

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS**

**MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS**

**INFECCIOSAS**

**EMERSOM CICILINI MESQUITA**

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA NA  
INFEÇÃO PELO HIV-1**

Rio de Janeiro

2013

# **AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA NA INFECÇÃO PELO HIV-1**

**EMERSON CICILINI MESQUITA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fernando Augusto Bozza e Dr. André Miguel Japiassú

Rio de Janeiro

2013

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

M582 Mesquita, Emersom Cicilini

Avaliação da função plaquetária na infecção pelo HIV-1 / Emersom Cicilini Mesquita. – Rio de Janeiro, 2013.  
xx,77 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 61-72

1. Plaqueta. 2. HIV-1. 3. Apoptose. 4. Disfunção mitocondrial. 5. Ativação plaquetária I. Título.

CDD 616.9792

EMERSOM CICILINI MESQUITA

# **AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA NA INFECÇÃO PELO HIV-1**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Prof. Dr. André Miguel Japiassú

Aprovado em:     /     /

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Estevão Portela Nunes

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz – IPEC/FIOCRUZ

---

Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ

---

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Ao meu eterno amigo e Pai, Luiz Fernando Mesquita,  
À minha amada Mãezinha Benedita Cleusa Cicilini e  
Aos meus fiéis irmãos Bernardo Adonai Cicilini Mesquita  
e Fabrício Cicilini Mesquita.

À minha alma gêmea,  
Marina Alvine de Jesus Mesquita.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus queridos orientadores, Dr. Fernando Augusto Bozza e Dr. André Miguel Japiassú, por me darem a chance de trabalhar neste projeto. Tive o primeiro contato com estes grandes colegas durante a residência médica. Com o tempo pude notar que, além da medicina, Dr. André e Dr. Fernando estão profundamente comprometidos com a pesquisa e o ensino. É um privilégio fazer parte deste grupo fantástico.

Agradeço ao meu inestimável amigo Dr. Rodrigo Teixeira Amâncio, parte do grupo do Dr. Fernando Augusto Bozza desde o ensino médio, por me incentivar permanentemente no caminho da pesquisa. Ele foi, sem dúvida, minha estrela guia.

Agradeço ao grande amigo Dr. Eugênio Damasceno Hottz, do laboratório de Imunofarmacologia do IOC/FIOCRUZ, que simplesmente me ensinou tudo que sei de experimentação com plaqueta, e continua a me ensinar. É, sem dúvida, meu preceptor no laboratório, embora ele não goste que eu o chame de professor!

Agradeço à Dra. Beatriz Gilda Jegerhorn Grinsztejn, chefe do laboratório de DST/AIDS do IPEC/FIOCRUZ e coordenadora deste projeto, por ser uma incentivadora permanente da pesquisa no Brasil.

Agradeço ao Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, chefe do laboratório de imunofarmacologia do IOC/FIOCRUZ, grande exemplo de cientista, cujas sugestões foram fundamentais neste projeto.

Agradeço à Dra. Patrícia Torres Bozza, que gentilmente me acolheu em seu laboratório, pela coordenação deste projeto e por compartilhar seus conhecimentos e experiência únicos sobre ciência.

Agradeço ao Dr. Rogério Valls de Souza, por tudo que fez pela minha formação, desde a graduação, e por ser um precioso amigo e exemplo de ser humano!

Agradeço à farmacêutica e querida amiga Grazielle Viana Ramos, parte do grupo do Dr. Fernando, por toda ajuda.

Agradeço à Dra. Denise Medeiros, intensivista do IPEC/FIOCRUZ, por compartilhar de forma tão natural e próxima seus conhecimentos de medicina e ciência.

Agradeço à Dra. Andriana da Silva Pinto e a Dra. Andrea Gina Varon, queridas amigas que sempre me ajudaram nas intermináveis trocas de plantão.

Agradeço a todos os voluntários, sem os quais a pesquisa não seria possível!

Agradeço ao Dr. Estevão Portela Nunes, estimado preceptor do programa de residência médica com quem tanto aprendi, parceiro permanente e exemplo de profissional.

Agradeço aos queridos colegas: Mari Tuyama, Danusa Ferreira Correa, Marcellus Dias da Costa, Marcelo Gomes dos Santos, Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves, Cristiane da Cruz Lamas e Luciana Gomes Francisco Pedro, médicos dedicados com os quais aprendi muito durante os últimos anos.

Agradeço à Dra. Maria Isabel Fragoso da Silveira Gouvea, Dra. Maria de Lourdes Benamor e Dra. Jois Ortega, da chefia do centro hospitalar do IPEC, por todo carinho e confiança que sempre me endereçaram.

Agradeço à toda equipe de enfermagem do IPEC/FIOCRUZ. São os melhores profissionais que já conheci!

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Imunofarmacologia do IOC, que me acolheram com tanto carinho. São, para mim, doce esperança de um futuro melhor no Brasil. Agradeço especialmente à Rose, por todo o suporte.

Agradeço a querida Dra. Ana Paula Guimarães-Walker por ter me incentivado no caminho da pesquisa e por ser um exemplo de ser humano.

Agradeço ao querido Dr. Ingo Riederer, professor de imunologia e orientador de iniciação científica durante a graduação, por ter influenciado minha formação positivamente até hoje.

Agradeço ao estimado Dr. Juvêncio Dualib Furtado, exímio infectologista e presidente da Sociedade Brasileira de Infectologia, por todo carinho com que me recebeu no primeiro ano de residência médica e por ter se mostrado verdadeiro amigo.

Ao meu grande amigo Daniel, sua esposa Leila e sua filha Luisa. Amigo que me acompanha desde criança e com o qual compartilho sonhos e aspirações.

Ao meu Pai, Dr. Luiz Fernando Mesquita, exemplo de médico e pesquisador, que sempre me ensinou a trabalhar pensando nos que sofrem.

À minha Mãe, Benedita Cleusa Cicilini, por todo seu amor e por sempre ter acreditado em mim! Exemplo de vontade e perseverança que eu guardo para sempre.

Aos meus queridos irmãos, Dr. Bernardo Adonai Cicilini Mesquita e Dr. Fabrício Cicilini Mesquita, por estarem sempre presentes e por compartilharem suas vidas.

E especialmente, agradeço à minha princesa do coração, razão do meu viver e amiga pra todo sempre, Marina.

Agradeço ainda a todos os que me ajudam desde o princípio.



“O universo é um Dragão Verde”.  
Brian Swimme.

Mesquita, EC. **Avaliação da função plaquetária na infecção pelo HIV-1**. Rio de Janeiro; 2013. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

A terapia antirretroviral de alta potência (TARV) aumentou significativamente a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes portadores de HIV/AIDS, levando, por conseguinte, à cronificação da doença. Neste novo cenário epidemiológico, cresce a importância de complicações cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio e a trombose venosa profunda.

A plaqueta tem papel central na gênese destas complicações e seu papel na infecção pelo HIV-1 começa a ser explorado na literatura. No presente trabalho objetivamos avaliar a função plaquetária durante a infecção pelo HIV-1, especificamente o grau de ativação, disfunção mitocondrial, morte celular, produção de óxido nítrico e resposta a estímulos agonistas. Para tal, avaliamos 30 voluntários saudáveis e 26 pacientes infectados pelo HIV-1 em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Janeiro de 2012 a Janeiro de 2013. Dentre os pacientes infectados avaliados, 17 apresentavam uso regular de TARV e tinham a carga viral para HIV-1 no sangue periférico indetectável ( $< 50$  cópias/mm<sup>3</sup>) e 9 apresentavam carga viral para HIV-1 no sangue periférico detectável ( $> 50$  cópias/mm<sup>3</sup>). Observamos que a plaqueta dos dois grupos de pacientes portadores de HIV/AIDS analisados exibe um aumento no perfil de ativação (expressão de P-selectina e exposição de fosfatidilserina), aumento na produção de óxido nítrico e menor indução da expressão de P-selectina após estímulo com trombina, quando comparada à resposta da plaqueta de indivíduos controles. Além disso, observamos sinais claros de ativação da via intrínseca de apoptose (diminuição do potencial de membrana mitocondrial, aumento na produção de superóxido mitocondrial, exposição de fosfatidilserina e ativação de caspase 9) mesmo com o controle da replicação viral, atingido com o uso regular de TARV.

Acreditamos, portanto, que nossos achados possam ajudar a entender melhor a patogênese da infecção pelo HIV-1, assim como a gênese das complicações cardiovasculares, onde a plaqueta tem papel central.

Mesquita, EC. **Platelet activation and cell death pathways in platelets isolated from HIV/AIDS patients**. Rio de Janeiro; 2013. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

The advent of highly active antiretroviral therapy (HAART) has increased life expectancy and the quality of life of patients living with HIV/AIDS. Now, new clinical data emphasizes long term complications of HIV-1 infection, such as cardiovascular diseases.

Blood human platelets have a pivotal role in thrombus formation and their physiology during the course of HIV-1 infection has recently begun to be explored. The aim of the present study is to build up this literature by characterizing platelet activation, mitochondrial dysfunction, apoptosis and response to agonist stimulus in HIV/AIDS patients and control subjects. From January of 2012 to January of 2013 we included 30 healthy volunteers and 33 HIV-1 infected subjects from the outpatient clinic of Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). Among the HIV-1 population, 18 patients were under HAART therapy and had achieved virological suppression (viral load in peripheral blood  $< 50$  copies/mm<sup>3</sup>) and 9 patients had uncontrolled viral replication (viral load in peripheral blood  $> 50$  copies /mm<sup>3</sup>). We noted that HIV-1 infected individuals exhibit increased platelet activation (P-selectin expression and fosfatidilserine exposition), enhanced nitric oxide (NO) production and abnormal response to agonistic stimulus (thrombin). Moreover, we noted marked signs of intrinsic apoptotic pathway activation (decreased transmembrane mitochondrial potential, increased superoxide production, fosfatidilserine exposure and caspase 9 activation) in patients under virological suppression achieved through HAART.

These findings might contribute to the understanding of AIDS immunopathogenesis as well as the mechanisms behind the increased cardiovascular risk reported in this population.

## LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1	Estrutura do HIV-1.....4
Figura 2	Genoma do HIV-1 e seus principais subprodutos.....5
Figura 3	Ciclo de replicação do HIV-1.....7
Figura 4	História natural da infecção pelo HIV-1.....8
Figura 5	Eventos apoptóticos na plaqueta humana.....16
Figura 6	Análise do nível de pureza das plaquetas isoladas.....27
Figura 7	Expressão plaquetária de P-selectina.....31
Figura 8	Aumento na exposição de fosfatidilserina plaquetária.....32
Figura 9	Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....34
Figura 10	Análise da produção de superóxido mitocondrial.....35
Figura 11	Aumento da ativação plaquetária de Caspase 9.....36
Figura 12	Aumento da produção intraplaquetária de óxido nítrico (NO).....38
Figura 13	Resposta plaquetária ao estímulo com Trombina.....39
Figura 14	Expressão plaquetária de P-selectina, todos os grupos.....41
Figura 15	Aumento na exposição de fosfatidilserina plaquetária, todos os grupos.....42
Figura 16	Aumento da produção intraplaquetária de óxido nítrico (NO), todos os grupos.....43
Figura 17	Resposta plaquetária ao estímulo com trombina, todos os grupos.....45

QUADROS

PÁGINA

---

Quadro 1	Fatores com atividade imunológica, inflamatória e antimicrobiana produzidos após a ativação plaquetária.....	18
----------	--	----

TABELAS

PÁGINA

---

Tabela 1	Características clínicas e laboratoriais de pacientes e controles.....	29
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3TC	Lamivudina
ACD	Ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
ANT	Trocador de nucleotídeos adenínicos
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATV/r	Atazanavir/ritonavir
AZT	Zidovudina
BSA	Bovine serum albumine
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CCL3	MIP-1-alfa
CCL4	MIP-1-beta
CCL5	RANTES
CCR	Receptor de quimiocinas da família CC
CD	Grupo de diferenciação (cluster of differentiation)
CD62P	P-selectina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLEC	C type lectin domain
CsA	Ciclosporina-A
CV	Carga viral para HIV-1
CV < 50	Carga viral para HIV-1 menor que 50 cópias/mm <sup>3</sup>
CV > 50	Carga viral para HIV-1 maior que 50 cópias/mm <sup>3</sup>

CXCL	Ligante de CXCR
CXCL4	PF-4
CXCL12	SDF-1
CXCR	Receptor de quimiocinas da família CXC
Cyp-D	Ciclofilina D
d4T	Estavudina
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin
ddI	Didanosina
DENV	Vírus da dengue
EFZ	Efavirenz
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GALT	Gut-associated lymphoid tissue (tecido linfóide associado ao intestino)
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico (cyclic guanosine monophosphate)
HCV	Vírus da Hepatite C (hepatitis C virus)
Hep G2	Hepatocellular liver carcinoma cell line G2
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) 1-piperazinaetanosulfônico
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1.
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
ICAM	Molécula de adesão intercelular (Intercellular Adhesion Molecule)
IL	Interleucina
IMF	Intensidade média de fluorescência



INF	Interferon
IP	Inibidores de protease
IP/r	Inibidores da protease com buster de ritonavir
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITRN	Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos
ITRNN	Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos
JAK	cinase da família Janus (Janus kinase)
KCl	Cloreto de potássio
LPS	Lipopolissacarideo
LPV/r	Lopinavir/ritonavir
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Proteína quimiotática para monócito (monocyte chemoattractant protein)
MgCl	Cloreto de magnésio
MIP-1- $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófago 1- $\alpha$
MIP-1- $\beta$	Proteína inflamatória de macrófago 1- $\beta$
MPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mitochondrial permeability transition pore)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Monohidrogenofosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NF	Fator nuclear (nuclear factor)
NGF	(nerve growth factor) - fator de crescimento neural
NK	Células Natural Killers
NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintase

OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas (platelet activating factor)
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Células mononucleares circulantes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Solução salina fosfatada tamponada (Phosphate buffer solution)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polimerase chain reaction)
PCRt	Proteína C reativa titulada
PDGF	Platelet-derived growth factor
PD-L	Programmed death ligand
PF-4	Fator plaquetário 4
PKG	Proteína kinase dependente de cGMP
PSG	PIPES, salina e glicose
PTI	Púrpura trombocitopênica idiopática
PTT	Tempo parcial da tromboplastina
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ácido ribonucléico
RNI	Relação normalizada internacional
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDF-1	Fator derivado de célula estromal tipo 1
SFLLRN	Fragmento n-terminal do receptor de trombina (N-terminal thrombin receptor fragment)
SMART	Strategies for Management of Antiretroviral Therapy
SOX	Superóxido
STAT	Proteínas sinalizadoras e ativadoras de transcrição (signal transducers and activators of transcription)
TAP	Tempo de ação da protrombina

TARV	Terapia antirretroviral de alta potência
TDF	Tenofovir
TF	Fator tecidual (tissue factor)
TGF	Transforming growth factor
TLR	(Toll-like receptor) - Receptor tipo Toll
TMRE	Tetrametilrodamina etil éster
TNF	Fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)
TXA2	Tromboxano A2
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VT	Virgem de TARV
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$\Delta t$	Intervalo de tempo

# SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVEIATURAS.....	xii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.....	2
1.2 DIAGNÓSTICO.....	3
1.3 AGENTE ETIOLÓGICO.....	5
1.4 PATOGÊNESE.....	8
1.4.1 ATIVAÇÃO CRÔNICA DO SISTEMA IMUNE E INFLAMAÇÃO.....	11
1.4.2 CRONIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 E MUDANÇA NO PERFIL DE COMPLICAÇÕES RELACIONADAS À AIDS.....	12
1.4.3 HIV-1, INFLAMAÇÃO E DOENÇA CARDIOVASCULAR.....	13
1.5. FISIOLOGIA PLAQUETÁRIA.....	16
1.5.1 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	16
1.5.2 APOPTOSE PLAQUETÁRIA.....	18
1.5.3 TRADUÇÃO ESTÍMULO DEPENDENTE E SÍNTESE PROTÉICA <i>DENOVO</i> .....	19
1.5.4 NOVAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS.....	21

1.6	PLAQUETA E HIV .....	22
2.	OBJETIVOS.....	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.	RESULTADOS.....	33
4.1	AUMENTO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO.....	35
4.1.1	PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO POSSUEM AUMENTO NA EXPRESSÃO DE P-SELECTINA.....	35
4.1.2	PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO POSSUEM AUMENTO NA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA.....	36
4.2	PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO APRESENTAM SINAIS DE DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	38

4.2.1	PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO APRESENTAM DIMINUIÇÃO ACENTUADA DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	38
4.2.2	PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO APRESENTAM AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	39
4.3	PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO APRESENTAM AUMENTO NA ATIVAÇÃO DE CASPASE 9.....	41
4.4	PLAQUETAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SOB CONTROLE VIROLÓGICO PRODUZEM MAIS ÓXIDO NÍTRICO QUE PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS.....	41
4.5	PERFIL DE RESPOSTA PLAQUETÁRIA AO ESTÍMULO COM TROMBINA DURANTE A INFECÇÃO PELO HIV-1 EM PACIENTES COM CONTROLE VIROLÓGICO.....	43
4.6	AUMENTO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SEM CONTROLE VIROLÓGICO.....	45

4.7	PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HIV/AIDS SEM CONTROLE VIROLÓGICO APRESENTAM AUMENTO NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	47
4.8	PERFIL DE RESPOSTA PLAQUETÁRIA AO ESTÍMULO COM TROMBINA DURANTE A INFECÇÃO PELO HIV-1 EM PACIENTES SEM CONTROLE VIROLÓGICO.....	49
5.	DISCUSSÃO.....	51
6.	PERSPECTIVAS.....	59
7.	CONCLUSÃO.....	60
8.	REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS		
	ANEXO 1. APROVAÇÃO PELO CEP DO IPEC/FIOPCRUZ.....	73
	ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	74
	ANEXO 3. FICHA DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	77

# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que existam 34,2 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS e em 2011 aproximadamente 1,7 milhões de mortes foram atribuídas em todo o mundo a esta patologia (UNAIDS, 2012), que representa a sexta causa de morte no mundo (WHO, 2011). No Brasil, desde o início da epidemia até junho de 2011, foram registrados pelo Ministério da Saúde (MS) 608.230 casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e 241.469 mortes relacionadas à AIDS.

O advento da terapia antirretroviral de alta potência (TARV) no tratamento dos pacientes infectados pelo HIV-1 foi determinante na melhora do prognóstico e diminuição da letalidade, levando, por conseguinte, a um aumento na sobrevida e cronificação da doença (Dore *et al*, 2002). Lewden *et al* (2007) demonstraram que a mortalidade de pacientes com contagem de células TCD4+ maior que 500 células/mm<sup>3</sup>, em uso de TARV há pelo menos 6 anos, passa a ser semelhante à da população geral.

Novos dados clínicos apontam para a importância de complicações não relacionadas diretamente a imunodeficiência (doenças oportunistas). Pacheco *et al* (2009) seguiram 1.538 indivíduos infectados pelo HIV-1 de 1997 a 2006 e observaram que a partir do período mais recente (2005-2006) as causas de morte não relacionadas à AIDS passaram a superar as causas de morte relacionadas a AIDS.

Neste novo cenário clínico, a disfunção endotelial e o aumento na incidência de eventos cardiovasculares, onde a plaqueta tem papel central, surgem de forma destacada. O risco relativo para desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio (IAM) em homens e mulheres aumenta significativamente nos pacientes infectados, quando comparado a controles equiparados para os fatores convencionais de risco (Currier *et al*, 2003). Na coorte DAD (Friis-Moller *et al*, 2003), sugeriu-se um aumento na incidência de IAM em pacientes utilizando antirretrovirais, efeito potencializado pelo uso crônico das medicações. O risco relativo foi 1,26 (95% CI 1,12 a 1,41) para indivíduos em tratamento.

