,40	245170,70
48	2,11	8180,84	14013,23	2074,65	120679,20	153510,30	60599,82	2842,06	38104,45	21430,56	98746,38	180378,90
49	0,67	2022,43	190,38	3731,43	139059,10	26962,49	102809,40	6406,98	63848,73	13270,12	188424,10	205281,50
50	0,82	1224,19	248,93	389,22	114240,10	7675,38	15604,51	828,22	8111,79	20039,72	34128,55	110869,20
51	##	##	##	20,62	39936,63	3704,42	3425,96	116,17	164,21	2489,68	36318,56	56363,16
52	##	##	##	140,57	86901,66	19340,46	17995,48	423,53	2583,56	5146,17	63496,73	120904,10

Controles / Voluntários Sadios (Não-HIV) → n = 8

	IL-8	PDGF-bb	IP-10	BDNF	Catepsina D	MPO	PAI-1	PDGF-AA	PDGF-AB/BB	RANTES	sICAM-1	NCAM
01	0,75	108,43	257,47	53,39	49195,72	4196,61	7999,68	136,65	471,03	2615,01	35146,38	145469,20
02	0,64	143,59	335,09	115,39	39850,29	2819,00	5114,60	185,15	772,95	6057,00	30586,81	139666,80
03	2,48	4238,81	274,65	1431,60	50822,11	4423,93	23898,83	2393,22	31215,51	22386,33	42177,45	122394,40
04	0,79	119,27	199,92	180,45	115311,20	37749,54	78469,54	223,49	2106,03	7787,31	74124,47	263841,70
05	0,42	102,66	101,40	622,30	96154,64	40376,98	9899,39	916,26	6060,97	7813,58	60590,10	63619,69
06	1,54	766,34	152,04	185,69	28342,81	47336,71	6702,44	302,44	3704,18	7619,29	##	279615,20
07	1,01	218,54	146,92	186,67	65035,89	17237,58	12997,14	236,44	1653,27	8937,15	30385,93	163759,70
08	0,60	64,19	336,36	1261,83	60878,17	13530,95	32541,28	2322,16	23120,61	2615,01	156283,40	358784,10

Anexo 8: Produção científica durante o Doutorado

- a) **Amancio RT**, Japiassu AM, Gomes RN, Mesquita EC, Assis EF, Medeiros DM, Grinsztejn B, Bozza PT, Castro-Faria Neto HC, Bozza FA. The innate immune response in HIV/AIDS septic shock patients: a comparative study. PLoS One. 2013 Jul 11;8(7):e68730.
- b) Coelho L, Cardoso SW, **Amancio RT**, Moreira RI, Campos DP, Veloso VG, Grinsztejn B, Luz PM. Trends in AIDS-defining opportunistic illnesses incidence over 25 years in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS One. 2014 Jun 5;9(6):e98666. doi: 10.1371/journal.pone.0098666
- c) Six-month survival of critically ill patients with HIV-related disease and tuberculosis: a retrospective study
Ana Carla Pecego, **Rodrigo Teixeira Amancio**, Camila Ribeiro, Emersom C Mesquita, Denise M Medeiros, José Cerbino, Beatriz Grinsztejn, Fernando A Bozza and André M Japiassu
Submetido à *BMC Infectious Diseases*: 7 Janeiro 2015

Anexo 8a: Produção científica durante o Doutorado

- a) **Amancio RT**, Japiassu AM, Gomes RN, Mesquita EC, Assis EF, Medeiros DM, Grinsztejn B, Bozza PT, Castro-Faria Neto HC, Bozza FA. The innate immune response in HIV/AIDS septic shock patients: a comparative study. PLoS One. 2013 Jul 11;8(7):e68730.

The Innate Immune Response in HIV/AIDS Septic Shock Patients: A Comparative Study

Rodrigo T. Amancio¹, Andre M. Japiassu^{1,4}, Rachel N. Gomes¹, Emersom C. Mesquita¹, Edson F. Assis³, Denise M. Medeiros¹, Beatriz Grinsztejn², Patricia T. Bozza³, Hugo C. Castro-Faria Neto³, Fernando A. Bozza^{1,4*}

1 Laboratório de Medicina Intensiva, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Laboratório de HIV, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **3** Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **4** Instituto d'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

Introduction: In recent years, the incidence of sepsis has increased in critically ill HIV/AIDS patients, and the presence of severe sepsis emerged as a major determinant of outcomes in this population. The inflammatory response and deregulated cytokine production play key roles in the pathophysiology of sepsis; however, these mechanisms have not been fully characterized in HIV/AIDS septic patients.

Methods: We conducted a prospective cohort study that included HIV/AIDS and non-HIV patients with septic shock. We measured clinical parameters and biomarkers (C-reactive protein and cytokine levels) on the first day of septic shock and compared these parameters between HIV/AIDS and non-HIV patients.

Results: We included 30 HIV/AIDS septic shock patients and 30 non-HIV septic shock patients. The HIV/AIDS patients presented low CD4 cell counts (72 [7-268] cells/mm³), and 17 (57%) patients were on HAART before hospital admission. Both groups were similar according to the acute severity scores and hospital mortality. The IL-6, IL-10 and G-CSF levels were associated with hospital mortality in the HIV/AIDS septic group; however, the CRP levels and the surrogates of innate immune activation (cytokines) were similar among HIV/AIDS and non-HIV septic patients. Age (odds ratio 1.05, CI 95% 1.02-1.09, $p=0.002$) and the IL-6 levels (odds ratio 1.00, CI 95% 1.00-1.01, $p=0.05$) were independent risk factors for hospital mortality.

Conclusions: IL-6, IL-10 and G-CSF are biomarkers that can be used to predict prognosis and outcomes in HIV/AIDS septic patients. Although HIV/AIDS patients are immunocompromised, an innate immune response can be activated in these patients, which is similar to that in the non-HIV septic population. In addition, age and the IL-6 levels are independent risk factors for hospital mortality irrespective of HIV/AIDS disease.

Citation: Amancio RT, Japiassu AM, Gomes RN, Mesquita EC, Assis EF, et al. (2013) The Innate Immune Response in HIV/AIDS Septic Shock Patients: A Comparative Study. PLoS ONE 8(7): e68730. doi:10.1371/journal.pone.0068730

Editor: Jorge IF Salluh, D'or Institute of Research and Education, Brazil

Received: December 13, 2012; **Accepted:** June 3, 2013; **Published:** July 11, 2013

Copyright: © 2013 Amancio et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and PAPES/FIOCRUZ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fernando.bozza@ipeec.fiocruz.br

Introduction

A significant improvement in the prognosis of the HIV/AIDS population was observed after the introduction and widespread use of highly active antiretroviral therapy (HAART) [1]. During HAART era, the causes of hospitalization and death among HIV/AIDS patients have changed, with a relative increase on noninfectious conditions and non-AIDS-defining infections [2-5].

In recent years, the incidence of sepsis in the HIV/AIDS population has increased as a cause of Intensive Care Unit

(ICU) admission [6]. Epidemiological studies have demonstrated that approximately 1-10% of septic patients are composed of HIV/AIDS patients with regional variations due to local differences in HIV prevalence [7-12]. The presence of sepsis and severe sepsis is a major determinant of outcomes in critically ill HIV/AIDS patients, which impacts short- and long-term survival [13,14].

An excessive and deregulated inflammatory response plays a key role in the development of multiple organ dysfunctions in sepsis [15]. Cytokine measurements have been used to identify cytokine patterns that are associated with disease severity,

organ dysfunction and prognosis in septic patients [16]. Acute and chronic HIV infection triggers the release of inflammatory mediators and cytokines. In patients with advanced HIV disease, elevated C-reactive protein (CRP), IL-6 and D-dimer levels before initiating HAART are strongly associated with early mortality [17]. These inflammatory mediators have previously been evaluated in HIV/AIDS patients to stratify cardiovascular risk, disease progression, infection diagnosis and prognosis [18-20]. However, inflammatory response patterns during acute severe infection have not been systematically evaluated in HIV/AIDS patients. Therefore, the aim of this study was to evaluate the clinical and laboratorial differences between HIV/AIDS septic shock patients and non-HIV septic shock patients with focus on the surrogates of the innate immune response. Similar to the non-HIV patients, we observed that an innate immune response was triggered in the HIV/AIDS patients despite a cellular immunodeficiency due to HIV infection.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients or their surrogate decision makers, prior to any study-related procedure. The Institutional Review Board approved study protocol (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, CAAE 0014.0.009.000-08). Participants who refused to participate or were excluded by exclusion criteria were not harmed by not participating in the study.

Design and setting

We conducted a prospective multicenter cohort study of HIV/AIDS patients at the ICU of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, Brazil. This institution has provided care to HIV/AIDS patients since 1986. There are currently more than 2,000 adult patients who are actively followed up at the HIV/AIDS Clinic. We admit approximately 60-70 critically ill HIV/AIDS patients per year in the ICU at this institution. All of the consecutive HIV/AIDS adult patients (≥ 18 years of age) who were admitted to the ICU with a diagnosis of septic shock from March 2008 to December 2010 were included. Non-HIV septic shock non-HIV patients were included from three different hospitals, also located in Rio de Janeiro, Brazil: Clementino Fraga Filho University Hospital, Hospital Quinta D'Or and Casa de Saúde São José. These three different hospitals resemble each other because they are tertiary hospitals, with mixed medical-surgical ICUs, with an average of 30 beds each. HIV and non-HIV patients were enrolled according to similar criteria for septic shock.

Definitions, selection of participants and data collection

The sepsis definitions were based on the ACCP/SCCM Consensus Conference (Bone, 1992). Sepsis was present when there was a presumed or confirmed infection according

to the SIRS criteria. The severity of illness was assessed by calculating the Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) during the first 24 hours of infection [21] and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score on the first and third day after sepsis diagnosis [22]. Acute organ dysfunction was categorized as at least a 1-point classification in the SOFA score.

Patients were eligible for inclusion when they fulfilled the criteria for a systemic inflammatory response, had an obvious source of infection, and shock diagnosis within the previous 48 hours. Shock was defined as persistent hypotension after fluid resuscitation and the need for at least one vasopressor agent. Patients were excluded when death occurred within 6 hours of admission or when patients were under 18 years of age. In addition, pregnancy, patients with advanced cancer, a hematological malignancy or do-not-resuscitate (DNR) orders were excluded.

Demographic, clinical and laboratory data were collected using standardized case report forms on the first day of a sepsis diagnosis. Additionally, we collected the following data related to HIV infection: time since diagnosis of HIV infection, CD4 count and HAART use. The most recent CD4 count before the inclusion date was collected. The ICU and hospital mortality rates were assessed.

The appropriate biological material was sampled from suspected sites of infection and collected as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [23]. Microbiological data were collected and analyzed according to the local Infection Control Committee.

Blood samples were obtained using an arterial line or a peripheral vein to assess CRP and cytokine levels on the first day of septic shock diagnosis.

C-reactive protein (CRP) measurement

CRP levels were measured using the nephelometric method with a Minineph commercial kit (The Binding Site Group, Ltd., Birmingham, UK) according to manufacturer's orientations. Briefly, the determination of soluble antigen concentration by nephelometric methods involves a reaction with the antibody bound to a latex particle to form insoluble complexes. The approximate measuring range is 3.5–112 mg/L at a sample dilution of 1/40. The sensitivity limit is 0.44mg/L when using a 1/5 sample dilution. Sample concentrations higher than the stated range may result in antigen excess, which can give misleading results, and than samples should be retested at a 1/440 dilution.

Multiplex cytokine assay

A multiplex cytokine kit (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , granulocyte colony-stimulating factor [G-CSF], granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF], monocyte chemoattractant protein [MCP]-1, macrophage inflammatory protein-1 and tumor necrosis factor [TNF]- α) was obtained, and the assay was performed according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). We conducted this assay according to previous experience [16]. The data analyses for all of the assays were performed using the Bio-Plex Manager software.

Only cytokines with detectable levels above 90% in all of the samples were considered for the analysis: IL1-β, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, G-CSF, MCP-1, MIP-1β and TNF-α.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) or the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The numerical demographic variables were expressed as the median and the interquartile range (IQ 25-75%), except cytokine and CRP values, which were expressed as the median, minimum and maximum values. All of the numerical variables were tested for a normality distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. We applied the logarithmic transformation when large variability and nonparametric distribution of cytokines levels were observed. We compared the continuous variables using a *t*-test (parametric distribution) and the Mann-Whitney U test (non-parametric distribution). The categorical variables were compared using the chi-squared test and Fisher’s exact test. We compared the mean cytokine values of the survivors and the non-survivors on the first day of sepsis diagnosis. We compared the clinical and laboratorial variables within the HIV group according to the hospital outcomes. These same variables were compared among the HIV and non-HIV patients. A multivariate analysis was performed by logistic regression to determine which factors were associated with hospital mortality. The data from all of the patients (HIV/AIDS and non-HIV) with a *p* value lower than 0.2 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis. The objective of the multivariate analysis was to ascertain if the presence of HIV/AIDS could influence hospital outcomes.

Results

Cytokine concentrations

When data from all 1,020 assays were analyzed, the multiplex cytokine system was able to detect plasma cytokines in 820 (80%) assays. The concentrations of TNF-alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, G-CSF, IFN-gamma, MCP-1 and MIP-1beta were detectable in more than 90% of individual assays, and only four cytokines (IL-2, IL-5, IL-17 and GM-CSF) presented detection below 50% of the samples (File S1). There was no difference in the rate of cytokine detection between HIV and non-HIV septic shock patients and between survivors and non-survivors (File S1).

Clinical characteristics of the HIV/AIDS and non-HIV septic shock patients

We included 30 HIV/AIDS septic shock patients. The demographic and clinical characteristics are described in Table 1. The patients were predominantly young (median age 32 years) with low CD4 cell counts (median 72 cells/mm³), and the median time that had elapsed since a HIV diagnosis was 12.5 months. Among the 30 HIV/AIDS patients, 17 (57%) were already using HAART before hospital admission. Thirteen

Table 1. Characteristics of HIV/AIDS and non-HIV septic patients. The results were expressed as the median and the interquartile interval.

	HIV/AIDS		p value
	Patients(N=30)	Non-HIV Patients(N=30)	
Age (years)	32 (26-43)	66 (46-78)	<0.001
Gender (male)	22 (73%)	18 (60%)	0.41
SAPS II score (points)	55 [47-58]	55 [44-63]	0.63
CD4 cell count (per mm ³)	72 (16-190)	-	-
Viral load (x 10 ³ copies/mm ³)	33.0 (2.9-434.2)	-	-
Length of time since AIDS diagnosis (months)	12.5 (1-86)	-	-
HAART use	17 (57%)	-	-
Site of infection			0.01
Lung	23 (77%)	18 (60%)	
Abdomen	-	8 (28%)	
Central line infection	3 (10%)	3 (10%)	
Central nervous system	3 (10%)	-	
Urinary tract	1 (3%)	1 (3%)	
SAPS II score (points)	55 [47-58]	55 [44-63]	0.63
SOFA score on day 1 (points)	8 [6-10.5]	10 [9-13]	0.11
SOFA score on day 3 (points)	9 (5-12)	8 (6-10)	0.66
Hospital mortality	15 (50%)	18 (60%)	0.60

patients were HAART-naïve, and 11 of these patients started the therapy during their ICU stay.

To better understand the HIV/AIDS population with severe sepsis, we compared these patients with a group of 30 non-HIV septic shock patients (Table 1). The HIV/AIDS patients were younger than the non-HIV control patients (median age 32 vs. 66 years; *p*<0.001). Pneumonia was the most common site of infection for both groups (77% of HIV/AIDS patients and 60% of non-HIV patients). There was a higher incidence of central nervous system infections in the HIV/AIDS septic patients (10%), whereas a higher incidence of abdominal infections (28%) was found in the non-HIV group. The cultures were positive in 20 (67%) HIV/AIDS septic patients and in 21 (70%) non-HIV patients (*p*=0.9). There was a higher incidence of Gram-positive infections in the non-HIV septic patients (13% of the HIV/AIDS patients vs. 37% of the non-HIV patients, *p*=0.07), whereas a higher incidence of fungal infections was found in the HIV/AIDS patients (20% of the HIV/AIDS patients vs. 0% of the non-HIV patients, *p*=0.02). Gram-negative infections occurred in a similar frequency in both groups (33% of the HIV/AIDS patients vs. 53% of the non-HIV patients, *p*=0.19) (see the Supplementary electronic material – Table S1 in File S1). The presence of bacteremia was confirmed in 33% of the HIV/AIDS patients and in 16% of the non-HIV patients (*p*=0.77). We found no significant differences between the mean SAPS II scores (55 points [range 47-58] for the HIV patients vs. 55 points [range 44-63] for the non-HIV patients)

and the SOFA scores on day 1 (8 points [range 6-10.5] for the HIV patients vs. 10 points [range 9-13] for the non-HIV patients). The cumulative incidence of acute organ dysfunction on the first 3 days after sepsis diagnosis was similar between the HIV and non-HIV septic patients (respectively, cardiovascular 81% vs. 97%; respiratory 77% vs. 88%; renal 73% vs. 71%; hematological 59% vs. 63%; hepatic 41% vs. 38%; neurological 18% vs. 17%; all of the *p* values were non-significant) (Table S2 in File S1). The in-hospital mortality did not vary between the groups (50% of the HIV patients vs. 60% of the non-HIV patients, *p*=0.6) (Table 1).