Além do risco cardiovascular, a interação plaqueta-HIV também traz novas informações sobre a patogênese da AIDS. Chaipan *et al* (2006) demonstraram que a plaqueta é capaz de endocitar o HIV-1 através das moléculas DC-SIGN (Dendritic cell-specific receptor) e CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2) da superfície plaquetária. E



Boukour *et al* (2006) demonstraram que após a endocitose a plaqueta é capaz de inativar o HIV-1, processo potencializado pelo estado de ativação plaquetária (Youssefian *et al*, 2002).

Desta forma, o entendimento da função plaquetária na infecção pelo HIV-1 pode ajudar a elucidar os mecanismos das complicações vasculares, além de estender o conhecimento sobre a patogênese da AIDS.

## 1.1 Histórico e epidemiologia

Em 5 de Junho de 1981, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) relatou uma série de 5 casos de pneumonia grave por *Pneumocystis carinii* – hoje conhecido como *Pneumocysti jiroveci* – em homossexuais americanos, todos com desfecho fatal e confirmados por biópsia pulmonar (MMWR, 1981). Este tipo de patologia era extremamente infrequente nos EUA, ocorrendo apenas no cenário de imunodepressão severa. Na época, relacionou-se o estilo de vida homossexual, presente em todos os casos descritos, com a patogênese da doença, originando então a construção do termo *gay related immunodeficiency* (GRID). Anos depois, em 1983, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) era descoberto como agente etiológico da AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome*), rendendo aos pesquisadores envolvidos no isolamento viral o prêmio Nobel de Medicina (Barré-Sinoussi *et al*, 1983; Abbott e Brumfiel, 2008). Com o isolamento viral, os primeiros testes diagnósticos foram desenvolvidos e, em 1985, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou e disponibilizou o primeiro kit comercial. Até 1985, os relatos de caso se basearam em achados clínicos, definidos pelo CDC (CDC, 1982).

A AIDS se alastrou rapidamente. Em 1984 havia cerca de 8.000 casos descritos da doença, em 1987 eram 125.000 casos, e em apenas 3 anos, em 1990, a AIDS atingia a marca de 8 milhões de indivíduos. Atualmente, estima-se que existam 34,2 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS, e apenas no ano de 2011 foram atribuídas 1,7 milhões de mortes em todo o mundo a esta patologia (UNAIDS, 2012). A AIDS representa atualmente a sexta causa de morte no mundo (WHO, 2011).

No Brasil, desde o início da epidemia até junho de 2010, foram registrados 592.914 casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) pelo Ministério da Saúde (MS), sendo 385.818 casos em homens e 207.080 casos em mulheres. Segundo estimativas do MS, 630 mil pessoas estão infectadas pelo HIV-1, e destas, pelo menos 255 mil desconhecem seu status sorológico. A faixa etária dos pacientes com AIDS vem mudando ao longo da última década, com maior frequência de indivíduos infectados após a idade jovem. Em 2009 a taxa de incidência alcançou 20,1 casos por 100 mil habitantes, principalmente na faixa etária de 30 a 40 anos, para ambos os sexos (Ministério da Saúde, 2010).

## **1.2 Diagnóstico**

No Brasil, o diagnóstico segue o preconizado pela portaria número 51 de 14 de Outubro de 2009. A primeira etapa consiste na realização de um dos seguintes ensaios:

- a) Ensaio imunoenzimático - ELISA;
- b) Ensaio imunoenzimático de micropartículas - MEIA;
- c) Ensaio imunológico com revelação quimioluminescente e suas derivações - EQL;
- d) Ensaio imunológico fluorescente ligado a enzima - ELFA ;
- e) Ensaio imunológico quimioluminescente magnético CMIA;
- f) Testes rápidos: imunocromatografia, aglutinação de partículas em látex ou imunoconcentração;
- g) Novas metodologias registradas na ANVISA e validadas pelo Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Se o resultado de uma das metodologias for negativo e não houver suspeitas clínicas mantidas, o paciente é considerado não infectado. Se houver resultado positivo na primeira etapa, uma segunda etapa é necessária. Nesta etapa as seguintes metodologias podem ser utilizadas:

- a. Imunofluorescência indireta - IFI;
- b. Imunoblot - IB;
- c. Imunoblot rápido - IBR;
- d. Western Blot - WB;
- e. Outras metodologias registradas na ANVISA e validadas pelo Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Se a etapa II também for reagente para o HIV uma nova amostra deve ser solicitada e submetida à etapa I, para confirmação diagnóstica.

Se houver discordância entre a etapa I e etapa II, sendo a primeira positiva e a segunda negativa ou indeterminada, o resultado liberado deverá ser “Amostra indeterminada para HIV”. Neste caso, nova amostra deverá ser solicitada e submetida às duas etapas. Se o resultado permanecer como indeterminado, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), poderão ser utilizados para elucidação.

### 1.3 Agente etiológico

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da AIDS, é um retrovírus da família *Retroviridae*, subfamília *Lentiviridae* (Chiu *et al*, 1985), a qual também é representada por outros retrovírus como o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da imunodeficiência símia (SIV), o vírus da imunodeficiência equina (EIV) e o vírus Visna (VSV), que infecta ovelhas. Estes organismos partilham características em comum como período de latência longo e material genético composto por RNA (Ácido desoxirribonucleico).

Existem dois tipos virais denominados de HIV-1 e HIV-2 (Clavel *et al*, 1987). O HIV-1 é responsável pela maior parte das infecções em todo o mundo, especialmente nos Estados Unidos da América (EUA), Brasil, Europa e África Central, enquanto que o HIV-2 é mais encontrado na África ocidental e Índia (Schim van der Loeff *et al*, 2006; Schmidt *et al*, 2008). No presente trabalho abordaremos a infecção pelo HIV-1.

O HIV-1 tem um formato esférico e aproximadamente 100nm de diâmetro. Seu núcleo é eletrondenso e de formato cônico, constituído por 2 fitas de RNA e proteínas estruturais (protease, transcriptase reversa e integrase) estabilizadas por um capsídeo protéico, circundado por um envelope externo de glicoproteínas e uma membrana lipídica (Figura 1) (Wong-Staal *et al*, 1985).

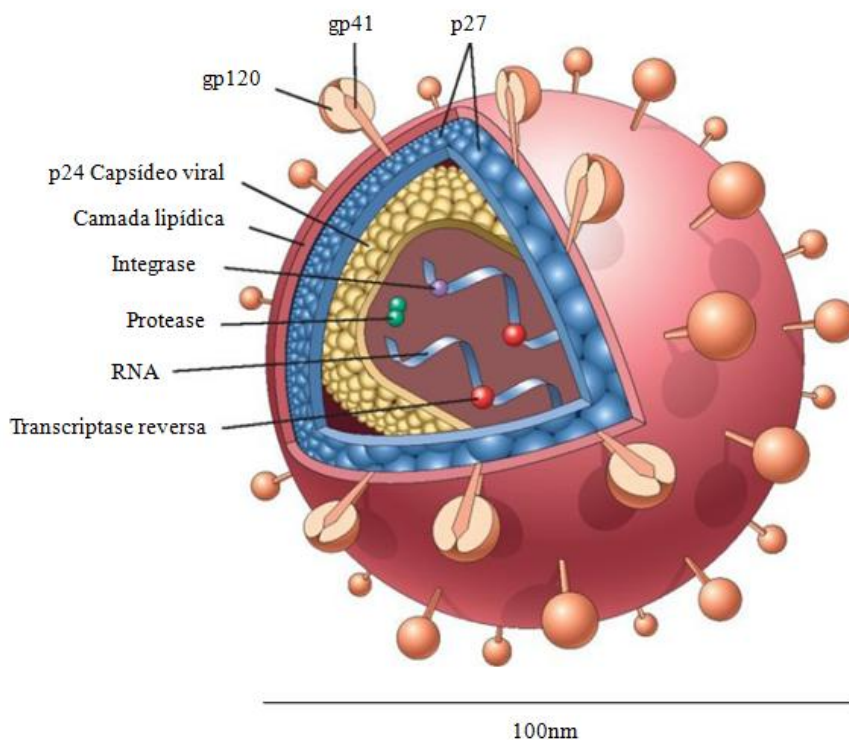


Figura 1: Estrutura do HIV-1. Adaptado de Robbins e Cotran: Pathologic basis of diseases, 8ª Edição.

No capsídeo viral encontramos a proteína p24, importante marcador dos métodos convencionais de ELISA utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HIV-1. A matriz viral é formada pela proteína p17 e envolve o capsídeo viral, existindo imediatamente abaixo do envelope viral. No envelope viral localizam-se as glicoproteínas gp120 e gp41, fundamentais para garantir o ciclo de replicação viral e, exatamente por este motivo, têm se tornado alvo de estratégias farmacológicas para o combate da doença (Cohen AJ e Fauci AS, 2001).

O genoma viral é constituído por 3 genes centrais (gag, pol e env), além de diversos genes regulatórios (tat, nef, ver, vif, vpu, vpr). A Figura 2 ilustra a estrutura genômica do HIV-1 e seus principais subprodutos. As regiões LTR (long terminal repeat), existentes no início e no final da seqüência gênica do HIV-1, têm a função de regular a transcrição viral e estabilizar a estrutura genômica (Cohen AJ e Fauci AS, 2001).

O gene *gag* é responsável pela produção de uma poliproteína (p55) que é clivada pela protease viral em proteínas da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do núcleocapsídeo (p7). O gene *pol* é responsável pela produção das enzimas integrase, transcriptase reversa e da protease. O gene *env* é responsável pela produção de proteínas do envelope viral como a gp160, que é clivada nas proteínas gp120 e gp41. Dentre os genes regulatórios, destaca-se a atividade do gene *tat* (transactivator of transcription), capaz de estimular a transcrição do HIV-1 exponencialmente através da ativação do gene *pol* e da transcriptase reversa.