Biomarkers of outcomes in HIV/AIDS septic shock patients

To identify possible biomarkers of severity and prognosis in the HIV/AIDS septic patients, we compared the inflammatory mediator levels of the survivors and non-survivors. The median log IL-6, (1.49 [0.5-3.7] pg/ml vs. 2.1 [0.7-4.3] pg/ml; *p*=0.03), log IL-10 (0.3 [0.1-2.3] pg/ml vs. 1.0 [0.2-2.6] pg/ml; *P*=0.004) and log G-CSF (0.4 [0.0-1.5] pg/ml vs. 1.6 [0.0-4.7] pg/ml; *p*=0.002) levels were higher in the non-survivors than in the survivors (Figure 1). The area under ROC curve was 0.73 (CI95% 0.55-0.91) for IL-6, 0.80 (0.64-0.97) for IL-10 and 0.82 (0.66-0.97) for G-CSF levels. In addition, we compared the median CRP levels of the survivors and the non-survivors (82.6 [72.0-93.3] mg/L vs. 102.2 [78.3-276.5] mg/L; *p*=0.26) and found no significant differences. These results suggest that IL-6, IL-10 and G-CSF are possible biomarkers of prognosis in HIV/AIDS septic patients.

Patterns of the innate immune response in HIV/AIDS and non-HIV septic patients

HIV/AIDS septic patients presented lower leucocyte counts than non-HIV patients (6,450 [4,473-11,425] cells/mm³ in the HIV/AIDS patients vs. 13,100 [7,600-19,400] cells/mm³ in the non-HIV patients, *p*=0.007) on the first day of septic shock. We found no significant differences between the CRP levels in the HIV/AIDS septic patients and in the non-HIV septic patients (91.8 [72.3-257.9] mg/L in the HIV/AIDS patients versus 222 [103-350] mg/L in the non-HIV patients, *p*=0.22). The innate immune activation in the HIV/AIDS and non-HIV septic patients was compared, and we found no significant differences in the cytokine levels (Table 2). The HIV/AIDS non-surviving patients presented significantly higher levels of IL-6, IL-10 and G-CSF when compared with the survivors; however, the cytokine levels were similar between the HIV and non-HIV septic patients. These results suggest that an innate immune response was triggered in HIV/AIDS septic patients with similar cytokine patterns as those in non-HIV septic patients despite a cellular immunodeficiency and chronic immune activation.

In addition, we analyzed the independent risk factors that were associated with hospital mortality, including HIV/AIDS diagnosis. Age, comorbidities, the SOFA score, and the IL-6 levels were selected with a *p*-value lower than 0.2 in the univariate analysis. Age (odds ratio 1.05, CI 95% 1.02-1.09, *p*=0.002) and the IL-6 levels (odds ratio 1.00, CI 95% 1.00-1.01, *p*=0.05) were significantly associated with hospital mortality (Table 3).

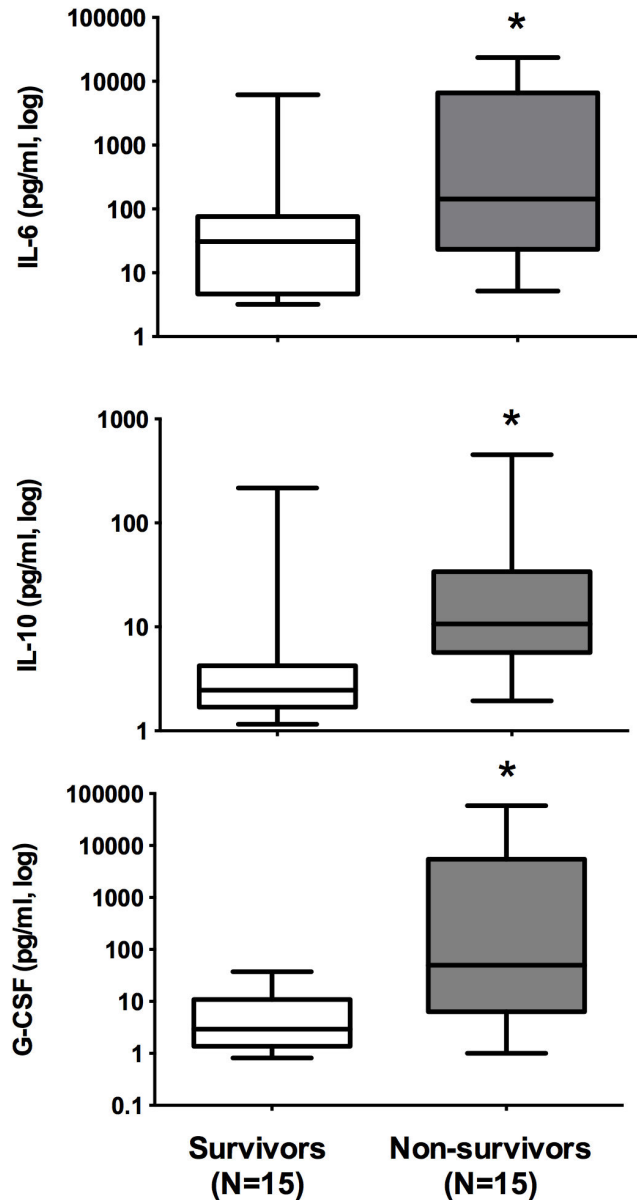


Figure 1. Biomarkers in HIV/AIDS septic patients on the first day of sepsis diagnosis: comparison of the IL-6, IL-10, and G-CSF plasma levels on the first day of sepsis. (*) *p*<0.05.

doi: 10.1371/journal.pone.0068730.g001

Discussion

Severe sepsis is an independent risk factor that is associated with short- and long-term mortality in critically ill HIV/AIDS patients [13]. Over the last 3 decades sepsis has become a more frequent cause of admission of HIV/AIDS patients at ICU. A shift towards common bacterial infections rather than opportunistic infections has been observed as a cause of sepsis and mortality in these patients [3,6]. Generalized immune activation has long been detected in AIDS patients

Table 3. Multivariate analysis of hospital mortality among all 60 septic shock patients.

Risk factors	Odds ratio (confidence interval of 95%)	Wald test	P value
Age	1.05 [1.02-1.09]	9.87	0.002
Severe comorbidity	-	-	0.17
SOFA score	-	-	0.70
Interleukin-6	1.00 [1.00-1.01]	3.76	0.05

Table 2. Plasma cytokine concentrations on the first day of a sepsis diagnosis in HIV/AIDS and non-HIV septic patients.

Cytokine	HIV/AIDS Patients N=30	Non-HIV Patients N=30	p value
IL1-β	1.2 (0.8-17.9)	1.5 (0.8-51.2)	0.81
IL-4	0.2 (0.0-4.5)	0.3 (0.0-5.9)	0.23
IL-6*	1.81 (0.5-4.3)	2.37 (0.4-4.1)	0.19
IL-7	3.7 (1.8-15.5)	2.7 (1.2-169.8)	0.23
IL-8	21.6 (1.8-7,260)	27.5 (4.4-532.2)	0.76
IL-10*	0.68 (0.1-2.6)	0.98 (0.1-2.5)	0.45
IL-12	2.8 (2.1-17.9)	2.9 (1.9-211.1)	0.67
G-CSF*	0.89 (0.0-4.7)	1.22 (0.1-4.2)	0.12
MCP-1	137.9 (3.4-4,494)	148.2 (9.0-1,213)	0.67
MIP-1β	53.4 (7.8-1,239)	39.4 (15.4-341.6)	0.55
TNF-α	9.0 (5.9-102.4)	11.0 (5.0-69.4)	0.57

The values were expressed in pg/ml and as the median, maximum and minimum values, * Logarithmic transformation of IL-6, IL-10 and G-CSF concentrations

and in disease pathogenesis; however, it is unclear how retroviral infections impact the innate immune response and whether these effects influence the outcomes of severe bacterial infections and sepsis.

In this study, we demonstrated that septic shock leads to high levels of inflammatory mediators in HIV/AIDS patients, which were similar to those observed in non-HIV septic shock patients. Higher levels of IL-6, IL-10 and G-CSF were associated with hospital mortality among HIV/AIDS septic patients. In addition to the similar severity of illness (SAPS II and SOFA scores) and hospital mortality, HIV/AIDS septic patients responded to acute infections with the same degree of innate immune response activation as non-HIV septic patients. Age and the IL-6 levels were independent risk factors that were associated with hospital outcomes, and HIV disease was not associated with mortality among the septic shock patients in this study.

The comparison of septic shock patients with and without HIV/AIDS revealed a predominantly young HIV/AIDS population, that were admitted with infections related to low CD4 levels; however, pneumonia was the most common infection in the HIV/AIDS and non-HIV patients. The severity scores (SAPS II and SOFA) and the hospital mortality rates were similar between these two populations. The incidence of organ dysfunction that was associated with sepsis was similar between both groups, which has been described in other studies [24,25]. The mortality rate was similar to those in other studies of HIV/AIDS patients with severe infections [13,25,26].

The etiological agents of the infections that caused severe sepsis in the HIV/AIDS and non-HIV patients were different. The HIV/AIDS septic patients exhibited infections due to bacteria, including *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*, and this pattern was similar to those in other studies of sepsis and severe infections in the HIV population [27,28]. Although these discrepancies in the etiology of infection could lead to variable levels of inflammatory biomarkers [29], our results were similar between the HIV and non-HIV patients according to the responses of the innate immune system.

Sepsis has been described as an excessive and deregulated inflammatory response to infection, and cytokines release has a critical role in the pathogenesis of this syndrome. Elevated levels of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, are able to induce CRP secretion, an acute phase protein synthesized by the liver [30]. Acute phase proteins are useful biomarkers for the management of systemic inflammation, as cardiovascular, infectious or autoimmune diseases [31,32]. Additionally, CRP concentrations can be used as surrogates for the clinical response to antibiotics and the reduction in bacterial load is sepsis [33]. We observed a significant increase in CRP concentration in the HIV/AIDS septic patients. Our data suggest that systemic inflammatory response can be induced in HIV patients with septic shock, which is similar in non-HIV patients. Póvoa and colleagues (2011) observed that the CRP levels were increased in severely immunosuppressed cancer patients with sepsis, and CRP course was alike from the presence or absence of neutropenia [34]. If we take these evidences together, it seems that immunosuppression has no major effect on the acute phase response to severe infections. Besides, CRP levels present good correlation with IL-6 levels, suggesting that they vary from patient to patient, regardless of the comorbidities. We suggest that the CRP can also be a useful biomarker of infection in HIV/AIDS septic patients similar to non-HIV septic patients.

Generalized immune activation has long been recognized as a key feature of AIDS pathogenesis. Elevated levels of the T-cell activation marker CD38 were observed in the first AIDS-associated *Pneumocystis pneumoniae* cases [35]. The depletion of CD4 cells from gut-associated lymphoid tissue in chronic HIV-infected patients can contribute to microbial translocation, and LPS-induced monocyte activation can promote a persistent inflammatory state, which leads to elevated cytokine levels due to the innate immune system response [36]. High plasmatic levels of monocyte activation markers can be used to predict early mortality in HIV/AIDS patients (SMART). IL-6 is elevated in non-HIV septic patients

and is considered one of the best markers of severity/mortality when compared with IL-1 and TNF [37]. IL-6 is a good marker of hospital outcomes in non-HIV septic patients [38]. The IL-6 levels were higher in the non-survivor HIV/AIDS septic patients when compared with the HIV/AIDS survivors. Because the IL-6 levels were similar in the HIV/AIDS and non-HIV septic patients, our data suggest that IL-6 can be a predictor of poor outcomes in the HIV/AIDS septic population. In addition, the IL-10 and G-CSF levels were higher in the HIV/AIDS non-survivors in our study. We applied a multiplex assay for several serum cytokines to identify potential differences in the innate immunological responses. Several cytokines have been associated with a poor prognosis in severely ill patients, particularly septic patients. IL-6 and IL-10 are biomarkers that were associated with hospital mortality in a cohort of general critically ill patients [39]. Additionally, elevated G-CSF concentrations was associated with mortality in acute lung injury patients without AIDS, and these levels could be used to predict early mortality in severe sepsis patients when compared with other cytokine levels in a multiplex assay in a study of a mixed group of septic patients [16,40]. In our study, three cytokines (IL-6, IL-10 and G-CSF) were associated with hospital mortality in HIV/AIDS septic patients. These three biomarkers presented a high performance for the prognosis prediction after ROC analysis; however, the levels of these biomarkers did not vary among the non-HIV septic population. When we analyzed the profile of the cytokines detected in both groups by the multiplex cytokine assay, we observed a predominance of proinflammatory mediators, such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, and IL-13, while there was low detection of four cytokines (IL-2, IL-5, IL-17 and GM-CSF) with anti-inflammatory action or with compartmental functions, which was expected by biological reasons [41]. In summary, the patterns of elevated innate immune system biomarkers are comparable between HIV/AIDS and non-HIV septic patients.

Our study has several limitations. First, the relatively small sample size limits the subtle associations that were found between hospital outcomes and the HIV/AIDS group and between HIV/AIDS and non-HIV patients. Second, we could not match for age in the HIV/AIDS and non-HIV septic groups. The rate of older patients who are admitted to ICUs worldwide has increased, which affected the three tertiary hospitals that included non-HIV patients; therefore, a small number of young non-HIV septic patients were included [42]. This age limitation was observed in a study during the pre-HAART era [24]; however, this limitation can be overcome by recent data that suggests AIDS leads to a similar immunological impairment that occurs in old age, such as a reduced T cell repertoire, a low naïve/memory T cell ratio and increased IL-6 levels [43]. Another possible limitation is that patients with renal failure and replacement therapy (RRT) on day 1 of severe sepsis (23%)

were included in the study. The serum levels of cytokines could be lowered by hemodialysis, although we did not collect blood samples during the procedure. Even though, patients on RRT presented higher serum levels of IL-10, G-CSF and CRP than patients without RRT (data not shown). This data should be interpreted with caution, as our study was not designed to evaluate the effect of renal replacement therapy on serum levels of cytokines. Finally, the use of multiple cytokines panels as biomarkers in the clinical setting is controversial, especially due to a large inter-individual variability and their kinetic oscillation [44]. This variability can challenge the estimation of the power and the sample size of the study. We recalculated the sample size of our study based on the variance of the observed cytokines levels, and our sample was deemed adequate, and the study's power remained higher than 80%. However, small differences in the cytokine levels between HIV and non-HIV septic shock patients could be underestimated due to their large variance.

We believe that our results can change the current view of HIV/AIDS patients who are generally excluded from studies of new therapies for severe sepsis and septic shock. Mrus et al. demonstrated a similar mortality among HIV/AIDS septic patients and other immunocompromised septic populations, such as cancer and cirrhotic patients. However, septic patients with HIV/AIDS had a lower chance of ICU admission [45]. Our results indicate that there are no discrepancies in the immune response to severe infections or in the prognosis of HIV patients.

Supporting Information

File S1. Figure S1, Frequency of cytokine detection in the multiplex assay (N=60 patients). Table S1, Number of samples detected. Comparison among HIV and non-HIV patients. Table S2, Number of samples detected. Comparison among survivors and nonsurvivors. Table S3, Microbiology of HIV/AIDS and non-HIV septic patients. Table S4, Frequency of organ dysfunction according to Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score for HIV/AIDS and non-HIV septic shock patients at the first day after the diagnosis of sepsis (p=NS for all of the comparisons). (PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RTA AMJ PTB FAB. Performed the experiments: RTA AMJ RNG DMM ECM EFA. Analyzed the data: RTA AMJ DMM BG PTB HCC EFA. Contributed reagents/materials/analysis tools: BG PTB HCC FAB. Wrote the manuscript: RTA AMJ HCC FAB.

References

- Dore GJ, Li Y, McDonald A, Ree H, Kaldor JM (2002) Impact of highly active antiretroviral therapy on individual AIDS-defining illness incidence and survival in Australia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29: 388-395. doi:10.1097/00126334-200204010-00010. PubMed: 11917244.
- Palella FJ Jr, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC et al. (2006) Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: Changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43: 27-34. doi:10.1097/01.qai.0000233310.90484.16. PubMed: 16878047.
- Pacheco AG, Tuboi SH, May SB, Moreira LF, Ramadas L et al. (2009) Temporal Changes in Causes of Death Among HIV-Infected Patients in the HAART Era in Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51: 624-630. doi:10.1097/QAI.0b013e3181a4ecf5. PubMed: 19430304.
- Rezende EL, Vasconcelos AM, Pereira MG (2010) Causes of death among people living with HIV/AIDS in Brazil. *Braz J Infect Dis* 14: 558-563. doi:10.1016/S1413-8670(10)70112-4. PubMed: 21340295.
- Lucas S (2012) Causes of death in the HAART era. *Curr Opin Infect Dis* 25: 36-41. doi:10.1097/QCO.0b013e3182834ef5c4. PubMed: 22156899.
- Huang L, Quartin A, Jones D, Havlir DV (2006) Intensive Care of Patients with HIV Infection. *N Engl J Med* 355: 173-181. doi:10.1056/NEJMra050836. PubMed: 16837681.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J et al. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29: 1303-1310. doi:10.1097/00003246-200107000-00002. PubMed: 11445675.
- Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B (2003) Current epidemiology of septic shock: The CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 165-172. doi:10.1164/rccm.2201087. PubMed: 12851245.
- Andreu Ballester JC, Ballester F, González Sánchez A, Almela Quilis A, Colomer Rubio E (2008) Epidemiology of Sepsis in the Valencian Community (Spain), 1995-2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29: 630-634. doi:10.1086/589583. PubMed: 18564905.
- Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M et al. (2009) Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection* 37: 222-232. doi:10.1007/s15010-008-8203-z. PubMed: 19404580.
- Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F et al. (2008) Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 12: R158. doi:10.1186/cc6914. PubMed: 19091069.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-1554. doi:10.1056/NEJMoa022139. PubMed: 12700374.
- Japiassú AM, Amâncio RT, Mesquita EC, Medeiros DM, Bernal HB et al. (2010) Sepsis is a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS patients. *Crit Care* 14: R152. doi:10.1186/cc8384. PubMed: 20698966.
- Greenberg JA, Lennox JL, Martin GS (2012) Outcomes for critically ill patients with HIV and severe sepsis in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Crit Care* 27: 51-57. doi:10.1016/j.jcrc.2011.08.015. PubMed: 22033058.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003) The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112: 460-467. doi:10.1172/JCI200319523. PubMed: 12925683.
- Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF et al. (2007) Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 11: R49. doi:10.1186/cc5836. PubMed: 17448250.
- Ledwaba L, Tavel JA, Khabo P, Maja P, Qin J et al. (2012) Pre-ART levels of inflammation and coagulation markers are strong predictors of death in a South African cohort with advanced HIV disease. *PLOS ONE* 7(3): e24243. doi:10.1371/journal.pone.0024243. PubMed: 22448211.
- Schleicher GK, Herbert V, Brink A, Martin S, Maraj R et al. (2005) Procalcitonin and C-reactive protein levels in HIV-positive subjects with tuberculosis and pneumonia. *Eur Respir J* 25: 688-692. doi:10.1183/09031936.05.00067604. PubMed: 15802344.
- Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, De Wit S, Drummond F et al. (2008) Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLOS Med* 5: e203. doi:10.1371/journal.pmed.0050203. PubMed: 18942885.
- Ross AC, Rizk N, O'Riordan MA, Dogra V, El-Bejjani D et al. (2009) Relationship between inflammatory markers, endothelial activation markers, and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 49: 1119-1127. doi:10.1086/605578. PubMed: 19712036.
- Le Gall, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270: 2957-2963. doi:10.1001/jama.1993.03510240069035. PubMed: 8254858.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, de Mendonça A et al. (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22: 707-710. doi:10.1007/BF01709751. PubMed: 8844239.
- Horan TC, Andrus M, Dudeck MA (2008) CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 36: 309-332. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.002. PubMed: 18538699.
- Thyraul M, Gachot B, Chastang C, Souweine B, Timsit JF et al. (1997) Septic shock in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Intensive Care Med* 23: 1018-1023. doi:10.1007/s001340050451. PubMed: 9407236.
- Coquet I, Pavie J, Palmer P, Barbier F, Legriel S et al. (2010) Survival trends in critically ill HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Crit Care* 14: R107. doi:10.1186/cc8188. PubMed: 20534139.
- Jacob ST, Moore CC, Banura P, Pinkerton R, Meya D et al. (2009) Severe sepsis in two Ugandan hospitals: a prospective observational study of management and outcomes in a predominantly HIV-1 infected population. *PLOS ONE* 4: e7782. doi:10.1371/journal.pone.0007782. PubMed: 19907656.
- Rosenberg AL, Seneff MG, Atiyeh L, Wagner R, Bojanowski L et al. (2001) The importance of bacterial sepsis in intensive care unit patients with acquired immunodeficiency syndrome: implications for future care in the age of increasing antiretroviral resistance. *Crit Care Med* 29: 548-556. doi:10.1097/00003246-200103000-00013. PubMed: 11373418.
- Haddy RI, Richmond BW, Trapse FM, Fannin KZ, Ramirez JA (2012) Septicemia in Patients With AIDS Admitted to a University Health System: A Case Series of Eighty-Three Patients. *J Am Board Fam Med* 25:318-322.
- Benito N, Moreno A, Filella X, Miró JM, González J et al. (2004) Inflammatory responses in blood samples of human immunodeficiency virus-infected patients with pulmonary infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(3): 608-614. PubMed: 15138189.
- Baumann H, Gaudie J (1994) The acute phase response. *Immunol Today* 15(2): 74-80. doi:10.1016/0167-5699(94)90137-6. PubMed: 7512342.
- Gilstrap LG, Wang TJ (2012) Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update. *Clin Chem* 58(1): 72-82. doi:10.1373/clinchem.2011.165712. PubMed: 22125305.
- Salluh JI, Lisboa T (2011) C-reactive protein in community-acquired sepsis: you can teach new tricks to an old dog. *Crit Care* 15: 186. doi:10.1186/cc10301. PubMed: 21955725.
- Póvoa P, Salluh JI (2012) Biomarker-guided antibiotic therapy in adult critically ill patients: a critical review. *Ann Intensive Care* 23: 2 (1): 32. PubMed: 22824162.
- Póvoa P, Souza-Dantas VC, Soares M, Salluh JF (2011) C-reactive protein in critically ill cancer patients with sepsis: influence of neutropenia. *Crit Care* 15: R129. doi:10.1186/cc10242. PubMed: 21595932.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT et al. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305: 1425-1431. doi:10.1056/NEJM198112103052401. PubMed: 6272109.
- 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. PubMed: 17115046.
- Cipolle MD, Pasquale MD, Cerra FB (1993) Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators. *Crit Care Clin* 9: 261-298. PubMed: 8490763.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF et al. (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699-709. doi:10.1056/NEJM200103083441001. PubMed: 11236773.
- Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L et al. (2012) A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves

- mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine* 57: 332-336. doi: 10.1016/j.cyto.2011.12.002. PubMed: 22197776.
40. Suratt BT, Eisner MD, Calfee CS, Allard JB, Whittaker LA et al. (2009) Plasma granulocyte colony-stimulating factor levels correlate with clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 37: 1322-1328. doi:10.1097/CCM.0b013e31819c14fa. PubMed: 19242319.
41. Faix JD (2013) Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 50(1): 23-36. doi:10.3109/10408363.2013.764490. PubMed: 23480440.
42. Boumendil A, Angus DC, Guitonneau AL, Menn AM, Ginsburg C et al. (2012) Variability of intensive care admission decisions for the very elderly. *PLOS ONE* 7: e34387. doi:10.1371/journal.pone.0034387. PubMed: 22509296.
43. Deeks SG, Verdin E, McCune JM (2012) Immunosenescence and HIV. *Curr Opin Immunol* 24: 501-506. doi:10.1016/j.coi.2012.05.004. PubMed: 22658763.
44. Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A et al. (2011) Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS* 119(2): 155-163. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02705.x. PubMed: 21208283.
45. Mrus JM, Braun L, Yi MS, Linde-Zwirble WT, Johnston JA (2005) Impact of HIV/AIDS on care and outcomes of severe sepsis. *Crit Care* 9: R623-R630. doi:10.1186/cc3811. PubMed: 16280060.

Anexo 8b: Produção científica durante o Doutorado

- b) Coelho L, Cardoso SW, **Amancio RT**, Moreira RI, Campos DP, Veloso VG, Grinsztejn B, Luz PM. Trends in AIDS-defining opportunistic illnesses incidence over 25 years in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS One. 2014 Jun 5;9(6):e98666. doi: 10.1371/journal.pone.0098666



Trends in AIDS-Defining Opportunistic Illnesses Incidence over 25 Years in Rio de Janeiro, Brazil

Lara Coelho*, Sandra Wagner Cardoso, Rodrigo Teixeira Amancio, Ronaldo Ismério Moreira, Dayse Pereira Campos, Valdiléa Gonçalves Veloso, Beatriz Grinsztejn, Paula Mendes Luz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Abstract

Objectives: To assess the temporal trends in incidence of AIDS-defining opportunistic illnesses in an urban cohort of a middle-income country.

Methods: HIV infected patients aged ≥ 18 years at cohort entry were included in this analysis. We calculated incidence rates per 1000 persons-years of observation for the first opportunistic illness presented after cohort enrollment, from 1987 to 2012. Trends for overall and specific opportunistic illnesses were tested and incidence rate ratios for the most recent calendar period were calculated as the ratio between the incidence rate observed in the most recent period of the study (2009–2012) and the incidence rate observed in first period of the study (1987–1990).

Results: Overall, 3378 patients were included in this analysis; of which 1119 (33%) patients presented an opportunistic illness during follow up. Incidence rates of all opportunistic illnesses decreased over time, and the overall opportunistic illness incidence rates fell from 295.4/1000 persons-years in 1987–1990 to 34.6/1000 persons-years in 2009–2012. Tuberculosis, esophageal candidiasis, cerebral toxoplasmosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia were the most incident opportunistic illnesses in the cohort. Tuberculosis had the highest incidence rate in the study period. The peak in tuberculosis incidence occurred in 1991–1993 (80.8/1000 persons-years). Cerebral toxoplasmosis was the third most incident opportunistic illness in the study, with a peak of incidence of 43.6/1000 persons-year in 1987–1990.

Conclusions: All opportunistic illnesses incidence rates decreased over the years but they still occur in an unacceptable frequency. Tuberculosis co-infection among HIV-infected persists as an important challenge for health care professionals and policy makers in our setting. Impressively high rates of cerebral toxoplasmosis were found suggesting that its incidence among HIV-infected is linked to the high prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the general population.

Citation: Coelho L, Cardoso SW, Amancio RT, Moreira RI, Campos DP, et al. (2014) Trends in AIDS-Defining Opportunistic Illnesses Incidence over 25 Years in Rio de Janeiro, Brazil. PLoS ONE 9(6): e98666. doi:10.1371/journal.pone.0098666

Editor: Mark Wainberg, McGill University AIDS Centre, Canada

Received: March 1, 2014; **Accepted:** May 5, 2014; **Published:** June 5, 2014

Copyright: © 2014 Coelho et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: BG and PML acknowledge funding from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and the Research Funding Agency of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lara.coelho@ipecc.fiocruz.br

Introduction

Major advances have been achieved in the management and treatment of HIV infected patients. As result the incidence and morbimortality of opportunistic illnesses have dramatically declined in the years that followed combination antiretroviral therapy (cART) introduction [9,17,31,35]. Nonetheless, opportunistic illnesses (OI) still represent a major cause of death and hospitalization in HIV infected patients, in these settings [5,30,34,36].

The incidence of specific OI in HIV infected patients can vary geographically mainly as a result of the differential burden of tropical infectious diseases observed in middle-low income settings [11,47]. One prominent example is tuberculosis with only 22 countries located in Africa, Asia and Latin America (including Brazil) being responsible for more than 80% of all cases worldwide [45].

Brazil is a middle-income country where publically funded universal access to cART, laboratory monitoring with CD4 cell

counts and viral load quantification and OI prophylaxis and treatment have been provided since 1996 [29]. Yet, few studies have evaluated trends in the incidence of OI in our setting [11].

In this study, we examine rates and patterns of OIs incidence in an urban clinical cohort in Rio de Janeiro, Brazil, from 1987 to 2012.

Patients and Methods

Ethics Statement

This study was approved by the ethics committee of the Evandro Chagas Clinical Research Institute of the Oswaldo Cruz Foundation (CAAE 0032.0.009.000-10) and was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. All patient records/information was de-identified prior to analysis.

Study Population

Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC/Fiocruz) is a reference center for treatment of patients with HIV/AIDS, in Rio de Janeiro, Brazil. As of June 2013, over 5,000 patients have been cared for at IPEC. A longitudinal, observational, clinical database has been maintained on patients receiving care at IPEC since 1986. Cohort procedures have been described and results published [18,19,27]. The database includes socio-demographic, laboratory, clinical, and therapeutic information abstracted from the medical records and is updated periodically by trained staff.

For this study we included all patients 18 years of age or older at cohort entry, who were followed for a period of at least 60 days from 1 January 1987 to 31 October 2012. The start of the observation period was defined based on the first medical appointment at IPEC. Follow-up ended at the date of the first OI for those who presented with an OI during follow-up. For those patients who never experienced an OI during follow-up, the end of follow-up was defined as the date of the last clinic visit, the date of death or study closure, whichever occurred first.

Database Validation

To assess the quality of the OI diagnoses present in the IPEC longitudinal database, we performed a clinical validation of diagnoses by direct comparison of database with chart review. Ten percent of the patients who presented an OI during follow-up ($n = 118$ patients) were randomly selected for chart review and validation of the first and concomitant OI, that is, those occurring within 30 days of the date of the first OI.

A trained HIV medical specialist used two criteria to validate the diagnoses. The first, which classified diagnoses into certain, probable and possible, took into consideration all forms of complementary exams, including radiological, microbiological and histopathological, in addition to medical prescriptions. This criterion had already been used by our team in other study [34]. The second criterion was built based on the case definition for HIV-related diseases established by the WHO [43]. According to

this criterion, the diagnoses were classified either as definitive or clinical.

The validation showed that 95% of the OI diagnosis were confirmed using either criteria. Out of the confirmed diagnosis, 49% were classified as certain using the first criterion, and 56% were classified as definitive according to second (WHO) criterion.

Although WHO criteria for case definition of HIV-related diseases was applied for the database validation process described above, the selection of the opportunistic illnesses included in the incidence analysis were based on those present in the Center for Disease Control “1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults” (CDC, 1993) [8].

Outcome Measures

The outcome of interest was the occurrence of the first OI after cohort enrollment. Prevalent diagnosis at or up to 30 days of the date of cohort enrollment were excluded from the incidence rate calculation.

The opportunistic illnesses included in the analysis were those in the CDC 1993 definition [8], namely tuberculosis, esophageal candidiasis, toxoplasmosis cerebral, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP), herpes simplex virus, cytomegalovirus disease, extrapulmonary cryptococcosis, Kaposi sarcoma, cryptosporidiosis, isosporosis, non tuberculosis mycobacterium disease, disseminated histoplasmosis, non Hodgkin lymphoma. We excluded from the analysis the following opportunistic illnesses: HIV associated encephalopathy, recurrent bacterial pneumonia, salmonella septicemia and wasting syndrome. The reasons for excluding these diseases were disease-specific, namely the low number of cases in the case of salmonella septicemia, the difficulty in establishing a diagnosis of recurrence in the case of bacterial pneumonia, and the subjective nature of the diagnosis criteria in the case of HIV associated encephalopathy and wasting syndrome.

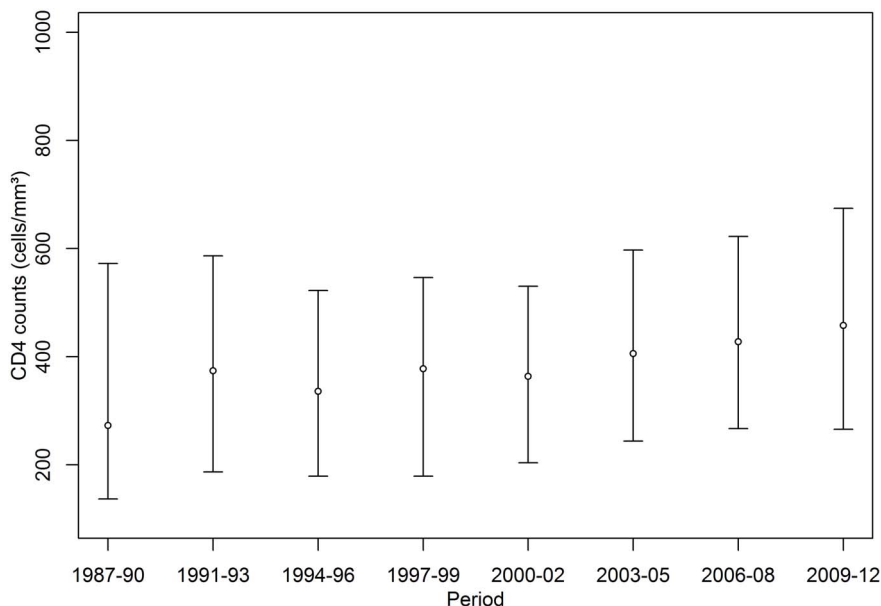


Figure 1. CD4 cell counts of patients under follow-up by calendar period: for each period medians and interquartile ranges are displayed.

doi:10.1371/journal.pone.0098666.g001

Table 1. Characteristics of patients included in the opportunistic illnesses incidence analyses by period of cohort enrollment, IPEC cohort, period 1987–2012.