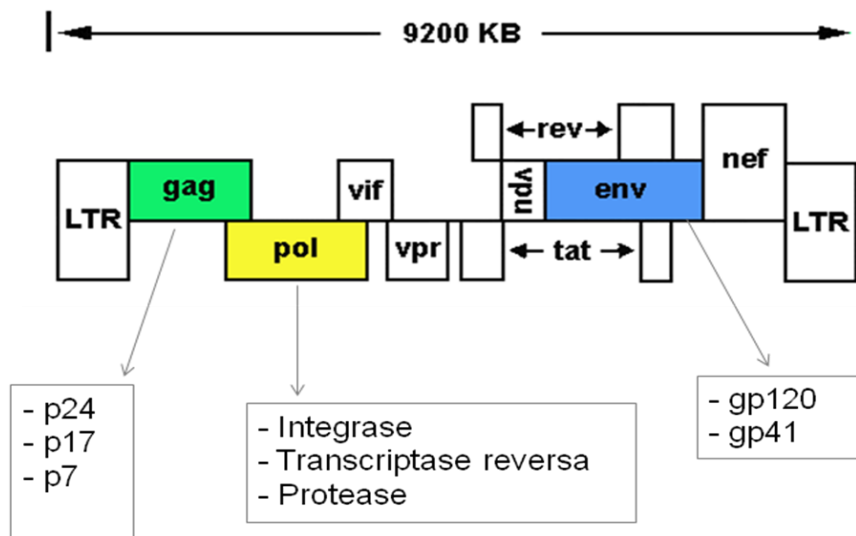


Figura 2: Genoma do HIV-1 e seus principais subprodutos.

## 1.4 Patogênese

O HIV-1 tem tropismo pelas células CD4 positivas (CD4+), especialmente linfócitos T, macrófagos e células dendríticas (Collman *et al*, 1990). A molécula do envelope viral, gp120, liga-se com grande afinidade à molécula CD4+ da célula hospedeira. Esta ligação promove uma mudança conformacional na estrutura da molécula gp120 e permite então que a molécula gp41, também presente no envelope viral, ligue-se à molécula CCR5 ou CXCR4, moléculas receptoras para as quimiocinas RANTES (CCL5), Mip-1 $\alpha$  (CCL3), Mip-1 $\beta$  (CCL4) e SDF-1 (CXCL12), respectivamente, expressos na célula hospedeira (Cohen AJ e Fauci AS, 2001). Os isolados virais podem ser diferenciados conforme sua capacidade de ligação aos diferentes co-receptores descritos. “Isolados R5” possuem tropismo para o receptor CCR5 (Deng *et al*, 1996) e “Isolados x4” possuem tropismo para o receptor CXCR4 (Feng *et al*, 1996). Podem também ser encontrados em pacientes isolados duplo-trópicos, ou seja, com tropismo tanto para CCR5 como para CXCR4 (isolados R5X4). No início da infecção existe uma tendência a predominar os isolados R5, enquanto que estágios de doença avançada cursam com predomínio de isolados X4 (Rowland-Jones *et al*, 2003).

Após este processo, o envelope viral funde-se com a célula hospedeira e transfere seu material genético e proteínas para o citoplasma celular. As fitas de RNA sofrem então a ação da transcriptase reversa, produzindo 2 fitas de DNA, denominado DNA pró-viral. Através da ação da enzima integrase, este material genético viral é inserido no genoma humano da célula hospedeira. Durante seu tempo de vida habitual, a célula infectada é acionada diversas vezes para produção de substâncias, natural do seu funcionamento. Quando os fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B por exemplo, atingem o núcleo celular e disparam a leitura do material genético, esta leitura irá também transcrever as proteínas virais (Cohen AJ e Fauci AS, 2001). As proteínas virais são então montadas no citoplasma e dão origem a um novo vírus, que pode romper a membrana plasmática e provocar a lise celular ao sair da célula (Peterlim e Trono, 2003). A este processo de utilização do maquinário celular para produção de proteínas virais após um estímulo fisiológico dá-se o nome de transativação heteróloga ou subversão imune. Este processo está representado na figura 3.

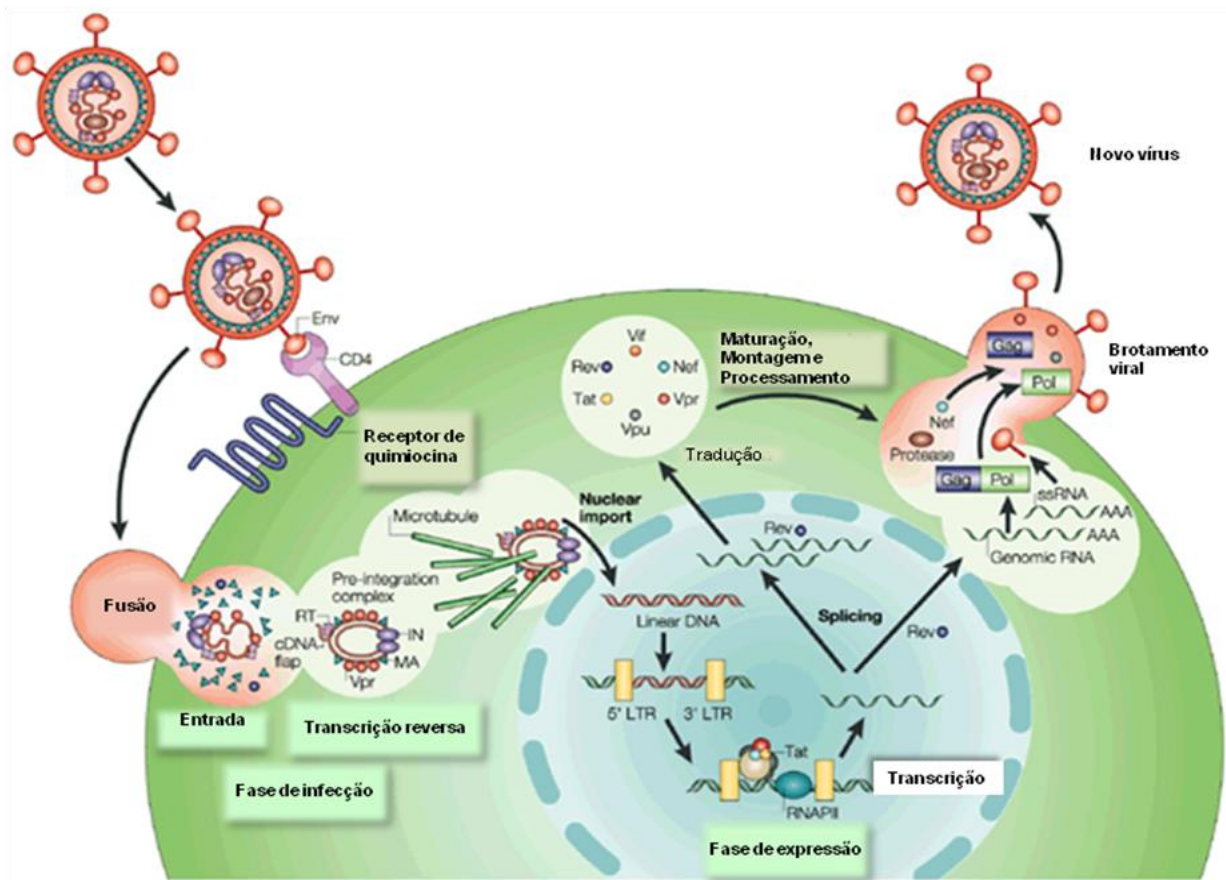


Figura 3: Ciclo de replicação do HIV-1. Adaptado de Peterlin e Trono, 2003.

Além da saída viral maciça, outros mecanismos contribuem para explicar a depleção de células TCD4+ da periferia. A célula infectada é capaz de apresentar antígenos virais para a célula TCD8+ (Células T citotóxicas) via moléculas de MHC de classe I (MHC-I). Estas células reconhecem o complexo MHC:peptídeo na superfície das células TCD4+ infectadas e exercem então seu mecanismo de citotoxicidade através da liberação de perforina e granzima. Além disso, macrófagos infectados pelo HIV produzem citocinas como o TNF- $\alpha$ , que possui receptores nas células TCD4+ com um domínio de sinalização para morte celular.



Tipicamente, após entrar no organismo via sítios de mucosa e infectar células CD4+, o HIV-1 é carregado até o linfonodo. Neste local ocorre replicação viral maciça, o que corresponde à síndrome retroviral aguda. Esta é caracterizada por febre, linfonodomegalia, cefaléia, mialgia e artralgia. Após este período, a resposta imunológica celular específica (adquirida) é montada e a viremia é controlada, fase referida como de latência clínica. Este período em que o número de cópias virais no sangue é baixo e o número de células T CD4+ atinge valores próximos aos de normalidade pode durar anos. Alguns indivíduos são capazes de montar uma resposta duradoura contra a infecção pelo HIV.

Indivíduos capazes de manter a carga viral para o HIV-1 indetectável no sangue periférico (< 50 cópias/ml) são chamados de controladores de elite ou supressores de elite. Por outro lado, indivíduos que, embora apresentem carga viral moderadamente detectável, mas mantêm níveis normais de células T CD4+ na periferia são denominados progressores lentos. Atualmente estima-se que os controladores de elite representem cerca de 2% da população total infectada pelo HIV (Deeks e Walker, 2007).

Com o tempo, a maior parte dos indivíduos experimenta o retorno da replicação viral, com destruição progressiva da resposta imune celular e o surgimento de infecções oportunistas e neoplasias tipicamente associadas ao HIV (Rowland-Jones *et al*, 2003). A figura 4 ilustra a história natural da infecção pelo HIV.