	1987–1990 (n = 186)	1991–1993 (n = 291)	1994–1996 (n = 205)	1997–1999 (n = 243)	2000–2002 (n = 369)	2003–2005 (n = 427)	2006–2008 (n = 933)	2009–2012 (n = 1124)	p-value
Age at enrollment years (median, IQR)	31.9 (28.5,39)	34.7 (28.6,40.6)	33 (28.4,38.8)	33.5 (28.4,38.9)	36.6 (29.6,42.5)	37.1 (30.3,43.2)	35.4 (28.7,43.1)	34.5 (27.9,42.3)	<0.001
Male sex	161 (86.6)	210 (72.2)	113 (55.1)	114 (46.9)	225 (61)	306 (71.7)	615 (65.9)	770 (68.5)	<0.001
Non white race/ethnicity	63 (33.9)	128 (44)	72 (35.1)	106 (43.6)	143 (38.8)	155 (36.4)	467 (50.2)	653 (58.8)	<0.001
Educational level									0.198
0–8 years	78 (47.6)	152 (52.2)	119 (58)	136 (56)	187 (50.8)	208 (48.7)	469 (50.4)	546 (49.1)	
9+ years	86 (52.4)	139 (47.8)	86 (42)	107 (44)	181 (49.2)	219 (51.3)	462 (49.6)	565 (50.9)	
HIV exposure category									<0.001
Heterosexual	31 (16.7)	126 (43.3)	118 (57.6)	140 (57.6)	209 (56.6)	208 (48.7)	525 (56.3)	502 (44.7)	
MSM	126 (67.7)	127 (43.6)	61 (29.8)	66 (27.2)	118 (32)	168 (39.3)	324 (34.7)	452 (40.2)	
IDU	15 (8.1)	20 (6.9)	10 (4.9)	7 (2.9)	6 (1.6)	3 (0.7)	13 (1.4)	9 (0.8)	
Other/Unknown	14 (7.5)	18 (6.2)	16 (7.8)	30 (12.3)	36 (9.8)	48 (11.2)	71 (7.6)	161 (14.3)	
Median baseline CD4 (IQR)	172 (96,225)	251.5 (110.5,674.8)	335.5 (149.2,499.8)	323.5 (148.2,500.5)	220 (96.2,390)	268 (103.2,464.8)	311.5 (112.8,524.5)	310 (107.5,551)	0.009
0–49 cells/mm ³	1 (0.5)	3 (1)	3 (1.5)	14 (5.8)	25 (6.8)	49 (11.5)	94 (10.1)	126 (11.2)	<0.001
50–199 cells/mm ³	6 (3.2)	9 (3.1)	9 (4.4)	34 (14)	69 (18.7)	67 (15.7)	150 (16.1)	191 (17)	
200–349 cells/mm ³	2 (1.1)	8 (2.7)	5 (2.4)	23 (9.5)	45 (12.2)	63 (14.8)	137 (14.7)	155 (13.8)	
350+ cells/mm ³	2 (1.1)	14 (4.8)	17 (8.3)	63 (25.9)	61 (16.5)	115 (26.9)	331 (35.5)	391 (34.8)	
Missing	175 (94.1)	257 (88.3)	171 (83.4)	109 (44.9)	169 (45.8)	133 (31.1)	221 (23.7)	261 (23.2)	
Baseline VL									<0.001
0–399 copies/mm ³	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (4.1)	11 (3)	33 (7.7)	66 (7.1)	125 (11.1)	
400–4,999 copies/mm ³	0 (0)	1 (0.3)	0 (0)	20 (8.2)	20 (5.4)	27 (6.3)	45 (4.8)	81 (7.2)	
5,000–99,999 copies/mm ³	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	51 (21)	77 (20.9)	101 (23.7)	177 (19)	296 (26.3)	
100,000+ copies/mm ³	0 (0)	0 (0)	0 (0)	39 (16)	86 (23.3)	85 (19.9)	146 (15.6)	196 (17.4)	
Missing	186 (100)	290 (99.7)	204 (99.5)	123 (50.6)	175 (47.4)	181 (42.4)	499 (53.5)	426 (37.9)	
OI at enrollment	41 (22)	47 (16.2)	35 (17.1)	47 (19.3)	100 (27.1)	100 (23.4)	189 (20.3)	325 (28.9)	<0.001
Median time from HIV diagnosis and cohort enrollment, days (IQR)	0 (0,62.5)	33 (0,111)	58 (0,226)	104 (29.5,481.5)	123 (30,848)	260 (45,2370)	110 (24,742)	53 (8.8,574.5)	<0.001

OI: opportunistic illness; MSM: men who had sex with men; IDU: injection drug users; VL: viral load.
doi:10.1371/journal.pone.0098666.t001

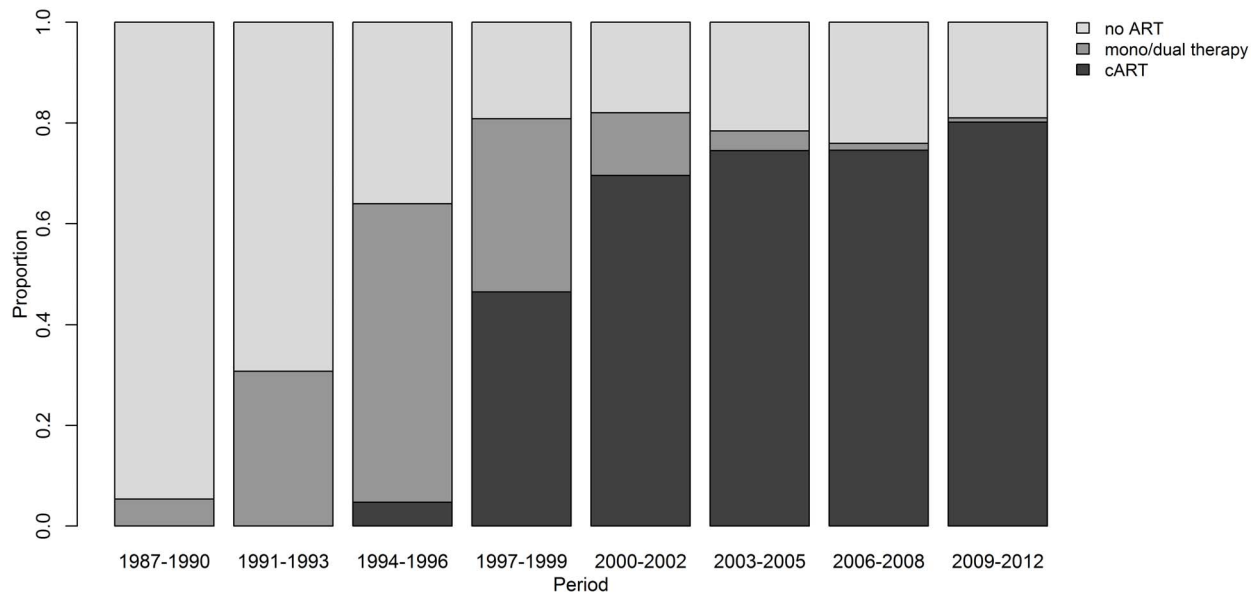


Figure 2. Use of antiretroviral therapy by calendar period.
doi:10.1371/journal.pone.0098666.g002

Statistical Methods

Eight calendar periods were defined a priori as follows: 1987–1990, 1991–1993, 1994–1996, 1997–1999, 2000–2002, 2003–2005, 2006–2008 and 2009–2012. Socio-demographic, behavioral, laboratory, clinical features were compared among all included patients according to date of cohort entry using Kruskal-Wallis test for continuous variables and Chi-square for categorical variables.

We estimated the incidence rates of the first OI in each calendar period. The incidence rate of an OI was defined as the ratio between the number of cases of a specific illness and the number of person-years at risk during that period. Person-years at risk were calculated for each patient as the sum of days at risk by period. Rates were calculated by 1000 person-years with respective 95% confidence intervals (CI) using a Poisson regression model. Trends for overall and specific OI were tested for all OI with frequency above 40 cases during the study period. Incidence rate ratios as a function of calendar period were calculated as the ratio between the incidence rate observed in the most recent period of the study (2009–2012) and the incidence rate observed in first period of the study (1987–1990).

Results

From January 1st 1987 to December 31st 2012 a total of 3378 patients met the study criteria and were included in this analysis, 1119 (33%) presented an OI during follow-up. Age at enrollment increased over the years and male sex predominated in all of the study periods, with an increase in the proportion of women in the 1994–2002 periods. CD4 cell counts at cohort enrollment have increased over the years and in the last period of the study over one third of the patients have CD4 counts at cohort enrollment higher than 350 cells/mm³ (Table 1). Moreover, when analyzing the median of CD4 counts of all patients under follow-up at each study period, we noticed that it had progressively increased over the years, reaching 458 cells/mm³ in the latter period of the study (Figure 1). The use of antiretroviral therapy also increased over the years, and in the most recent period, almost 80% of the patients were under cART (Figure 2).

During the study period, the incidence rates of overall OIs decreased from 295.4/1000 PY in 1987–1990 to 34.6/1000 PY in 2009–2012, with an incidence rate ratio (IRR) of 0.12 for the period 2009–2012 compared to 1987–1990, $p < 0.001$ (Figure 3, Table 2). Incidence rates for specific OIs have also significantly decreased over the years (Table 2). Tuberculosis, esophageal candidiasis, cerebral toxoplasmosis and PCP had the highest incidence rates during the study period.

Tuberculosis was the most incident OI, except for the first study period (1987–1990). An incidence rate over 80.8/1000 PY was observed in 1991–1993, and since then the rates have decreased with an IRR of 0.22 (2012–2009 *vs.* 1987–1990, $p < 0.001$) (Figure 3, Table 2). PCP incidence rate was 87.2/1000 PY in 1987–1990, and after that showed the steepest decline over the years, reaching an IRR of 0.03 (2012–2009 *vs.* 1987–1990, $p < 0.001$) (Figure 3, Table 2). Cerebral toxoplasmosis was the third most incident OI in 1987–1990 (incidence rate of 43.6/1000 PY), experienced over the years a significant decrease in its incidence rates (IRR = 0.09, 2012–2009 *vs.* 1987–1990, $p < 0.001$) and currently persists as the third most incident OI, with an incidence rate of 4.0/1000 PY (Figure 3, Table 2). Esophageal candidiasis was the fourth most incident OI in 1987–1990 with an incidence rate of 33.9/1000 PY, its incidence decreased over the years (IRR = 0.18, 2012–2009 *vs.* 1987–1990, $p < 0.001$), and currently it is the second most incident OI (6.1/1000 PY) (Figure 3, Table 2).

Discussion

In this study, we have shown that the incidence rates of OI decreased over the years, with a trend of reduction that began even before cART was made universally available in Brazil. These results are in agreement with those reported from others cohorts and most likely reflect improvements in the general care of HIV infected patients in addition to the use of specific OI preventive measures as well as mono and dual antiretroviral therapy [21,26,31]. The most incident OIs in our casuistic (tuberculosis, esophageal candidiasis, cerebral toxoplasmosis and PCP) are also the most frequent OIs reported in other studies from high-income and low-income settings [2,4,6].

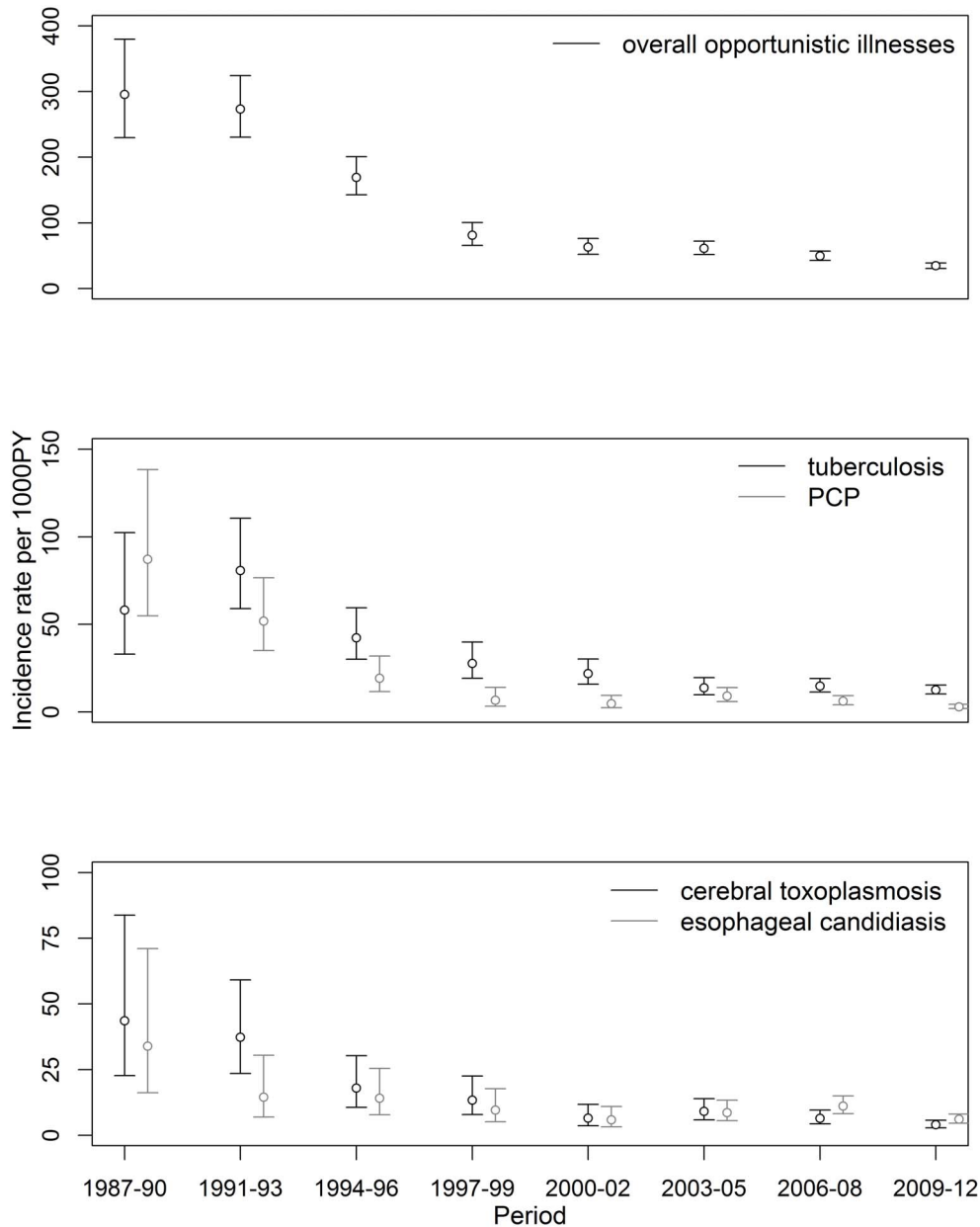


Figure 3. Incidence rates (per 1000 persons-years) and confidence interval for overall opportunistic illnesses, tuberculosis, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, cerebral toxoplasmosis and esophageal candidiasis by calendar period.
doi:10.1371/journal.pone.0098666.g003

Tuberculosis represents the most incident OI in our cohort, with an incidence rate that is currently two-fold higher than the second most incident OI, esophageal candidiasis (12.54/1000 PY vs. 6.08/1000 PY). The 85% reduction observed in tuberculosis incidence rate over the years (1991–1993 vs. 2009–2012) is similar to the incidence rate variation observed in multiple cohorts, in both high-income and low-income settings [3,6,15,39], and in our setting it might be a result of overall antiretroviral therapy expansion. In a recently published meta-analysis, the summary estimate of the risk reduction associated with the use of cART across all CD4 counts was 67% (95%CI 61–73) [42]. Randomized clinical trials such as the Cipra HAITI study and the HPTN 052 also showed a 50% reduction after cART initiation among individuals with CD4 cell counts higher than 250 cells/mm³ and 350 cells/mm³, respectively [16,41].