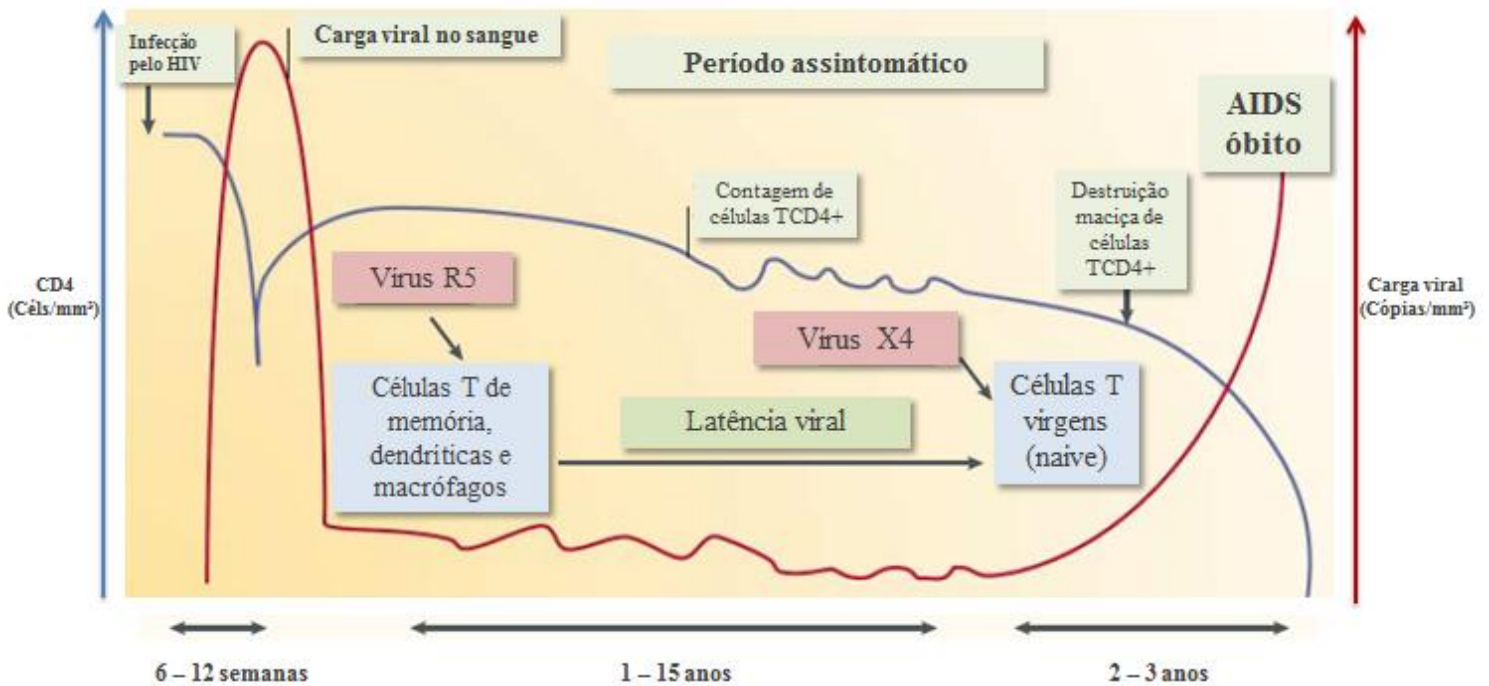


Figura 4: História natural da infecção pelo HIV-1. Adaptado de Rowland-Jones *et al*, 2003.

### 1.4.1 Ativação crônica do sistema imune e inflamação

O tecido linfoide associado ao intestino (GALT) é o principal sítio de replicação do HIV. Este local abriga grandes quantidades de células TCD4+ de memória. Estas células são especialmente sensíveis à infecção pelo HIV-1 (Johnson, 2008) e apenas no oitavo dia de infecção já é possível detectar uma destruição maciça desta população celular (Mehandru *et al*, 2004). Mehandru *et al* (2004) demonstraram que a depleção de células TCD4+ neste sítio anatômico antecede a queda de células TCD4+ na periferia e que a recuperação dos níveis de células TCD4+ no sangue periférico com a resposta imune adaptativa não é acompanhada de repovoamento completo deste tipo celular no GALT.

Neste local, o HIV-1 promove a quebra da permeabilidade seletiva intestinal, permitindo a passagem de produtos bacterianos, como o LPS (Lipopolissacarídeo), presente na parede celular de bactérias gram negativas. O LPS que atinge a circulação funciona como um estímulo antigênico crônico, processo que contribui para a exaustão de células T,

que pode ser medida através da expressão das moléculas HLA-DR e CD38 na superfície celular (Brenchley *et al*, 2006). Diversos marcadores alternativos, além da contagem no sangue periférico de células TCD4+ e da carga viral, têm sido descritos na infecção pelo HIV-1, tais como PD-1 (Day *et al*, 2006), CTLA-4 (Kaufmann *et al*, 2007) e sCD14 (Brenchley *et al*, 2006). Além da exaustão imunológica, marcadores de inflamação, como IL-6, PCR (Proteína C Reativa) e dímero-D, mostram-se patologicamente elevados em indivíduos infectados pelo HIV-1. Estes marcadores mostraram-se mais sensíveis na predição da progressão de doença e da mortalidade nos indivíduos infectados do que a carga viral medida no sangue periférico (Kalayjian *et al*, 2010).

#### **1.4.2 Cronificação da infecção pelo HIV-1 e mudança no perfil de complicações relacionadas à AIDS**

O advento da terapia antirretroviral de alta potência (TARV) no tratamento dos pacientes infectados pelo HIV-1 foi determinante na melhora do prognóstico e diminuição da letalidade, levando, por conseguinte, a um aumento na sobrevida e cronificação da doença (Dore *et al*, 2002). Lewden *et al* (2007) observaram que a mortalidade de pacientes com contagem de células TCD4+ maior que 500 células/mm<sup>3</sup>, em uso de TARV há pelo menos 6 anos, se assemelha à da população geral.

No estudo SMART - *Strategies for Management of Antiretroviral Therapy* – a TARV foi suspensa em um grupo de pacientes com contagem de células T CD4+ acima de 350 células/mm<sup>3</sup>, comparando com pacientes que mantiveram continuamente os antirretrovirais. Foi observado, no grupo de pacientes que teve a TARV suspensa, um aumento das infecções oportunistas e maior mortalidade, além de uma maior frequência de doenças cardíacas, renais ou hepáticas (SMART, 2006).

Palella *et al* (2006) demonstraram que a TARV aumenta a expectativa de vida dos pacientes infectados. Os pesquisadores seguiram 6.945 indivíduos infectados pelo HIV-1 de 1996 a 2004. A taxa de mortalidade caiu de maneira expressiva, de 7.0 mortes/100 pessoas-ano em 1996 para 1.3 mortes/100 pessoas-ano em 2004. As causas de morte associadas ao

HIV caíram de 3.79/100 pessoas-ano em 1996 para 0.32/100 pessoas-ano em 2004. O percentual de morte por causas não relacionadas à AIDS aumentou expressivamente de 13.1% em 1996 para 42.5% em 2004. Entre estas, as mais importantes foram disfunção hepática, cardiovascular, pulmonar e neoplasias não relacionadas à AIDS. Esta mudança no perfil de mortalidade foi acompanhada por mudanças na contagem de células TCD4+ próxima a este desfecho, passando de 59 células/mm<sup>3</sup> em 1996 para 287 células/mm<sup>3</sup> em 2004. Os pacientes que morrem por causas não relacionadas à AIDS iniciam TARV com níveis de células TCD4+ maiores que indivíduos que morrem por causas relacionadas à AIDS (22.4% e 7.8%, respectivamente, iniciaram TARV com contagem de células TCD4+ > 350 células/mm<sup>3</sup>,  $p < 0.001$ ).

Esta mudança no perfil de complicações do paciente cronicamente infectado pelo HIV-1 também está representada no Brasil. Pacheco *et al* (2009) seguiram 1.538 indivíduos infectados pelo HIV-1 de 1997 a 2006. A partir do período mais recente (2005-2006) as causas de morte não relacionadas à AIDS passaram a superar as causas de morte relacionadas a AIDS.

### **1.4.3 HIV-1, inflamação e doença cardiovascular**

A coorte FRAM (Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV infection) incluiu 922 pacientes HIV positivos em diferentes momentos da infecção pelo HIV e mostrou que mesmo indivíduos com boa resposta imunológica (contagem de células TCD4+ > 500 células/mm<sup>3</sup>) possuem níveis elevados de fibrinogênio e proteína C reativa (PCR) (Tien *et al*, 2010). Estes marcadores inflamatórios são independentemente capazes de prever a mortalidade geral e em subgrupos de estratificação pelos níveis de células TCD4+. A razão de chance (OR) para mortalidade geral com um aumento de fibrinogênio em 100mg/ml é 1.93 (1.57-2.37), 95% IC, para CD4 < 200 células/mm<sup>3</sup>, 1.43 (1.14-1.79), 95% IC, para CD4 entre 200-350 células/mm<sup>3</sup>, 1.30 (1.04-1.63), 95% IC, para CD4 entre 350-500 células/mm<sup>3</sup> e 1.30 (1.04-1.63), 95% IC, para CD4 > 500 células/mm<sup>3</sup> (Tien *et al*, 2010).

Diversos marcadores ligam diretamente o grau da inflamação do indivíduo cronicamente infectado pelo HIV-1 a desfechos como morte e surgimento de doença definidora de AIDS. Kalayjian *et al* (2010) demonstraram que antes do início da TARV, a presença de níveis mais elevados de sTNFR-1 (receptor de TNF solúvel), sCD27 (CD27 solúvel), sCD40L (CD40L solúvel) e IL-6 está associada ao desenvolvimento de nova doença oportunista e morte, após ajuste por idade, sexo, nível de hemoglobina e contagem de células TCD4+. Em uma análise de subgrupos, excluindo-se pacientes com doença oportunista, sTNFR-1, sCD27 (CD27 solúvel) e sCD40L associaram-se ao desenvolvimento de neoplasia relacionada a AIDS e morte. Estes eventos foram observados 51 semanas após início de TARV, momento no qual os indivíduos apresentavam contagem de células TCD4+ > 200 células/mm<sup>3</sup> e carga viral para HIV por PCR indetectável (< 50 cópias/mm<sup>3</sup>). Este achado sugere que mesmo o efeito virológico e imunológico atingido pela TARV não é capaz de restaurar completamente o nível de inflamação do indivíduo. Armah *et al* (2012) também relacionam resposta virológica e imunológica com o grau de inflamação. Neste estudo os pesquisadores demonstraram que pacientes HIV positivos com HIV RNA > 500 cópias/mm<sup>3</sup> no sangue periférico e contagem de células TCD4+ < 200 células/mm<sup>3</sup> possuem aumento nos marcadores de inflamação como IL-6 (OR:2.25; 95% CI:1.60-3.16) e D-dímero (OR:1.97; 95% CI:1.44-2.71) quando comparados com controles pareados pelo risco cardiovascular, além de aumento nos marcadores de ativação da resposta imune inata como sCD41 (CD41 solúvel), um marcador de ativação monocítica (OR:2.60; 95% CI:1.64-4.14).