HIV and tuberculosis co-infection is a huge challenge for countries with high tuberculosis prevalence, as Brazil, and, in these settings, tuberculosis is still an important cause of severe morbidity [34] and the main cause of death of HIV infected individuals [17,22,45]. Unlike others OIs, tuberculosis can occur in a HIV-infected patient independent of the degree of immunodeficiency [3] and the risk of developing tuberculosis is 20 to 37 times higher in HIV infected persons than in those without HIV infection [44].

In our cohort, tuberculosis prophylaxis has been used for HIV infected patients since 1994 according to national guidelines [28]. In the guidelines, isoniazid prophylaxis is recommended for HIV-infected patients with positive tuberculin skin test (TST) and no history of previous tuberculosis [12]. Previous studies have already shown the protective effect of isoniazid prophylaxis on tuberculosis incidence, independently of cART use [1,14,15], particularly for

Table 2. First opportunistic illness after enrollment in IPEC cohort, absolute numbers and incidence rates per 1000 persons-years for 1987–2012 and by calendar period.

Person-years	1987–2012		1987–1990		1991–1993		1994–1996		1997–1999		2000–2002		2003–2005		2006–2008		2009–2012		p-value for trend ^a	IRR ^b
	n	IR	n	IR	n	IR	n	IR	n	IR	n	IR	n	IR	n	IR	n	IR		
Overall opportunistic illnesses	1119	61,70	61	295,44	132	273,47	132	169,27	85	81,21	107	63,18	142	61,30	192	49,53	268	34,65	<0,01	0,12
Tuberculosis	336	18,53	12	58,12	39	80,80	33	42,32	29	27,71	37	21,85	32	13,81	57	14,70	97	12,54	<0,01	0,22
Esophageal candidiasis	155	8,55	7	33,90	7	14,50	11	14,11	10	9,55	10	5,90	20	8,63	43	11,09	47	6,08	<0,01	0,18
Toxoplasmosis cerebral	143	7,88	9	43,59	18	37,29	14	17,95	14	13,38	11	6,50	21	9,07	25	6,45	31	4,01	<0,01	0,09
Pneumocystis carinii pneumonia	140	7,72	18	87,18	25	51,79	15	19,24	7	6,69	8	4,72	21	9,07	24	6,19	22	2,84	<0,01	0,03
Herpes simplex virus	64	3,53	4	19,37	3	6,22	1	1,28	6	5,73	18	10,63	5	2,16	11	2,84	16	2,07	<0,01	0,11
Cytomegalovirus	58	3,20	1	4,84	10	20,72	13	16,67	2	1,91	7	4,13	7	3,02	6	1,55	12	1,55	<0,01	0,32
Extrapulmonar cryptococcosis	52	2,87	1	4,84	7	14,50	5	6,41	7	6,69	6	3,54	6	2,59	8	2,06	12	1,55	<0,01	0,32
Kaposi Sarcoma	45	2,48	2	9,69	8	16,57	8	10,26	3	2,87	1	0,59	10	4,32	4	1,03	9	1,16	<0,01	0,12
Cryptosporidiosis	31	1,71	2	9,69	4	8,29	17	21,80	0	0,00	1	0,59	3	1,30	2	0,52	2	0,26	-	0,03
Isosporosis	30	1,65	3	14,53	9	18,65	4	5,13	2	1,91	2	1,18	2	0,86	4	1,03	4	0,52	-	0,04
Non tuberculosis mycobacterium	26	1,43	0	0,00	0	0,00	7	8,98	2	1,91	3	1,77	7	3,02	4	1,03	3	0,39	-	0,04 ^c
Disseminated histoplasmosis	15	0,83	1	4,84	1	2,07	3	3,85	1	0,96	1	0,59	1	0,43	2	0,52	5	0,65	-	0,13
Non-Hodgkin lymphoma	14	0,77	1	4,84	0	0,00	1	1,28	2	1,91	1	0,59	2	0,86	1	0,26	6	0,78	-	0,16

Diseases with less than 10 cases reported during the study period are not shown (progressive multifocal leukoencephalopathy n = 8, invasive cervical cancer n = 1, coccidioidomycosis n = 1).

^aTrend was tested for all illnesses with 40 cases or more during the study period.

^bIncidence rate ratio between 2009–2012 and 19987–1990 periods.

^cReference period was 1994–1996 since the IR in previous periods were equal to zero.

doi:10.1371/journal.pone.0098666.t002

those patients with positive TST [32]. Despite the fact that a meta-analysis did not find a reduction in tuberculosis incidence in TST negative patients [1], considering the high risk of false-negative results (up to 66%) in HIV infected patients [7] and operational barriers related to TST implementation and realization, the WHO recommends that in resource-constrained settings TST should not be a requirement for initiating isoniazid prophylaxis [44]. Given that operational barriers and late presentation of HIV-infected patients (that can be associated to false negative TST results) prevail in our cohort, it is possible that isoniazid prophylaxis has been underused, resulting in a high incidence of tuberculosis, even in the most recent periods. Moreover, a recent study conducted in several HIV clinics in Rio de Janeiro showed that efforts to improve coverage of isoniazid prophylaxis to HIV infected patients by training clinicians in tuberculosis prevention resulted in a significant decrease in tuberculosis incidence [14]. It is clear that efforts to properly address the tuberculosis and HIV co-infection burden in our setting are urgently needed.

Cerebral toxoplasmosis was the third most incident OI in our cohort, with an incidence rate that decreased from 43.6/1000 PY in 1987–1990 to 4.0/1000 PY 2009–2012. Both in pre and post cART era, cerebral toxoplasmosis incidence rates observed in our cohort are higher than those observed in other studies both from high and low-middle income countries [23,35,37,38]. Brazilian prevalence of *Toxoplasma gondii* infection is high [13], and specifically in the HIV-infected population this prevalence can reach 80% [46]. A significantly lower *Toxoplasma* seroprevalence has been estimated in HIV cohorts from high-income settings (11–16%) [20,24]. It is likely that the elevated incidence rates of cerebral toxoplasmosis observed in our cohort is a result of the high burden of toxoplasmosis infection in Brazil.

PCP was the most incident OI in the first period of our study, with incidence rates comparable to those observed in high-income cohorts in pre cART era [25,40]. The decreasing trend in the incidence rate of PCP likely results from the use of chemoprophylaxis and antiretroviral therapy. Currently PCP incidence rate in our cohort is lower than that observed in both in high income and low-middle income settings in the post cART era [10,23,25,33,35].

References

- Akolo C, Adetifa I, Shepperd S, Volmink J (2010). Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev*(1): Cd000171.
- Badri M, Maartens G, Bekker LG, Wood R (2005). The spectrum and prognosis of AIDS-defining illnesses in Cape Town. *The Southern African Journal of HIV Medicine* 6(2): 11–16.
- Badri M, Wilson D, Wood R (2002). Effect of highly active antiretroviral therapy on incidence of tuberculosis in South Africa: a cohort study. *Lancet* 359(9323): 2059–2064.
- Brodt HR, Kamps BS, Gute P, Knupp B, Staszewski S, et al. (1997). Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *Aids* 11(14): 1731–1738.
- Buchacz K, Baker RK, Moorman AC, Richardson JT, Wood KC, et al. (2008). Rates of hospitalizations and associated diagnoses in a large multisite cohort of HIV patients in the United States, 1994–2005. *Aids* 22(11): 1345–1354.
- Buchacz K, Baker RK, Palella FJ Jr, Chmiel JS, Lichtenstein KA, et al. (2010). AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994–2007: a cohort study. *Aids* 24(10): 1549–1559.
- CDC (1991). Purified protein derivative (PPD)-tuberculin anergy and HIV infection: guidelines for anergy testing and management of anergic persons at risk of tuberculosis. *MMWR Recomm Rep* 40(RR-5): 27–32.
- CDC (1992). 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR Recomm Rep* 41(RR-17).
- Chaisson RE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Creagh T (1992). Incidence and natural history of *Mycobacterium avium*-complex infections in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *Am Rev Respir Dis* 146(2): 285–289.
- Charurat M, Blattner W, Hershov R, Buck A, Zorrilla CD, et al. (2004). Changing trends in clinical AIDS presentations and survival among HIV-1-infected women. *J Womens Health (Larchmt)* 13(6): 719–730.
- Coelho L, Veloso VG, Grinsztejn B, Luz PM (2013). Trends in overall opportunistic illnesses, *Pneumocystis carinii* pneumonia, cerebral toxoplasmosis and *Mycobacterium avium* complex incidence rates over the 30 years of the HIV epidemic: a systematic review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.
- Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, et al. (2009). III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *J Bras Pneumol* 35(10): 1018–1048.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139(11): 1375–1424.
- Durovni B, Saraceni V, Moulton LH, Pacheco AG, Cavalcante SC, et al. (2013). Effect of improved tuberculosis screening and isoniazid preventive therapy on incidence of tuberculosis and death in patients with HIV in clinics in Rio de Janeiro, Brazil: a stepped wedge, cluster-randomised trial. *Lancet Infect Dis* 13(10): 852–858.
- Golub JE, Pronyk P, Mohapi L, Thsabangu N, Moshabela M, et al. (2009). Isoniazid preventive therapy, HAART and tuberculosis risk in HIV-infected adults in South Africa: a prospective cohort. *Aids* 23(5): 631–636.
- Grinsztejn B, Hosseinipour M, Ribaldo H, Havlir D, Cohen M, et al. (2014). Effects of Early versus Delayed Initiation of Antiretroviral Therapy on HIV Clinical Outcomes: Results from the HPTN 052. *Lancet Infect Dis* Accepted.
- Grinsztejn B, Luz PM, Pacheco AG, Santos DV, Velasque L, et al. (2013). Changing mortality profile among HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil: shifting from AIDS to non-AIDS related conditions in the HAART era. *PLoS One* 8(4): e59768.

18. Grinsztejn B, Veloso VG, Friedman RK, Moreira RI, Luz PM, et al. (2009). Early mortality and cause of deaths in patients using HAART in Brazil and the United States. *Aids* 23(16): 2107–2114.
19. Grinsztejn B, Veloso VG, Pilotto JH, Campos DP, Keruly JC, et al. (2007). Comparison of clinical response to initial highly active antiretroviral therapy in the patients in clinical care in the United States and Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45(5): 515–520.
20. Israelski DM, Chmiel JS, Poggensee L, Phair JP, Remington JS (1993). Prevalence of Toxoplasma infection in a cohort of homosexual men at risk of AIDS and toxoplasmic encephalitis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6(4): 414–418.
21. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, et al. (2000). Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 30 Suppl 1: S5–14.
22. Lawn SD, Harries AD, Anglaret X, Myer L, Wood R (2008). Early mortality among adults accessing antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa. *Aids* 22(15): 1897–1908.
23. Ledergerber B, Egger M, Erard V, Weber R, Hirschel B, et al. (1999). AIDS-related opportunistic illnesses occurring after initiation of potent antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study. *Jama* 282(23): 2220–2226.
24. Mathews WC, Fullerton SC (1994). Use of a clinical laboratory database to estimate Toxoplasma seroprevalence among human immunodeficiency virus-infected patients. Overcoming bias in secondary analysis of clinical records. *Arch Pathol Lab Med* 118(8): 807–810.
25. Mocroft A, Sabin CA, Youle M, Madge S, Tyrer M, et al. (1999). Changes in AIDS-defining illnesses in a London Clinic, 1987–1998. *J Acquir Immune Defic Syndr* 21(5): 401–407.
26. Mocroft A, Youle M, Phillips AN, Halai R, Easterbrook P, et al. (1998). The incidence of AIDS-defining illnesses in 4883 patients with human immunodeficiency virus infection. Royal Free/Chelsea and Westminster Hospitals Collaborative Group. *Arch Intern Med* 158(5): 491–497.
27. Moreira RI, Luz PM, Struchiner CJ, Morgado M, Veloso VG, et al. (2011). Immune status at presentation for HIV clinical care in Rio de Janeiro and Baltimore. *J Acquir Immune Defic Syndr* 57 Suppl 3: S171–178.
28. 47.MS (1994). Co-infecção TB/HIV/AIDS: Manual de Normas. P. N. d. DST/AIDS. Brasília: 1–20.
29. 12.MS (1999). Terapia Anti-retroviral e Saúde Pública. Um balanço da experiência brasileira.
30. Pacheco AG, Tuboi SH, May SB, Moreira LFS, Ramadas L, et al. (2009). Temporal Changes in Causes of Death Among HIV-Infected Patients in the HAART Era in Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51(5): 624–630 [10.1097/QAI.1090b1013e3181a1094ecf1095](https://doi.org/10.1097/QAI.1090b1013e3181a1094ecf1095).
31. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, et al. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338(13): 853–860.
32. Pape JW, Jean SS, Ho JL, Hafner A, Johnson WD Jr (1993). Effect of isoniazid prophylaxis on incidence of active tuberculosis and progression of HIV infection. *Lancet* 342(8866): 268–272.
33. Podlasin RB, Wiercinska-Drapalo A, Oleczak A, Beniowski M, Smiatcz T, et al. (2006). Opportunistic infections and other AIDS-defining illnesses in Poland in 2000–2002. *Infection* 34(4): 196–200.
34. Ribeiro S, Luz PM, Campos D, Moreira R, Japiassu A, et al. (2013). Incidence and determinants of severe morbidity among HIV-infected patients from Rio de Janeiro, Brazil, 2000–2010. *Antiviral Therapy*.
35. Rojanawiwat A, Tsuchiya N, Pathipvanich P, Pumpradit W, Schmidt W-P, et al. (2011). Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health* 3(2): 101–107.
36. Sackoff JE, Hanna DB, Pfeiffer MR, Torian LV (2006). Causes of death among persons with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy: New York City. *Ann Intern Med* 145(6): 397–406.
37. 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(2): 257–260.
38. San-Andres FJ, Rubio R, Castilla J, Pulido F, Palao G, et al. (2003). Incidence of acquired immunodeficiency syndrome-associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected with human immunodeficiency virus, 1989–1997. *Clin Infect Dis* 36(9): 1177–1185.
39. Santoro-Lopes G, de Pinho AM, Harrison LH, Schechter M (2002). Reduced risk of tuberculosis among Brazilian patients with advanced human immunodeficiency virus infection treated with highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 34(4): 543–546.
40. Schwarcz L, Chen MJ, Vittinghoff E, Hsu L, Schwarcz S (2013). Declining incidence of AIDS-defining opportunistic illnesses: results from 16 years of population-based AIDS surveillance. *Aids* 27(4): 597–605.
41. Severe P, Juste MA, Ambroise A, Eliacin L, Marchand C, et al. (2010). Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti. *N Engl J Med* 363(3): 257–265.
42. Suthar AB, Lawn SD, del Amo J, Getahun H, Dye C, et al. (2012). Antiretroviral therapy for prevention of tuberculosis in adults with HIV: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 9(7): e1001270.
43. 16.WHO (2007). WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children.
44. 29.WHO (2011). Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings.
45. 11.WHO (2012). Global tuberculosis Report.
46. Xavier GA, Cademartori BG, Cunha Filho NA, Farias NA (2013). Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in the south of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55(1): 25–30.
47. Yazdanpanah Y, Chene G, Losina E, Goldie SJ, Merchadou LD, et al. (2001). Incidence of primary opportunistic infections in two human immunodeficiency virus-infected French clinical cohorts. *Int J Epidemiol* 30(4): 864–871.

Anexo 8c: Produção científica durante o Doutorado

- c) Six-month survival of critically ill patients with HIV-related disease and tuberculosis: a retrospective study

Ana Carla Pecego, **Rodrigo Teixeira Amancio**, Camila Ribeiro, Emersom C Mesquita, Denise M Medeiros, José Cerbino, Beatriz Grinsztejn, Fernando A Bozza and André M Japiassu

Submetido à *BMC Infectious Diseases*: 7 Janeiro 2015

1 **Title: Six-month survival of critically ill patients with HIV-related disease**
2 **and tuberculosis: a retrospective study**

3

4 **Authors:**

5 Ana Carla Pecego¹, Rodrigo T Amancio¹, Camila Ribeiro¹, Emersom C
6 Mesquita¹, Denise M Medeiros¹, José Cerbino¹, Beatriz Grinsztejn², Fernando
7 A Bozza^{1,3} Andre M Japiassu¹

8

9 **Institutions:**

10 - Intensive Care Clinical Research Laboratory¹ and STD/AIDS Clinical
11 Research Laboratory ², National Institute of Infectious Diseases (NIID).
12 Address: Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Zip code:
13 21045-900

14 - Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino³, Rio de Janeiro, Brazil. Address: Rua
15 Diniz Cordeiro, n° 30, Botafogo, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Zip code: 22281-
16 100

17

18 **Emails of the Authors**

19 Ana Carla Pecego - anacarlopecego@gmail.com
20 Rodrigo T Amancio – amancio.rt@gmail.com
21 Camila Ribeiro - camilarisi@yahoo.com.br
22 Emersom C Mesquita - emersomcm@hotmail.com
23 Denise M Medeiros - de.medeiros@uol.com.br
24 José Cerbino - jose.cerbino@ipecc.fiocruz.br
25 Beatriz Grinsztejn - beatriz.grinsztejn@gmail.com
26 Fernando A Bozza - bozza.fernando@gmail.com
27 Andre M Japiassu - andrejapi@gmail.com
28 s

29 **Corresponding Author:** André M Japiassú, MD, PhD

30 Email: andrejapi@gmail.com or andre.japiassu@ipecc.fiocruz.br

31 Address: National Institute of Infectious Diseases, FIOCRUZ, Av Brasil 4365,
32 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Zip code: 21045-900

33

1 ABSTRACT (300 words)

2 **Background:**

3 Tuberculosis is one of the leading causes of death from infectious diseases
4 worldwide, mainly after the human immunodeficiency virus (HIV) epidemics.
5 Patient with HIV-related illness are more likely to present with severe TB due to
6 immunosuppression. Very few studies have explored HIV/TB co-infection in
7 critically ill patients. The goal of this study was to analyze factors associated
8 with long-term mortality in critically ill patient with HIV-related disease
9 coinfecting with TB.