Sibramarian *et al* (2012) utilizaram tomografia por emissão de pósitrons e demonstraram que pacientes HIV positivos com controle virológico (HIV RNA < 50 cópias/mm<sup>3</sup> no sangue periférico) e boa resposta imunológica (Mediana de células TCD4+ > 600 células/mm<sup>3</sup>) exibem maior grau de inflamação arterial aórtica quando comparados a pacientes não infectados, mesmo após equiparação para o risco cardiovascular. Demonstraram ainda que a inflamação arterial correlaciona-se com o maior grau de ativação do sistema imune, medida neste estudo pela expressão de CD163 solúvel no sangue (sCD163), um marcador de ativação monocítica e macrofágica.

A TARV é capaz de restaurar parcialmente o grau de inflamação e a disfunção endotelial observada durante a infecção pelo HIV-1. Baker *et al* (2012) observaram que a

disfunção endotelial medida através de ADMA (dimetil-arginina assimétrica) está associada a marcadores de inflamação como D-dímero e proteína C reativa (PCR) durante a infecção pelo HIV-1 e é parcialmente revertida com o uso de terapia antirretroviral. Bernal *et al* (2012) compararam o estado de inflamação e a ativação endotelial em pacientes HIV positivos com controle virológico e sem controle virológico, após equiparação para idade, sexo e risco cardiovascular. Os pacientes HIV positivos sem controle virológico possuem valores elevados de IL-6, hsPCR (Proteína C reativa ultra-sensível), além de aumento da ativação endotelial, medida pela expressão de VCAM-1 (proteína de adesão celular vascular 1). Os mesmos parâmetros também estão elevados quando se compara o grupo com controle virológico aos controles, sugerindo que o tratamento atenua parcialmente o estado de inflamação e a ativação endotelial.

A infecção pelo HIV-1, além de causar disfunção endotelial, altera a incidência de eventos cardiovasculares. O risco relativo para desenvolvimento de IAM em homens e mulheres aumenta significativamente nos pacientes infectados, quando comparados a controles equiparados para os fatores convencionais de risco, passando de 0,76 para 1,64 e 1,03 para 1,72, respectivamente (Análise na faixa etária de 24 a 34 anos) (Currier *et al*, 2003). Na coorte DAD, sugeriu-se um aumento na incidência de IAM em pacientes utilizando antirretrovirais, efeito potencializado pelo uso crônico das medicações. O risco relativo foi 1,26 (95% CI 1,12 a 1,41) para indivíduos em tratamento.

Durand *et al* (2011) analisaram o impacto da infecção pelo HIV-1 e da terapia antirretroviral no desenvolvimento do infarto agudo do miocárdio (IAM). Na análise por sub-grupos, infecção pelo HIV-1, uso de lopinavir, ritonavir, abacavir ou efavirenz esteve associada com aumento do risco de IAM. Triant *et al* (2010) estudaram a relação de carga viral para HIV-1 e nível de células TCD4+ no desenvolvimento de IAM. A contagem de CD4 é o principal fator capaz de prever IAM e sua recuperação está associada à diminuição do risco de IAM. Neste estudo, de maneira geral, a terapia antirretroviral teve um papel protetor no desenvolvimento de IAM.

O risco para evento trombótico no leito venoso também parece estar aumentado no paciente portador de AIDS, ocorrendo em uma faixa etária mais jovem do que na população não infectada. Crum-Cianflone *et al* (2008) observaram um risco 4 vezes maior de TVP em pacientes HIV positivos quando comparado à população controle pareada por

idade, sexo e risco cardiovascular. Desenvolvimento de TVP esteve associado a nadir mais baixo de CD4, carga viral e contagem de células TCD4+. A idade média de TVP foi de 36 anos, mais jovem que a população em geral.

Recentemente, Hsue *et al* (2012), diferentemente dos trabalhos citados anteriormente, sugeriram que indivíduos infectados pelo HIV-1 possuem uma produção significativamente menor de trombina quando comparados aos controles, pareados pelo risco cardiovascular. Interessantemente, os pesquisadores não observaram alterações significativas nos marcadores inflamatórios e a presença ou ausência de carga viral indetectável não alterou os resultados.

De maneira geral, as evidências atuais sugerem que a infecção pelo HIV-1 está associada a um aumento significativo do risco cardiovascular e que a TARV é capaz de atenuar, mas não de reverter estas complicações.

## **1.5 Fisiologia plaquetária**

A ausência de núcleo e sua meia vida relativamente curta (7 a 10 dias) fizeram com que o papel biológico das plaquetas ficasse, por muitos anos, restrito ao entendimento da hemostasia. Recentemente, no entanto, funções antes atribuídas apenas a células nucleadas foram caracterizadas na plaqueta como: (a) Apoptose (Mason *et al*, 2007); (b) Divisão celular (Schwartz *et al*, 2010) e (c) Síntese protéica (Warchal *et al*, 1966).

A seguir abordaremos algumas funções classicamente atribuídas às plaquetas humanas assim como pontos-chave na nova biologia plaquetária, importantes para a discussão do presente trabalho.

### **1.5.1 Agregação plaquetária**

Didaticamente, a função plaquetária na hemostasia é dividida em 3 estágios: (a) iniciação, (b) extensão e (c) estabilização (Brass, 2010). Na iniciação, a exposição de colágeno e a presença de trombina permitem a formação de uma monocamada plaquetária, que suportará a subsequente agregação de plaquetas ativadas. A extensão ocorre quando um

maior número de plaquetas é depositado nesta camada inicial e estas se tornam ativadas. Neste passo, a ligação de trombina, tromboxano A2 e ADP a seus receptores, PAR1 e PAR4, TP, P2Y1 e P2Y12, respectivamente, é essencial. Estes receptores são receptores metabotrópicos, ou seja, estão acoplados a uma proteína G que será responsável por continuar o processo de sinalização intracelular até que haja a transcrição e expressão plaquetária da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GP IIb-IIIa), fundamental para que haja a força de coesão plaquetária (agregação). A plaqueta é fonte importante destas moléculas. Os grânulos- $\alpha$  e grânulos densos são ricos em trombina e ADP, respectivamente, enquanto que a produção de tromboxano A2 vem do metabolismo do ácido aracdônico liberado pelo metabolismo dos fosfolipídios da membrana plaquetária. O processo de ativação plaquetária também é marcado pela transposição de fosfatidilserina da cama interna para a camada externa da membrana plaquetária, o que favorece a ligação de complexos de fatores de coagulação e a geração de trombina.

O terceiro estágio, estabilização, refere-se a eventos que ocorrem para inibir a desagregação plaquetária precoce e amplificam a sinalização interplaquetária. Neste estágio é observada uma estrutura composta por plaquetas ativadas permeadas por fibrina, resistente o bastante para vencer a pressão hidrostática existente no leito arterial. Esta estrutura não apenas fornece uma superfície que facilita a migração celular para os tecidos adjacentes como também é fonte de mediadores inflamatórios e moléculas que facilitam a cicatrização.

Deficiências neste processo são capazes de influenciar profundamente a homeostase do meio interno, como podemos observar na Thrombastenia de Glanzmann, na síndrome de Bernard-Soulier, na doença de Von Willebrand e na deficiência do receptor de colágeno, onde fica claro o papel das moléculas  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , GPIb, VWF e GP VI, respectivamente. A ativação plaquetária também contribui para a perpetuação do processo inflamatório vascular e para o crescimento da placa ateromatosa (Davi e Patrono, 2007).



## 1.5.2 Apoptose plaquetária

A plaqueta é capaz de sofrer apoptose. Um balanço entre BCL-X<sub>L</sub> e BAK regula a meia-vida de plaquetas na circulação periférica. Com o envelhecimento plaquetário ocorre a degradação de BCL-X<sub>L</sub> iniciando a via intrínseca de apoptose e conseqüente depuração plaquetária (Mason *et al*, 2007). Outros estímulos como a estocagem e/ou ativação com trombina ou o ionóforo de cálcio A23187 promovem a diminuição do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Esta alteração mitocondrial está associada com ativação da via intrínseca de apoptose, demonstrada por aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bid, Bax, Bake e ativação de caspase-3 (Verhoeven *et al*, 2005; Leytin *et al*, 2006; Lopez 2008). Também fazem parte do fenótipo de apoptose plaquetária a exposição de fosfatidilserina e a produção de micropartículas plaquetárias (PMP) (Gyulkhandanyan *et al*, 2012). A figura 5 ilustra importantes eventos da apoptose plaquetária.

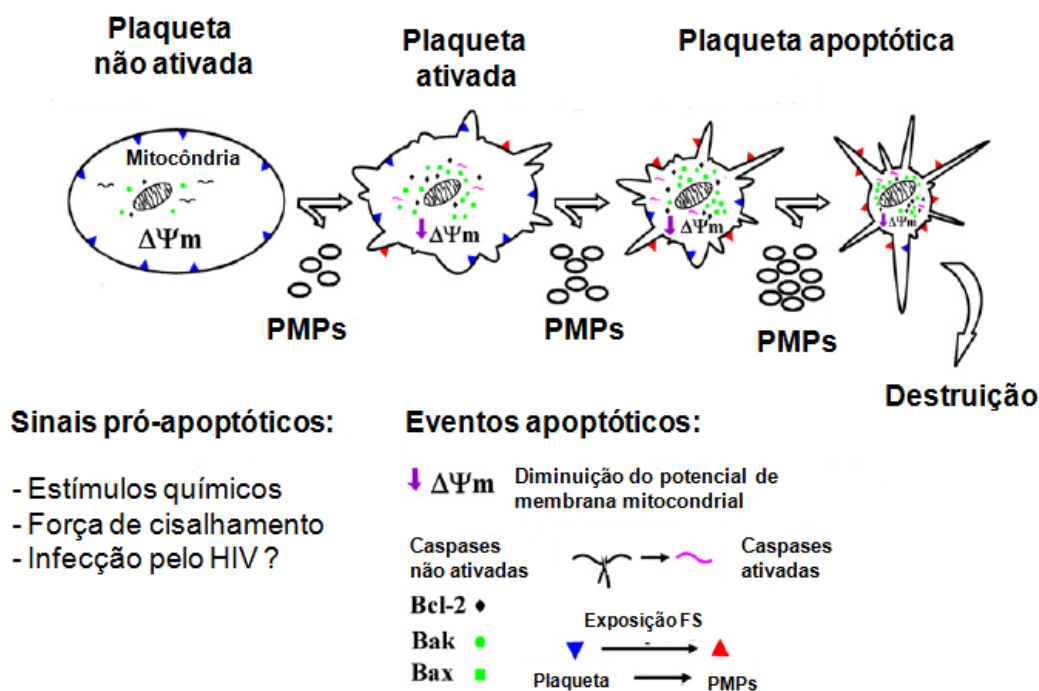


Figura 5. Eventos apoptóticos na plaqueta humana. Observa-se a mudança de forma, com emissão de prolongamentos celulares (Filopodia), diminuição do volume plaquetário, diminuição do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), exposição de fosfatidilserina (FS), transposição de Bcl-2, Bak e Bax para a mitocôndria, produção de PMPs (Micropartículas plaquetárias) e ativação de Caspases. (Adaptado de Gyulkhandanyan *et al*, 2012)

### 1.5.3 Tradução estímulo dependente: Síntese protéica *denovo*

A plaqueta possui moléculas de mRNA quiescentes, oriundas de suas células-mãe, os megacariócitos. De acordo com o estímulo, a plaqueta ativada é capaz de traduzir o mRNA em novas proteínas. Embora a síntese protéica plaquetária tenha sido descrita décadas atrás (Warchal *et al*, 1966), apenas recentemente, com as novas técnicas de hibridização e análise do genoma, os mecanismos envolvidos no controle da síntese protéica plaquetária ganharam atenção. Lindemann *et al* (2001) analisaram o pool de mRNA plaquetário (Transcriptoma) e identificaram mais de 30 moléculas de mRNA pré-formados. Neste trabalho, os pesquisadores observaram que através da sinalização pela integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  plaquetas ativadas produzem IL-1 $\beta$  de maneira sustentada. A IL-1 $\beta$  produzida no meio atua no endotélio vascular e estimula a expressão de E-selectina, favorecendo a ligação de polimorfonucleares no endotélio e sua emigração pela vasculatura em direção ao sítio efetor.

A plaqueta possui mecanismos de controle pós-transcricionais. Zimmerman e Weyrich (2008) demonstraram a presença de mTOR (Mammalian target of rapamycin), uma serina quinase que controla a tradução protéica em mamíferos, indicando que os mecanismos de controle pós-transcricionais estão presentes na plaqueta do sangue periférico. Também demonstraram que a família proto-oncogênica bcl-3 (B cell lymphoma-3) e suas proteínas correlatas, importantes reguladores do ciclo celular, estão presentes e funcionais na plaqueta.

As moléculas produzidas pela plaqueta ativada, e seus respectivos alvos no corpo humano, estão demonstrados na tabela 1. Estas moléculas ligam a plaqueta a diversos fenômenos biológicos como inflamação (Bozza e Zimmerman, 2009), resposta imune, rejeição de transplantes e sinalização celular.

Quadro 1. Fatores com atividade imunológica, inflamatória e antimicrobiana produzidos após a ativação plaquetária. Adaptado de Weyrich e Zimmerman, 2004.

Classe	Molécula	Armazenado ou Sintetizado	Alvo biológico
Citocinas	IL-1 $\beta$	Sintetizado	Monócitos, Cels edoteliais, DCs e macrófagos
	HMGB1	Armazenado	Macrófagos, PMNs, Cels edoteliais
Quimiocinas	NAP2 (CXCL7)	Clivagem proteolítica	PMNs
	PF4 (CXCL4)	Armazenado	PMNs
	GRO- $\alpha$ (CXCL1)	Armazenado	PMNs
	ENA-78 (CXCL5)	Armazenado	PMNs
	RANTES (CCL5)	Armazenado	Monócitos, eosinófilos, basófilos, Cels NK, Cels T, DCs
	MIP-1 $\alpha$ (CCL3)	Armazenado	Monócitos, eosinófilos, basófilos, Cels NK
	MCP-3 (CCL7)	Armazenado	Monócitos, basófilos, Cels NK, linfócitos, DCs
Mediadores inflamatórios	Serotonina	Armazenado	Monócitos e macrófagos
	TXA2	Sintetizado	Plaquetas, Cels T e macrófagos
	PAF	Sintetizado	Plaquetas, PMNs, monócitos, macrófagos e linfócitos
	Histamina	Armazenado	Cels edoteliais, monócitos, PMNs, Cels NK, Cels T, Cels B e eosinófilos
Peptídeos antimicrobianos	Trombocidinas	Clivagem proteolítica	Nenhum alvo celular humano, microbicida para bactérias e fungos
Fatores de crescimento com função imunomoduladora	PDGF	Armazenado	Monócitos e macrófagos
	TGF- $\beta$	Armazenado	Monócitos, macrófagos e Cels T e B

Abreviações: Cels edoteliais, células endoteliais; DCs, células dendríticas; PMNs, polimorfonucleares; Cels NK, células matadoras naturais; Cels T, linfócitos T; Cels B, linfócitos B. (Adaptado de Weirich e Zimmerman, 2004)

### 1.5.4 Novas funções biológicas

Muitos produtos produzidos pela plaqueta ativada possuem atividade antimicrobiana. Tang *et al* (2002) analisaram a função antimicrobiana de PF-4 (fator plaquetário 4 - CXCL4 -), CCL5, CTAP-3 (peptídeo ativador do tecido conjuntivo 3), PBP (proteína plaquetária básica), timosina  $\beta$ -4 (T $\beta$ -4), FP-B (fibrinopeptídeo B) e FP-A (fibrinopeptídeo A). Estas moléculas foram capazes de inibir o crescimento de diversos agentes microbianos como *Escherichia coli* ML35, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Os autores sugerem que devido a seu elevado número na circulação sanguínea, o papel da plaqueta no controle do crescimento microbiano é relevante. Mais recentemente, Clark *et al* (2007) demonstraram que a plaqueta é capaz de ativar a geração de NETs (neutrophil extracellular traps), importante mecanismo de controle da proliferação microbiana.

Ahmad *et al* (2001) caracterizaram a expressão plaquetária de ligante de FAS (FAS-L). Estes pesquisadores demonstraram que após a ativação, a plaqueta expressa e secreta FAS-L no meio. Em um modelo *in vitro* de células humanas tumorais a ligação FAS: FAS-L, importante mecanismo de controle de crescimento tumoral, foi capaz de induzir a apoptose nas células tumorais, demonstrando que esta molécula é funcional na plaqueta. Além de FAS-L, a plaqueta também expressa TLR-4 (Receptor do tipo Toll – 4). Jayachandran *et al* (2010) demonstraram o papel da plaqueta na resposta imune inata. Neste trabalho, doses de LPS baixa (que não eram capazes de estimular a produção de TNF- $\alpha$ ) foram capazes de promover a ativação plaquetária. Utilizando camundongos knockout para TLR-4, a introdução de LPS não foi capaz de promover a ativação plaquetária.

Morrel *et al* (2008) identificam a produção plaquetária de glutamato e sua capacidade de promover a ativação plaquetária. O bloqueio do receptor de glutamato plaquetário, em modelo murino de transplante de pele, foi capaz de aumentar a sobrevivência dos enxertos (Swaim *et al*, 2010).

A plaqueta é capaz de modular a resposta celular específica. Em modelo murino de hepatite B aguda, a depleção plaquetária bloqueou o acúmulo de células TCD8<sup>+</sup> específicas (CTL) no fígado e preveniu o dano hepático. A transfusão de plaquetas com função normal restaurou a resposta de células T específicas, enquanto a transfusão de plaquetas com

bloqueio na capacidade de ativação não restaurou a resposta imune e o dano hepático. Mais ainda, com a adição de anticoagulantes, a transfusão de plaquetas com potencial de ativação bloqueado não restaurou o dano hepático e a resposta de células T, sugerindo que o papel na trombose não é o responsável pelas alterações encontradas (Iannacone *et al*, 2005).

## 1.6 Plaqueta e HIV

Os primeiros dados relativos à interação Plaqueta - HIV surgiram através da microscopia eletrônica, em 1990. Neste trabalho, Zucker-Franklin *et al* (1990) identificaram o HIV-1 em plaquetas frescas de sangue periférico e em megacariócitos humanos. Chaipan *et al* (2006) demonstraram que o mecanismo de entrada do HIV na plaqueta não é mediado pela via clássica de infecção celular (molécula CD4 e um receptor de quimiocina) mas sim pela interação da gp120 viral com as moléculas DC-SIGN (Dendritic cell-specific receptor) e CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2) da superfície plaquetária, possibilitando a endocitose viral.

A plaqueta é capaz de inativar o HIV. Após entrar na célula o vírus pode seguir dois destinos básicos. Se a vesícula endocítica é trafegada para a periferia plaquetária, próximo ao sistema canalicular aberto (OCS), o HIV entrará em contato com o conteúdo dos grânulos- $\alpha$  e será neutralizado. Contudo, se o tráfego vesicular do HIV endocitado não atinge o conteúdo dos grânulos alfa, localizando-se mais centralmente na plaqueta, o HIV permanece intacto e protegido do ataque do sistema imune, podendo ser transportado para outras partes do corpo (Boukor *et al*, 2006). Youssefian *et al* (2002), demonstraram que a atividade endocítica plaquetária do HIV-1, com subsequente destruição ao contato com os grânulos- $\alpha$  plaquetários, é aumentada pelo estado de ativação plaquetária.