10 **Methods:** We conducted a retrospective study in an infectious disease
11 reference center in Brazil that included all patient with HIV-related illness
12 admitted to the ICU with confirmed tuberculosis from March 2007 until June
13 2012. Clinical and laboratory variables were analyzed based on 6-month
14 survival.

15 **Results:** Forty-four patients with HIV-related illness with a confirmed diagnosis
16 of tuberculosis were analyzed. The 6-month mortality was 52% (23 patients).
17 The median age was 34 [IQR: 19-44.5] years, and there was a predominance
18 of males (70%). The main causes of admission were respiratory failure (41%),
19 severe sepsis/septic shock (32%) and coma/torpor (14%). The median time
20 between AIDS diagnosis and ICU admission was 5 (1-60) months, and 41% of
21 patients received their HIV infection diagnosis \leq 30 days before admission. The
22 median CD4 count was 72 (IQR: 23-136) cells/mm³. The clinical presentation
23 was pulmonary tuberculosis in 22 patients (50%) and disseminated TB in 20
24 patients (45.5%). No aspect of TB diagnosis or treatment was different
25 between survivors and nonsurvivors. Neurological dysfunction was more
26 prevalent among nonsurvivors (43% vs. 14%, $p=0.04$). The nadir CD4 cell
27 count was the only variable that was independently associated with 6-month
28 survival (odds ratio 5.7, CI 95% [1.5-20.8], $p<0.01$).

29 **Conclusion:** In endemic areas, tuberculosis occurs in severely
30 immunosuppressed patient with HIV-related disease who present with multiple
31 organ dysfunctions and is associated with a 6-month mortality. We recommend
32 that TB should be highly considered in critically ill HIV patient with very low
33 CD4 cell count.

1 **Keywords:** Patient with HIV-related disease; AIDS; Tuberculosis; Co-infection;
2 intensive care unit; Mortality; Patient outcome;

3

4 **INTRODUCTION**

5 Tuberculosis remains a global health problem, and the leading causes of death
6 from infectious diseases worldwide, mainly after the human immunodeficiency
7 virus (HIV) epidemics. The main population affected by TB mortality is HIV-
8 positive individuals. Throughout 2014, 1,5 million deaths occurred, of which 0.4
9 million were among seropositive patients (1).

10 While we have seen an increase in development of novel diagnostic
11 tests and antimicrobial agents in recent years, TB prophylaxis and treatment
12 regimens are frequently missing or incomplete (1).

13 Fifteen percent of new TB cases in Brazil are among HIV-infected
14 individuals, which reinforces the recommendation for systematic TB screening
15 for hospitalized patients with HIV-related disease (2-4). HIV-positive persons
16 that present advanced immunosuppression more frequently present
17 hematogenous dissemination of the bacillus and multiorgan involvement, and
18 are frequently smear-negative, requiring blood cultures and invasive
19 procedures for diagnosis (5-7) (8).

20 HIV-TB coinfection accounts for 26.6% of TB mortality rate (1), and the
21 subgroup of patients that require ICU has an even worse prognosis (4).
22 Respiratory failure is the most frequent cause of ICU admission of patients with
23 HIV-related illness, and TB is associated with distinct prevalence according to
24 the geographic location where the studies are performed (9-11).

25 Very few studies have explored HIV/TB coinfection in critically ill
26 patients (9,12). Disseminated presentation of TB, low serum albumin levels,
27 delayed diagnosis and multilobar lung involvement have been identified as
28 markers of poor prognosis (8,9,13,14). Additionally, there is uncertainty about
29 absorption of anti-tuberculostatic medications, and drug interactions with
30 antiretroviral therapy are still of concern, mainly when rifampicin and protease
31 inhibitors are prescribed simultaneously (8,10).

32 The purpose of this study was to identify factors associated with 6-
33 month mortality of critically ill patients with HIV-related disease, with confirmed
34 diagnosis of TB in a major referral center for HIV care in Rio de Janeiro, Brazil.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

MATERIALS AND METHODS

Design and setting

This is a retrospective study conducted at the ICU of the National Institute of Infectious Disease at Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, Brazil. Our institution has provided care to HIV-positive patients since 1986. There are currently over 3.300 HIV-positive adult under active follow-up at Outpatient Clinic. Cohort characteristics have been published elsewhere (15; 16). We admit approximately 60-70 patients with HIV-related disease per year in the ICU.

Ethics Statement

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and local ethical legislation. The Institutional Review Board (Research Ethics Committee from National Institute of Infectious Diseases (FIOCRUZ) approved the study protocol, and informed consent was waived.

Definitions, selection of participants and data collection

Study procedures

All files of patients with HIV-related disease admitted to the ICU who received TB treatment from March 2007 to June 2012 were retrospectively reviewed. Only patients with laboratory confirmed tuberculosis were included in this report. The follow-up for 6-month survival was checked through consulting electronic data chart of ambulatory and hospital assistance.

Clinical variables related to HIV infection were: cART exposure, time from HIV diagnosis until ICU admission, nadir CD4 cell count, CD4 cell count and HIV viral load recorded at ICU admission or collected in the previous three months prior to hospital admission. Variables for tuberculosis infection were: clinical presentation of tuberculosis (pulmonary, extra-pulmonary, and disseminated), clinical specimens that allowed microbiological TB confirmation, anti-tuberculosis drugs prescribed while staying in the ICU, and *Mycobacterium tuberculosis* resistance diagnosed by culture.

The severity of illness was evaluated using the Simplified Acute Physiological Score (SAPS) II and Sequential Organ Failure Assessment score

1 (SOFA). The SAPS II score assigns points based on age, type of admission
2 (scheduled surgical, unscheduled surgical, or medical), 12 physiological
3 variables, and three underlying disease variable (AIDS, metastatic cancer, and
4 hematologic malignancy); this score expresses the level of acute severity along
5 with age and the presence of these severe comorbidities in the first 24 hours
6 after ICU admission (18). The score varies from 0 to 163 points, and the higher
7 the SAPS II value, the less is the probability of survival. SOFA score is a semi-
8 quantitative score of 6 organ dysfunctions, named cardiovascular, respiratory,
9 neurological, hematological, hepatic and renal dysfunctions (19). It classifies a
10 range of 6 organ dysfunctions: cardiovascular (hypotension or use of
11 vasopressors); respiratory (PaO₂/FiO₂ rate); neurological (Glasgow Coma
12 Scale); renal (serum creatinine level and/or daily diuresis); hepatic (serum
13 bilirubin level); and hematological (platelets level). The score goes from 0 to 24
14 points, and it can be calculated on a daily basis, in order to evaluate the
15 patient's improvement or worsening. SOFA also gives qualitative information
16 about the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). For ease of
17 interpretation, we also evaluated the initial SOFA score (day 1), since one
18 score higher than 11 points is associated with less than 20% chance of survival
19 (20). We also evaluated the use of vasoactive drugs, non-invasive and invasive
20 ventilation support, and hemodialysis. We classified all ICU admission
21 diagnoses as: respiratory failure; circulatory shock; coma/torpor and
22 miscellaneous.

23 Demographic and clinical data were categorized according to the
24 survival after 6 months. The results were displayed as frequency (percentage),
25 median values and interquartile range. If a patient had multiple ICU
26 admissions, only the first was included in this analysis. The ICU team,
27 infectious disease specialist and family members in accordance with local
28 practices shared decisions regarding withholding or withdrawal of treatment.

29

30 **Case definition**

31 Tuberculosis was considered confirmed if the bacteriologic case definition was
32 met: direct visualization of acid-fast bacilli (Ziehl-Neelsen stain), ("smear
33 positive"), or a positive culture for *Mycobacterium tuberculosis* in Lowenstein-
34 Jensen or liquid medium (MIGT). A histopathological result consistent with

1 *Tuberculosis* in a patient with high clinical suspicion was also considered a
2 confirmed case. Patients were excluded if central nervous system (CNS)
3 involvement was highly suggested by CT scan and/or CNS fluid exams, since
4 CNS tuberculosis infection carries a much higher mortality per se, and could
5 overscore on CGS (21). Besides the high mortality rate it could distort the
6 analysis of the group, and therefore it should be analyzed separately.

7 Combined antiretroviral treatment (cART) exposure before ICU entry
8 meant any cART use regardless of adherence to the treatment. We defined
9 cART as administration of three antiretroviral drugs belonging to at least two
10 classes (i.e., nucleoside reverse-transcriptase inhibitor, non-nucleoside
11 reverse-transcriptase inhibitor, protease inhibitor, integrase inhibitor).

12 In our population, we had two scenarios of the administration of TB
13 drugs while in the ICU, according to the hemodynamic status. First, TB drugs
14 were delivered intravenously when patients needed infusion of vasoactive
15 drugs; fluoroquinolones and aminoglycosides were the drugs of choice. In the
16 second scenario, TB drugs could be delivered via enteral or oral route, as the
17 patients were hemodynamically stable.

18 Disseminated TB was defined when: thoracic X-ray or CT scan showed
19 a pattern that indicated dissemination; two non-contiguous sites were involved
20 in accordance with WHO 2013; or *Mycobacterium tuberculosis* was recovered
21 from the bloodstream (1).

22 Drug resistance was defined as resistant to ≥ 1 drug (17), and
23 Multidrug-resistant tuberculosis (MDR) defined as TB caused by strains of
24 *Mycobacterium tuberculosis* that are resistant to at least isoniazid and
25 rifampicin (22).

26

27 **Laboratory procedures**

28 Resistance towards anti-TB drugs was determined by culture methods using
29 liquid media or Lowenstein-Jensen slants.

30

31 **Statistical analysis**

32 We analyzed the clinical and laboratory variables according to 6-month
33 survival after ICU admission using GraphPad Prism version 6.0 for MAC OS X
34 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and Epi Info™ version 7.1

1 (Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA). The numerical demographic
2 variables were expressed as the median and the interquartile range (IQ 25%-
3 75%). All of the numerical variables were tested for normality using the
4 Kolmogorov-Smirnov test. We compared continuous variables using a t-test
5 (parametric distribution) and the Mann–Whitney U test (nonparametric
6 distribution). The categorical variables were compared using the chi-squared
7 test and Fisher’s exact test. We performed a logistic regression to analyze
8 factors associated with 6-month survival, selecting variables with p values
9 lower than 0.2 in the univariate comparison. A Kaplan-Meier curve was
10 constructed based on independent factors associated with 6-month survival.

11

12 **RESULTS**

13 ***Clinical characteristics of patient with HIV-related illness with*** 14 ***tuberculosis in the ICU***

15 During the 5 years study period, 267 HIV/AIDS patients were admitted to the
16 ICU and 63 received tuberculostatic treatment. Among these, 49 had
17 laboratory-confirmed tuberculosis; from these, 4 patients were excluded
18 because of confirmed TB CNS involvement and 1 patient was transferred to
19 another hospital. A total of 44 patients with HIV-related disease with confirmed
20 Tuberculosis were included in the study. All patients were followed up to 6
21 months after ICU discharge. There was no loss of follow-up of these 44
22 patients. The ICU mortality was 48% (21 patients), 1 patient died after being
23 transferred to the hospital ward and 1 patient died within the following 6
24 months after ICU discharge (figure 1).

25 The median age was 34 [IQR: 19-44.5] years, with a predominance of
26 males (70%). The main reasons for ICU admission were respiratory failure
27 (41%), severe sepsis/septic shock (32%), coma/torpor (14%), and
28 miscellaneous (13%). The SAPS II score was 47 (37-55) points, and the SOFA
29 score on day 1 of the ICU stay was 4 (1-8) points. Mechanical ventilation was
30 needed in 63% of patients and was less frequent for survivors than
31 nonsurvivors (48% vs. 78%, p=0.05). Vasoactive drugs were used in 9 (43%)
32 survivors and 16 (70%) nonsurvivors (p=0.12).

33 The median time length between HIV-infection diagnoses and ICU

1 admission was 5 (IQR 1-60) months; 41% (20) of the patients were diagnosed
2 with HIV-infection within 30 days of hospital admission. The length of time
3 between HIV-infection diagnosis and hospital admission was higher in
4 nonsurvivors (28 [1-72] vs. 1 [1-16] months, $p=0.03$). The nadir CD4 cell count
5 was also lower in nonsurvivors than in survivors (23 [14-84] vs. 73 [30-177]
6 cells/mm³, $p=0.04$). The median viral load was 113,637 (2.995-365.663)
7 copies/mm³, and was similar in survivors and nonsurvivors (35,149 [212-
8 300,184] vs. 169,133 [35,405-419,382] copies/ml, respectively, $p=0.13$). The
9 most recent CD4 cell count was 36 [15-80] in nonsurvivors vs. 100 [58-243]
10 cells/mm³ in survivors ($p=0.01$); but the information about recent CD4 cell
11 count is from 7 days after the ICU admission till up to 9 months before ICU
12 admission, what turns this variable highly heterogeneous and subjected to
13 misinterpretation. Twenty-five (57%) patients were previously exposed to
14 cART, and only 4 (9%) presented with undetectable viral load (less than 50
15 copies/ml). Combined ART was used in 17 (39%) patients while in the ICU,
16 with no statistical difference in both, hospital mortality ($p=0.08$) and in 6 months
17 survival ($p=0.35$). There was no difference in 6-month mortality between
18 survivors and nonsurvivors using cART during the first week of ICU stay (38%
19 vs 17%, $p=0.09$), or during the 2nd week (33% vs 35%, $p=0.78$).

20 SOFA score (5 points [2-8] vs. 1 point [0-7], $p=0.08$), use of
21 vasopressors (70% vs. 43%, $p=0.12$) and mechanical ventilation (78% vs.
22 48%, $p=0.05$) were also higher in the nonsurvivors group.

23

24 **Sites and basis for TB diagnosis**

25 Twenty-two pulmonary TB cases (50%) and 20 ~~(50%)~~ disseminated (45.5%)
26 TB cases were equally distributed between the 2 groups. Extrapulmonary
27 tuberculosis was diagnosed in only 2 patients (4.5%), both with isolated lymph
28 node tuberculosis (Table 2). Tuberculosis was diagnosed from respiratory
29 samples in the majority of cases. Thirty-two (73%) patients were presumably
30 diagnosed through direct visualization of the bacillus using the Ziehl-Neelsen
31 technique (27 sputum and 5 BAL); the diagnosis was only made through
32 culture of respiratory specimens in 5 (11%) patients. Bacteremia due to
33 *Mycobacterium tuberculosis* was found in 6 (14%) patients. Eleven (25%)
34 patients required invasive procedures for TB diagnosis, such as organ biopsy.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

TB treatment and Hospital mortality

Twenty-eight patients (64%) initiated TB treatment before ICU admission. The median time from the beginning of TB treatment to ICU admission was -5 (-27 to 2 days) in survivors group and -9 (-39 to 0 days) in the nonsurvivors group (p=0.16). We also tested the beginning of the TB treatment as categorical data: 57% of the survivors began treatment before the ICU admission, while 61% of the nonsurvivors received TB drugs before ICU admission (p=0.77). The main anti-TB drugs prescribed were RMP in 41 patients (93%), PZA in 42 patients (92%), INH in 40 patients (90%), and ethambutol in 34 patients (72%) (Table 2). Intravenous fluoroquinolones and aminoglycosides were prescribed additionally as part of the TB treatment in 27 (61%) and 22 (50%) patients, respectively. Hospital mortality was similar in patients with pulmonary and disseminated TB (54% and 50%, respectively, p=1.00).

No aspect of TB diagnosis or treatment was different in survivors or nonsurvivors. We identified resistance to *M. tuberculosis* in specimen cultures from 5 (11%) patients: resistance to streptomycin (n=4), isoniazid (n=2), and rifampin (n=1). Three of these 5 patients were classified as having resistant *M. tuberculosis*. From these five patients, only one patient with isolated resistance to streptomycin survived; the other four patients with a pattern of resistance died. None of 44 patients included had MDR Mycobacterium tuberculosis strains.

Organ dysfunction and 6-month outcome

The SOFA score was significantly higher in nonsurvivors on the first day in the ICU. For this reason, we decided to determine if any of the 6 organ dysfunctions could be associated with 6-month survival. A univariate analysis was undertaken for neurological, cardiovascular, respiratory, renal, hepatic and hematological dysfunctions, and only neurological dysfunction was statistically different: 10 (43%) nonsurvivors vs. 3 (14%) survivors presented with neurological dysfunction, p=0.04 (Table 1). Neurological dysfunction was identified using the Glasgow Coma Scale (GCS) in 13 patients: 9 had a GCS of 13-14 points (somnolence), and 4 patients presented with a GCS of 8-10

1 points (torpor). One patient had seizures, 2 patients had gait disturbances and
2 1 patient had paresthesia. None had neck stiffness, delirium or intracranial
3 hypertension. However, it is worth noting that we did not use systematically the
4 Confusion Assessment Method for the ICU (CAM-ICU) (20), a validated clinical
5 instrument for detecting brain dysfunction of critically ill patients. Of the 4
6 patients with a GCS of less than 12 points, all had brain CT scans and 3 had
7 liquor studies: Three patients were diagnosed with neurotoxoplasmosis and 1
8 patient had negative results.

9 The nadir CD4 cell counts lower than 50 cells/mm³ was the only
10 variable that independently associated with 6-month survival (odds ratio 6.96,
11 [CI 95% 1.47-32.82], p=0.01). We observed a lower 6-month survival in
12 patients with nadir CD4 cell counts lower than 50 cells/mm³ (log rank test
13 p=0.006) (Table 3 and Figure 2).

14

15 **DISCUSSION**

16 In our center, presumed TB accounted for 24% of ICU admission and
17 two-thirds of these had a confirmed TB diagnosis. Nadir CD4 cell count was
18 the only independent marker for 6-month mortality among these severely ill
19 HIV-TB patients. Neurological dysfunction was also more frequent in
20 nonsurvivors, even after the exclusion of those patients with primary TB CNS
21 involvement.

22

23 HIV infection and Critical Illness

24 Since the beginning of the HIV epidemic, respiratory failure has been
25 the main reason for ICU admission with the spectrum of etiological agents
26 changing according to the geographic region and cART access (24-27).
27 Influenza, pneumococcal vaccination and TB background prevalence also
28 influence the main causes of respiratory disease in this population (28-31).
29 Tuberculosis is highly prevalent in Brazil, mainly in Rio de Janeiro, and the HIV
30 infection epidemic has made TB a common cause of opportunistic infections
31 responsible for AIDS diagnosis in our population (2,32). Rio de Janeiro has
32 one of the worst scenarios in regards to the Tuberculosis epidemic in Brazil. In
33 2012, 10,649 new tuberculosis cases were diagnosed in Rio de Janeiro State,
34 with an incidence rate of 65.6/100.000 person-years, a rate much higher than

1 the overall country incidence rate of 35.8/100.000 person-years. The mortality
2 rate among TB patients from Rio de Janeiro is the second highest in the entire
3 country, reaching 5.1/100.000 person-years.

4 Respiratory failure is the main reason for ICU admission among
5 pulmonary HIV-TB patients (8-10), as we described in our population, even
6 though 45% of patients present with disseminated tuberculosis. Isolated
7 extrapulmonary disease was uncommon (5%).

8 Severe immunosuppression caused by HIV infection is a known risk
9 factor for tuberculosis (7). As immunosuppression evolves, the TB disease
10 spectrum changes from its classic pulmonary presentation of unilateral upper
11 lobe infiltrate to a broad range of nonspecific signs and symptoms related to
12 hematogenic spread of the bacillus. The myriad of presentations of TB in the
13 population with HIV-related disease is associated with challenges in
14 establishing the diagnosis and higher mortality (32). Our high proportion of
15 disseminated TB (45%) is due to the advanced immunodeficiency status of our
16 population, with median CD4 cell counts of 72 cells/mm³, which were lower
17 than previously reported (109 and 112 CD4 cells/mm³) (27,28). CD4 cell count
18 is thought to be an unreliable predictor of ICU mortality, according to Morris
19 and colleagues, when compared to other known risk factors, such as
20 mechanical ventilation, low serum albumin and APACHE II score (11, 33-36).
21 However, others authors believe that CD4 cell count does have a correlation
22 with a poorer prognosis (24, 37-39). Low CD4 counts (<200 cells/mm³) have
23 been associated with ICU mortality in HIV patients with TB (40). In the present
24 study, we found that patients with higher nadir CD4 cell counts were more
25 likely to be alive 6 months after hospital discharge. This is in accordance with
26 Nickas and collaborators, which supports the idea that CD4 cell counts at ICU
27 admission are a better marker of long-term prognosis (41). We preferred nadir
28 than recent CD4 cell count because it is better marker of prognosis and
29 disease evolution in HIV infected population (42, 43). However it is important to
30 notice that we observed a low median CD4 count close to ICU admission (72
31 cells/mm³), which can lowered by concomitant acute infections, mainly TB (44),
32 but also refers to a very immunocompromised population. As show earlier from
33 our institution's cohort, the HIV diagnosis frequently occurs during an
34 advanced immunodeficiency state, which can be associated with a high

1 prevalence of tuberculosis (45). Earlier diagnosis is fundamental to diminish
2 the complications of the advanced immunodeficiency.

3 Delivering cART in critically ill patients is still controversial. The limited
4 availability of intravenous medications, potential drug-to-drug interactions,
5 erratic gastrointestinal absorption and the risk of unmasking infections and
6 IRIS are considerations in the setting of critically ill patient with HIV-related
7 disease (36, 37, 52). The administration of cART did not influence short- or
8 long-term survival in our study, but we cannot conclude that cART
9 administration in the ICU is not beneficial. It was not possible to assure
10 adherence of all patients taking cART, which is fundamental to the success of
11 the treatment. In the present study, we did not find IRIS criteria in any case,
12 nor did we find any severe adverse reactions attributed to cART.

13 14 Characteristics of Tuberculosis Infection

15 The recovery of *M. tuberculosis* from blood cultures is suggestive of
16 disseminated TB, and we found bacteremia in 23% of patients. This is a
17 common etiologic agent of sepsis in population with HIV-related disease, as
18 observed in two published works by our group and other groups (11, 28, 42-
19 47). Research suggests that patients with disseminated and extra-pulmonary
20 forms of tuberculosis may represent a special group that may be associated
21 with worse outcomes, including greater risk for the tuberculosis immune
22 reconstitution inflammatory syndrome (49). TB treatment in the acute phase of
23 critically ill patients can often be suboptimal (50,51) because first line drugs are
24 only available in oral formulations. One could suppose that intravenous
25 treatment could improve outcomes (fluoroquinolones and aminoglycosides).
26 However, in this case series, we found a high proportion of critically ill patients
27 using rifampin, isoniazide and pyrazinamide, and half of our patients received
28 intravenous quinolones and/or aminoglycosides as the first treatment for TB
29 with no difference in 6-month survival.

30 31 Risk factors for long-term mortality

32 The 6-month mortality observed in our study was high (52%), but lower
33 than reported from other retrospective studies involving patients with TB
34 admitted to the ICU (hospital mortality 22-67%) (10, 40, 53). Another

1 interesting point was that the disseminated form of TB had a similar mortality to
2 pulmonary presentation (45% and 50%, respectively). This may be different
3 from another study, which enrolled 46 HIV-TB patients, including suspected
4 cases of TB, although we included only confirmed cases (10). Finally,
5 improvements in the care of critically ill patients, such as implementation of
6 protective ventilator strategies with low tidal volume, conservative fluid strategy
7 for Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), and early sepsis goals, have
8 added benefits and have recently had an impact on lower mortality rates (27,
9 33, 53).

10 This study highlights neurological dysfunction as being an important
11 marker for mortality among critically ill HIV-TB patients. These findings cannot
12 be attributed to encephalitis or meningitis that is primarily caused by TB. We
13 excluded CNS involvement (encephalitis or meningitis), which carries a poorer
14 prognosis (55, 56). All patients with $GCS \leq 11$ had a lumbar puncture
15 performed. The majority of our neurological findings were mild; most of them
16 were classified as torpor. As shown previously, low GCS at admission can be a
17 reliable predictor of ICU mortality (34, 57). In our analysis, neither SOFA nor
18 SAPS II was able to predict survival. Another 2 studies have found correlation
19 between higher SAPS II and ICU mortality (34, 50). Zahar et al investigated
20 laboratory-confirmed tuberculosis cases, 38% were patients with HIV-related,
21 all with respiratory failure, and the majority with a pulmonary presentation;
22 higher SAPS II (approximately 45 points) and the presence of more than 1
23 organ failure were significantly associated with mortality (50). Meybeck et al
24 showed that SAPS II was significantly higher in nonsurvivors (approximately 55
25 points) with an odds ratio of 1.05 per point (34). The SAPS II score was similar
26 between 6-month survivors and nonsurvivors in our study, while SOFA scores
27 on the day of ICU admission trended towards being higher in nonsurvivors
28 ($p=0.08$).

29

30 Limitations of the study

31 We realize that our study has several limitations. First, it is a retrospective
32 single-center study conducted in a specialized infectious disease hospital, and
33 these findings cannot be extrapolated to other centers. The fact that we did not
34 find IRIS in our population may be due to the retrospective nature of the study

1 since we did not have clear definitions since the beginning of our cohort. The
2 limited number of patients (44 patients) is another limitation of our study since
3 we are exploring a very specific population. However, the results here
4 presented should increase awareness to important factors that may contribute
5 to a better management of HIV-TB patients in the ICU, and for pointing to
6 future researches. Regarding the neurological findings, due to its retrospective
7 nature, we were not able to detect broader neurological involvement, such as
8 delirium and intracranial hypertension (57). Delirium screening using the CAM-
9 ICU assessment is not a routine practice at our institution.

10

11 **CONCLUSIONS**

12 The coinfection HIV-TB presents poor prognosis when critical illness occurs,
13 particularly when the previous CD4 cell count is lower than 50 cells/mm³.
14 Clinicians may have to begin TB treatment in suspected cases in endemic
15 areas before microbiological confirmation when HIV-TB patients are admitted
16 to the ICU. Neurological dysfunction may be associated with poor survival,
17 even without primary CNS involvement.

18

19 **COMPETING INTERESTS**

20 The authors declare that they have no competing interests and no specific
21 funding was received.

22

23 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

24 ACP, RTA, FAB and AMJ conceived the study and proposed its design; ACP,
25 RTA, ECM and CR performed the data collection and summarized the
26 descriptive results; AMJ and RTA performed the data analysis; ACP, AMJ and
27 RTA wrote the manuscript; BG, JC, DM and FAB helped to draft the final
28 manuscript by making a critical revision. All authors read and approved the
29 final manuscript

30

31 **ACKNOWLEDGEMENTS**

32 We express our thanks to the staff members from Intensive Care Unit (ICU) of
33 the National Institute of Infectious Disease (INI) at Oswaldo Cruz Foundation

1 (FIOCRUZ) for their assistance in this study.

2

3

4

5

1 REFERENCES

- 2 1. WHO | Global tuberculosis report 2014 [Internet]. WHO. [cited 2014].
3 Available from: www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_main_text.pdf
4
- 5 2. Grinsztejn B, Veloso VG, Friedman RK, Moreira RI, Luz PM, Campos DP, et
6 al. Early mortality and cause of deaths in patients using HAART in Brazil and
7 the United States. *AIDS* 2009;23(16):2107-14.
8
- 9 3. Manual de Recomendações para controle da tuberculose no Brasil. Série A.
10 Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde , 2011.
11
- 12 4. Silva DR, Gazzana MB, Dalcin P de TR. Severe tuberculosis requiring ICU
13 admission. *J Bras Pneumol* 2012;38(3):386–94.
14
- 15 5. Pawlowski A, Jansson M, Sköld M, Rottenberg ME, Källenius G.
16 Tuberculosis and HIV Co-Infection. Hobman TC, editor. *PLoS Pathogens*.
17 2012 Feb 16;8(2):e1002464.
- 18 6. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Fordham von Reyn C. Tuberculosis. *New*
19 *England Journal of Medicine*. 2013 Feb 21;368(8):745–55.
- 20 7. Gary J, Cohn D. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Seminars in Respiratory*
21 *and Critical Care Medicine*. 2013 Mar 4;34(01):032–43.
- 22 8. Hagan G, Nathani N. Clinical review: Tuberculosis on the intensive care unit.
23 *Critical Care*. 2013;17(5):240.
- 24 9. Erbes R. Characteristics and outcome of patients with active pulmonary
25 tuberculosis requiring intensive care. *European Respiratory Journal*. 2006 Jun
26 1;27(6):1223–8.
- 27 10. Silva DR, Menegotto DM, Schulz LF, Gazzana MB, Dalcin PT. Mortality
28 among patients with tuberculosis requiring intensive care: a retrospective
29 cohort study. *BMC infectious diseases*. 2010;10(1):54.
- 30 11. Japiassú AM, Amâncio RT, Mesquita EC, Medeiros DM, Bernal HB, Nunes
31 EP, et al. Sepsis is a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS
32 patients. *Crit Care*. 2010;14(4):R152.

1 12. Amâncio FF, Lambertucci JR, Cota GF and Antunes CM. Predictors of the
2 short- and long-term survival of HIV-infected patients admitted to a Brazilian
3 intensive care unit. *International Journal of STD & AIDS* 2012; 23: 692–697.

4 13. Abdullah AA, Yaseen MA, Hamdan Al-Jahdali, Ashwaq O, Othman Al Harbi
5 and Ziad M. Clinical presentation and outcome of patients diagnosed with
6 active pulmonary tuberculosis in a large critical care unit. *Crit Care & Shock*
7 2011 (14):1-6

8 14. Sarkar P, Rasheed HF. Clinical review: Respiratory failure in HIV/AIDS
9 patients - a changing picture. *Crit Care* 2013;17(3):228.

10 15. Cardoso SW, Luz PM, Velasque L, Torres TS, Tavares IC, Ribeiro SR,
11 Moreira RI, Veloso VG, Moore RD, Grinsztejn B. Outcomes of second-line
12 combination antiretroviral therapy for HIV-infected patients: a cohort study from
13 Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2014 Dec 19;14:699. doi:
14 10.1186/s12879-014-0699-5.

15 16. Coelho L, Cardoso SW, Amancio RT, Moreira RI, Campos DP, Veloso VG,
16 Grinsztejn B, Luz PM. Trends in AIDS-defining opportunistic illnesses
17 incidence over 25 years in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2014 Jun
18 5;9(6):e98666. doi: 10.1371/journal.pone.0098666.

19 17. Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin
20 PTR, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. *J*
21 *Bras Pneumol* 2009;35(10):1018-48.

22 18. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et
23 al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe
24 organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996;22(7):707-10.

25 19. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology
26 Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study.
27 *JAMA* 1993;270(24):2957-63.

28 20. Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonça A, Cantraine F, Thijs L, Takala
29 J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H, Willatts S. The use of maximum SOFA
30 score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a

- 1 prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of
2 the ESICM. *Intensive Care Med.* 1999 Jul;25(7):686-96.
- 3 . Torok ME, Chau TTH, Mai PP, Phong ND, Dung NT, Chuong LV, et al.
4 Clinical and Microbiological features of HIV-Associated Atuberculous Meningitis
5 in Vietnamese Adults. *Plos One*2008;3(3):1772-8
- 6 22. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster, Stop TB
7 Department. Towards universal access to diagnosis and treatment of
8 multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015 WHO
9 progress report 2011. [Internet]. [Geneva, Switzerland]: World Health
10 Organization; 2011 [cited 2015 Jun 16]. Available from:
11 http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501330_eng.pdf
12
- 13 23. Ely EW, Inouye SK, Bernard GR, Gordon S, Francis J, May L, Truman B,
14 Speroff T, Gautam S, Margolin R, Hart RP, Dittus R. Delirium in mechanically
15 ventilated patients: validity and reliability of the confusion assessment method
16 for the intensive care unit (CAM-ICU). *JAMA.* 2001 Dec 5;286(21):2703-10.
- 17 24. Afessa B. Clinical Course, Prognostic Factors, and Outcome Prediction for
18 HIV Patients in the ICU *: The PIP (Pulmonary Complications, ICU Support,
19 and Prognostic Factors in Hospitalized Patients With HIV) Study. *CHEST*
20 *Journal.* 2000 Jul 1;118(1):138.
- 21 25. Dickson SJ, Batson S, Copas AJ, Edwards SG, Singer M, Miller RF.
22 Survival of HIV/AIDS patients in the intensive care unit in the era of highly
23 active antiretroviral therapy. *Thorax.* 2007 May 25;62(11):964–8.
- 24 26. Narasimhan M, Posner AJ, De Palo VA, Mayo PH, Rosen MJ. Intensive
25 Care in Patients With HIV Infection in the Era of Highly Active Antiretroviral
26 Therapy. *Chest* 2004;125(5):1800-4.
- 27 27. Barbier F, Coquet I, Legriel S, Pavie J, Darmon M, Mayaux J, et al.
28 Etiologies and outcome of acute respiratory failure in HIV/AIDS patients.
29 *Intensive Care Medicine.* 2009 Jul 3;35(10):1678–86.
- 30 28. Lockman S, Hone N, Kenyon TA, Mwasekaga M, Villauthapillai M, Creek T,
31 et al. Etiology of pulmonary infections in predominantly HIV/AIDS adults with

1 suspected tuberculosis, Botswana. *The International Journal of Tuberculosis*
2 *and Lung Disease*. 2003;7(8):714–23.

3 29. Morris A, Masur H, Huang L. Current issues in critical care of the human
4 immunodeficiency virus-infected patient: *Crit Care Med* 2006 Jan;34(1):42–9.

5 30. Segal LN, Methe BA, Nolan A, Hoshino Y, Rom WN, Dawson R, et al. HIV-
6 1 and Bacterial Pneumonia in the Era of Antiretroviral Therapy. *Proc Am Thor*
7 *Soc* 2011 Jun 7;8(3):282–7.

8 31. Wunderink RG, Niederman MS. Update in Respiratory Infections 2011.
9 *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012 Jun
10 15;185(12):1261–5.

11 32. Pacheco AG, Durovni B, Cavalcante SC, Lauria LM, Moore RD, Moulton
12 LH, et al. AIDS-Related Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*
13 2008;3(9):e3132.

14 33. Powell K. Survival for Patients With HIV Admitted to the ICU Continues to
15 Improve in the Current Era of Combination Antiretroviral Therapy. *CHEST*
16 2009;135(1):11-7.

17 34. Meybeck A, Lecomte L, Valette M, Van Grunderbeeck N, Boussekey N,
18 Chiche A, et al. Should highly active antiretroviral therapy be prescribed in
19 critically ill HIV/AIDS patients during the ICU stay? A retrospective cohort
20 study. *AIDS Research and Therapy*. 2012;9(1):27.

21 35. Morris AM, Huang L, Bacchetti P, Turner J, Hopewell PC, Wallace JM, et
22 al. Permanent declines in pulmonary function following pneumonia in human
23 immunodeficiency virus-infected persons. The Pulmonary Complications of HIV
24 Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2):612-6.

25 36. Croda J, Croda MG, Neves A, De Sousa dos Santos S. Benefit of
26 antiretroviral therapy on survival of human immunodeficiency virus-infected
27 patients admitted to an intensive care unit: *Critical Care Medicine*. 2009
28 May;37(5):1605–11.

29 37. Corona A, Raimondi F. Caring for HIV/AIDS patients in the ICU in the
30 highly active antiretroviral therapy era. *Current HIV research*. 2009;7(6):569–
31 79.

32 38. Chiang H-H, Hung C-C, Lee C-M, Chen H-Y, Chen M-Y, Sheng W-H, et al.

1 Admissions to intensive care unit of HIV/AIDS patients in the era of highly
2 active antiretroviral therapy: etiology and prognostic factors. *Critical Care*.
3 2011;15(4):R202.

4 39. Orsini J, Ahmad N, Butala A, Flores R, Tran T, Llosa A, et al. Etiology and
5 Outcome of Patients with HIV Infection and Respiratory Failure Admitted to the
6 Intensive Care Unit. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* .
7 2013;2013:732421.

8 40. Balkema CA, Irusen EM, Taljaard JJ, Koegelenberg CF. Tuberculosis in
9 the intensive care unit: a prospective observational study. *Int J Tuberc Lung*
10 *Dis*. 2014 Jul;18(7):824-30.

11 41. Nickas G, Wachter RM. Outcomes of intensive care for patients with
12 human immunodeficiency virus infection. *Archives of internal medicine*.
13 2000;160(4):541–7.

14 42. Bray S, Gedeon J, Hadi A, Kotb A, Rahman T, Sarwar E, Savelyeva A,
15 Sévigny M, Bakanda C, Birungi J, Chan K, Yaya S, Deonandan R, Mills EJ.
16 Predictive value of CD4 cell count nadir on long-term mortality in HIV-positive
17 patients in Uganda. *HIV AIDS (Auckl)*. 2012;4:135-40.

18 43. Miller V, Mocroft A, Reiss P, Katlama C, Papadopoulos AI, Katzenstein T,
19 van Lunzen J, Antunes F, Phillips AN, Lundgren JD. Relations among CD4
20 lymphocyte count nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression:
21 results from the EuroSIDA study. *Ann Intern Med*. 1999 Apr 6;130(7):570-7.

22 44. kogmar S, Schön T, Balcha TT, Jemal ZH, Tibesso G, Björk J, Björkman P.
23 CD4 cell levels during treatment for tuberculosis (TB) in Ethiopian adults and
24 clinical markers associated with CD4 lymphocytopenia. *PLoS One*. 2013 Dec
25 16;8(12):e83270.

26 45. Cardoso SW, Grinsztejn B, Velasque L, Veloso VG, Luz PM, Friedman RK,
27 Morgado M, Ribeiro SR, Moreira RI, Keruly J, Moore RD. Incidence of
28 modifying or discontinuing first HAART regimen and its determinants in a
29 cohort of HIV-infected patients from Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Res Hum*
30 *Retroviruses*. 2010 Aug;26(8):865-74.

31 46. Waddell RD, Lishimpi K, von Reyn CF, Chintu C, Baboo KS, Kreiswirth B,
32 et al. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* or *M. bovis*, Bacille
33 Calmette–Guerin (BCG) among HIV-positive children and adults in Zambia.

1 AIDS 2001;15(1):55–60.

2 47. Amancio RT, Japiassu AM, Gomes RN, Mesquita EC, Assis EF, Medeiros
3 DM, et al. The innate immune response in HIV/AIDS septic shock patients: a
4 comparative study. PLoS One 2013;8(7):e68730.

5 48. Crump JA, Ramadhani HO, Morrissey AB, Saganda W, Mwako MS, Yang
6 LY, et al. Bacteremic disseminated tuberculosis in sub-saharan Africa: a
7 prospective cohort study. Clin Infect Dis 2012;55(2):242-50.

8 49. Burman W, Weis S, Vernon A, Khan A, Benator D, Jones B, Silva C, King
9 B, LaHart C, Mangura B et al: Frequency, severity and duration of immune
10 reconstitution events in HIV-related tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2007,
11 11:1282-1289

12 50. Holland DP, Hamilton CD, Weintrob AC, Engemann JJ, Fortenberry ER,
13 Peloquin CA, et al. Therapeutic drug monitoring of antimycobacterial drugs in
14 patients with both tuberculosis and advanced human immunodeficiency virus
15 infection. Pharmacotherapy 2009;29(5):503-10.

16 51. Zahar J-R, Azoulay E, Klement E, De Lassence A, Lucet J-C, Regnier B, et
17 al. Delayed treatment contributes to mortality in ICU patients with severe active
18 pulmonary tuberculosis and acute respiratory failure. Intensive Care Med
19 2001;27(3):513–20.

20 52. Wilkinson KA, Meintjes G, Seldon R, Goliath R and Wilkinson RJ.
21 Immunological characterisation of an unmasking TB-IRIS case. S Afric Med J
22 2012;102(6):512-7.

23 53. Kim YJ, Pack KM, Jeong E, Na JO, Oh Y-M, Lee SD, et al. Pulmonary
24 tuberculosis with acute respiratory failure. Eur Resp J 2008;32(6):1625–30.

25 54. Huang L, Quartin A, Jones D, Havlir DV. Intensive care of patients with HIV
26 infection. N Engl J Med 2006;355(2):173–81.

27 55. Nicolls DJ, King M, Holland D, Bala J, del Rio C. Intracranial tuberculomas
28 developing while on therapy for pulmonary tuberculosis. Lancet Infect Dis
29 2005;5(12):795–801.

30 56. Thwaites GE, van Toorn R, Schoeman J. Tuberculous meningitis: more
31 questions, still too few answers. The Lancet Neurology 2013;12(10):999–1010.

1 57. Sonnevile R, Ferrand H, Tubach F, Roy C, Bouadma L, Klein IF, et al.
2 Neurological complications of HIV infection in critically ill patients: Clinical
3 features and outcomes. *J Infection* 2011;62(4):301–8.

4

1 **TABLES**

2 Table 1 – Characteristics critically ill patients with HIV-related disease and
 3 tuberculosis (laboratory-confirmed) diagnosis, including the prevalence of organ
 4 dysfunctions on ICU admission (N=44). Comparison between survivors and
 5 nonsurvivors for 6-month mortality. Results were expressed as the median and
 6 the interquartile interval

	HIV/AIDS and Tuberculosis			
	(N=44)	Survivors (N=21)	Non-survivors (N=23)	<i>p</i> value
Age (years)	34 (19.25 – 44.5)	32 (27 – 42.5)	36 (30 – 46)	0.15
Gender (male)	31 (70%)	14 (67%)	17 (74%)	0.74
Nadir CD4 ^a	54 (17 – 96)	73 (30 – 177)	23 (14 – 84)	0.04
Viral load (x 10 ³ copies/mm ³) ^b	113,637 (2,993 – 365,663)	35,149 (212.3 – 300,184)	169,133 (35,405 – 419,382)	0.13
Length of time since HIV diagnosis (months)	5 (1 - 60)	1 (1 - 16)	28 (1 - 72)	0.03
CART use while in the ICU	17 (38.6%)	10 (48%)	7 (30%)	0.35
Mechanical ventilation use on ICU day 1	21 (48%)	8 (42%)	13 (52%)	0.56
Vasoactive drug use on ICU day 1	12 (26%)	5 (24%)	7 (27%)	0.99
SAPS II score (points)	47 (37 - 55)	48 (37 - 57)	46 (38 - 54)	0.27
SOFA score on day 1 (points)	4 (1 - 8)	1 (0 - 7)	5 (2- 8)	0.08
Organ Dysfunctions				
Cardiovascular	18 (41%)	7 (33.3%)	11 (48%)	0.37
Respiratory	15 (34%)	5 (24%)	10 (43%)	0.21
Renal	14 (32%)	5 (24%)	9 (39%)	0.34
Neurological	13 (29%)	3 (14%)	10 (43%)	0.04
Hepatic	9 (20%)	5 (24%)	4 (17%)	0.71
Hematological	9 (20%)	3 (14%)	6 (26%)	0.46

7 ^a data available for 39 patients

8 ^b data available for 35 patients

9

1 Table 2 – Characteristics of tuberculosis among critically ill patients with HIV-
 2 related disease

TB Disease presentation	
Pulmonary TB	22 (50%)
Disseminated ^a	20 (45.5%)
Extra-pulmonary TB ^b	2 (4.5%)
Method of TB diagnosis^c	
Sputum and induced sputum smear-positive	27
Smear-positive bronchoalveolar lavage (BAL)	5
Respiratory culture positive for smear negative sputum	5
Blood culture positive	6
Biopsy with acid-fast bacillus and/or histopathological findings consistent with TB	11
Tuberculosis treatment	
	N (%)
Rifampicin	41 (93%)
Isoniazide	40(90%)
Pyrazinamide	42 (92%)
Ethambutol	34 (72%)
Fluoroquinolones	27 (61%)
Aminoglycosides	22 (50%)

3 a - Disseminated tuberculosis refers to hematogenously spread of the bacillus
 4 (*Mycobacterium tuberculosis* recovered from blood specimen and multi-organ
 5 involvement).

6 b - Organ involvement other than the respiratory tract and lung.

7 c - A few patients had *Mycobacterium tuberculosis* recovered from more than one site.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

1 Table 3 – Multivariate analysis for 6-month mortality of critically ill with HIV-
2 related disease with tuberculosis.

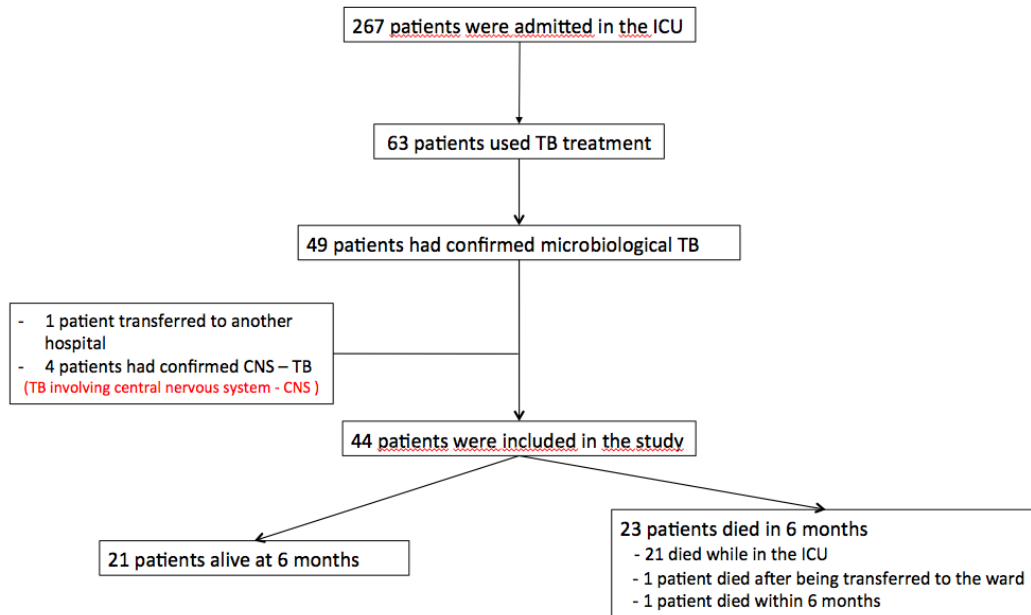
Variable	Odds ratio for 6- month mortality	p value
Age (years)	1.06 [0.97-1.16]	0.18
Respiratory dysfunction	2.70 [0.55-13.38]	0.22
Neurological dysfunction	3.32 [0.59-18.47]	0.17
Length of time since HIV diagnosis	1.01 [0.99-1.02]	0.31
Nadir CD4 cell count less than 50 cells/mm ³	7.56 [1.53-37.35]	0.01

3

4

1 Figure 1 – Flow diagram for study inclusion.

2

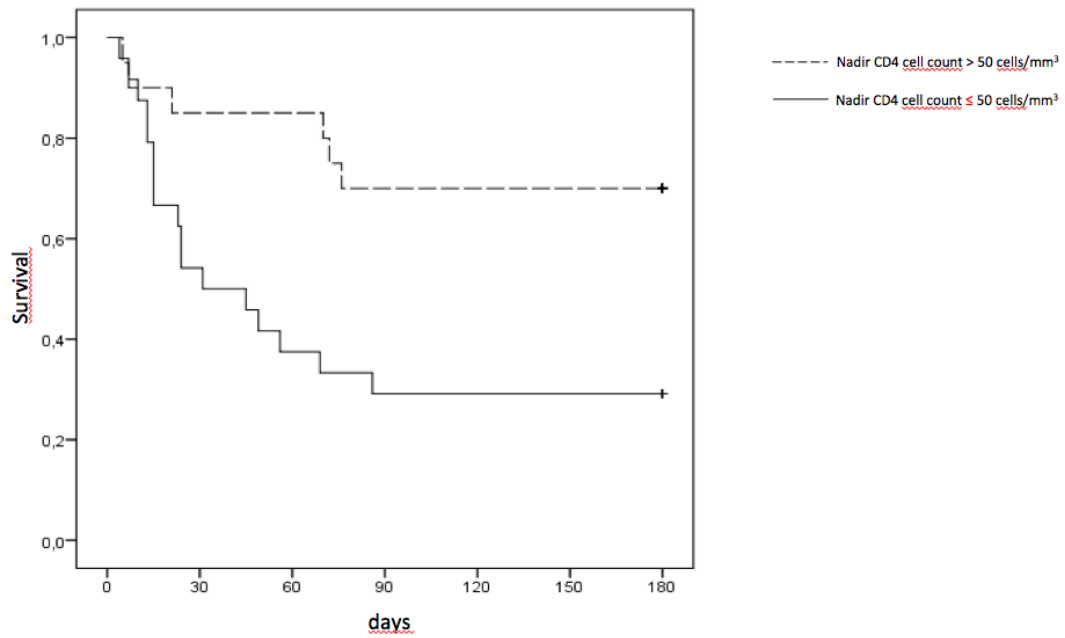


3

4

1 Figure 2 - Kaplan-Meier plot of 6-month survival in critically ill patients with
2 HIV-related disease and tuberculosis, based on having nadir CD4 cell count
3 less than 50 cells/mm³. Log-rank test p=0.006

4



5