A plaqueta também é capaz de modular a replicação viral através da rede citocinas. Auerbach *et al* (2012) demonstraram a produção plaquetária de PF-4 (CCL-4), uma CXC quimiocina, e sua potente capacidade de inibir a replicação viral em macrófagos e linfócitos T. *In vitro*, os autores demonstraram que a inibição da replicação viral ocorre com a ligação de CXCL4 em um sítio da gp120 próximo ao sítio de ligação com a molécula CD4. CXCL4 é liberado com a ativação plaquetária e é a proteína mais abundante dos grânulos- $\alpha$  plaquetários.

O HIV provoca alterações na fisiologia plaquetária. Didaticamente, podemos separar estas alterações em alterações da forma (morfológicas) e da função plaquetária (funcionais). Morfologicamente, Mena *et al* (2011) demonstraram que indivíduos infectados pelo HIV e que nunca usaram TARV apresentam aumento no volume plaquetário. Funcionalmente, diversas alterações têm sido caracterizadas como o aumento da ativação plaquetária (Mayne *et al*, 2012) e o aumento na produção de citocinas e quimiocinas como CCL5 (Holme *et al*, 1998), CXCL4 (Auerbach *et al*, 2012) e TF (fator tissular) (Mayne *et al*, 2012).

A infecção pelo HIV provoca a ativação plaquetária e a produção de micropartículas plaquetárias (PMP). A ativação plaquetária medida pela expressão de P-selectina (CD62P) e a produção de PMP correlacionam-se com a expressão de fator tissular plaquetário e com marcadores de translocação microbiana como o sCD14 (CD14 solúvel), o ligante de LPS (lipopolisacarídeo) e com a exaustão de células T (CD38 positivas e HLA-DR positivas) (Mayne *et al*, 2012).

A infecção pelo HIV é capaz de desregular a produção plaquetária de CCL5 (Holme *et al*, 1998). CCL5, juntamente com CCL3 e CCL4, são quimiocinas produzidas pelos linfócitos T capazes de suprimir a replicação viral do HIV por competirem com o sítio de ligação da gp41 viral. Na infecção avançada pelo HIV (AIDS), a produção plaquetária de CCL5 está desregulada. Nesta fase, a plaqueta exibe uma produção basal significativamente elevada, mas é incapaz de igualar a resposta de uma plaqueta normal frente ao estímulo com um agonista do receptor de trombina – SFLLRN – (Holme *et al*, 1998). Processo que os autores denominam “exaustão” plaquetária.

A molécula TAT (Trans-Activator of Transcription), fundamental nos mecanismos patogênicos do HIV por aumentar exponencialmente a replicação viral, é capaz de provocar diretamente a ativação plaquetária e a produção de micropartículas plaquetárias (PMPs) em um mecanismo que depende da interação com o receptor de quimiocina CCR3, com a integrina  $\beta 3$  e com o fluxo intracelular de cálcio. Nesta ativação, as plaquetas estimuladas secretam a molécula CD154 no meio, um imunomodulador envolvido na geração de auto-anticorpos (Wang *et al*, 2011).

Perry *et al* (2005) avaliaram o papel de Tat na patogênese da lesão neuronal associada ao HIV-1. Em modelo murino, Tat é capaz induzir lesão mitocondrial e stress

oxidativo em neurônios. O efeito patogênico está, neste modelo, associado à produção de PAF (Fator de ativação plaquetária). A disfunção mitocondrial está relacionada a apoptose neuronal e a adição de FCCP (Trifluor-metil-carbonil-cianido- fenildrasona) em cultura ou do antagonista do canal KATP mitocondrial (Canal de ATP sensível a potássio) foram capazes de inibir a despolarização mitocondrial e a apoptose, sugerindo que a disfunção mitocondrial está envolvida na ativação de apoptose neuronal.

Nos pacientes infectados pelo HIV a trombocitopenia é um achado freqüente e parece estar relacionado com a evolução da doença (Rieg *et al*, 2007). Os mecanismos envolvidos na disfunção hematológica, marcada pela plaquetopenia, ainda não foram completamente elucidados, mas parecem diferir nos diferentes momentos da infecção. Inicialmente, os fenômenos auto-ímmunes, com a geração de auto-anticorpos, tendem a prevalecer, enquanto que posteriormente, a falência na plaquetopoiese induzida pela infecção do HIV, parece predominar (Passos, 2010).

O impacto da infecção pelo HIV na homeostase plaquetária também é influenciado pela terapia antirretroviral. Hentig *et al* (2008) demonstraram que, em pacientes infectados pelo HIV, o início de TARV contendo inibidores de protease (Saquinavir, Lopinavir, Fosamprenavir ou Atazanavir) aumentou significativamente a interação plaqueta-leucócito e a expressão plaquetária de CD40-L, marcadores associados com desenvolvimento de aterosclerose. O potencial de geração de trombina também se mostrou elevado. Neste estudo, a expressão de P-selectina (CD62P) não sofreu alterações significativas. Satchell *et al* (2011) demonstraram que pacientes em uso TARV que contém Abacavir apresentam maior agregação plaquetária quando estimuladas com agonistas (ADP, colágeno e adrenalina), além de uma maior sensibilidade à agregação quando estimuladas com TRAP (peptídeo ativador do receptor de trombina), quando com paradas com plaquetas controle. Chini *et al* (2012) analisaram prospectivamente o efeito de TARV contendo Abacavir, especificamente o esquema Abacavir/Lamivudina/Efavirenz na produção plaquetária e leucocitária de PAF (fator ativador plaquetário). As medidas foram feitas imediatamente antes e com 1, 3 e 6 meses após o início da TARV. A partir do terceiro mês, embora houvesse resposta virológica e imunológica, observou-se um aumento plaquetário e leucocitário de PAF, mediador classicamente implicado na gênese de IAM.

Em suma, o entendimento da função da função plaquetária na infecção pelo HIV-1 pode ajudar a elucidar os mecanismos das complicações cardiovasculares e estender o conhecimento sobre a patogênese da AIDS.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a função plaquetária em diferentes momentos clínicos da infecção pelo HIV.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o perfil de ativação plaquetária em pacientes infectados pelo HIV-1 e controles;
- Caracterizar a presença de disfunção mitocondrial em plaquetas de pacientes infectados pelo HIV-1 e controles;
- Comparar a produção plaquetária de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em pacientes infectados pelo HIV-1 e controles;
- Comparar os parâmetros de morte celular plaquetária em pacientes infectados pelo HIV-1 e controles;
- Comparar o perfil de ativação plaquetária induzido por trombina entre pacientes infectados pelo HIV-1 e controles.
- Comparar o perfil da ativação, disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de nitrogênio e a resposta com trombina em pacientes com controle virológico (carga viral para HIV-1 no sangue periférico  $< 50$  cópias/mm<sup>3</sup>) e sem controle virológico (carga viral para HIV-1 no sangue periférico  $> 50$  cópias/mm<sup>3</sup>).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo observacional seccional onde o tipo de amostragem foi de conveniência.

#### **3.2 População do estudo**

Após a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa (CEP / CAAE 0043.0.009.000-11), foram incluídos no estudo indivíduos com sorologia positiva para HIV-1 em diferentes estágios clínicos de doença, acompanhados ambulatorialmente ou internados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ), e indivíduos não infectados pelo HIV-1.

#### **3.3 Subgrupos de estudo**

- (i) Indivíduos infectados e em uso de TARV com supressão virológica (carga viral para HIV-1 no sangue periférico  $< 50$  cópias/mm<sup>3</sup>);
- (ii) Indivíduos infectados e sem supressão virológica (carga viral para o HIV-1 no sangue periférico  $> 50$  cópias/mm<sup>3</sup>);
- (iii) Indivíduos não infectados (controles): Constituído por acompanhantes dos pacientes dos demais grupos, com sorologia negativa para HIV-1.

#### **3.4 Critérios de exclusão**

Os critérios de exclusão foram: gravidez, menores de 18 anos, infecção pelo vírus da hepatite C, infecção pelo vírus da hepatite B, infecção pelo vírus linfotrópico humano (HTLV), púrpura trombocitopênica idiopática, púrpura trombocitopênica trombótica, uso de antiagregante plaquetário e a não assinatura do termo de consentimento.

### **3.5 Dados clínicos**

Coletamos os seguintes dados epidemiológicos e demográficos: Sexo, idade no momento da coleta de sangue, raça, etilismo, uso de drogas ilícitas.

Coletamos os seguintes dados clínicos: Co-morbidades, medicação concomitante, tempo de diagnóstico de AIDS.

Coletamos os seguintes dados laboratoriais: Sorologia para hepatite-B (HBV), sorologia para hepatite-C (HCV), sorologia para o vírus T-linfotrófico humano (HTLV), contagem de células TCD4+ e quantificação de carga viral para o HIV-1 por PCR (Até 3 meses antes da inclusão no estudo), dosagem de albumina, plaquetometria no momento da coleta, tempo de ação da pró-trombina (TAP), tempo parcial da tromboplastina (PTT) e índice internacional de normalidade (INR).

### **3.5 Coleta de material biológico**

Após a assinatura do termo de consentimento pelo paciente ou por seu responsável legal, 20 ml de sangue foram coletados por punção de veia ou artéria periférica de pacientes infectados pelo HIV-1 e controles, para a realização dos seguintes procedimentos:

### **3.6 Isolamento de plaquetas**

Plaquetas foram isoladas usando o método de Hamburger e McEver (1990). O volume de 20 mL de sangue total foi centrifugado a 800 rpm (200 x g) por 20 minutos a temperatura ambiente. A camada correspondente ao plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletada e a esta foi adicionada PGE<sub>1</sub> (prostaglandina E<sub>1</sub>, Cayman Chemical 13010.1), que alcançou uma concentração final de 0,3 µM, de forma a evitar a ativação plaquetária durante o processo de centrifugação. O PRP foi então centrifugado à 1.500 (730 x g) rpm por 20 minutos a temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante e as plaquetas foram ressuspendidas em 25 mL de PSG (5mM de PIPES, 145 mM de NaCl, 4mM de KCl, 50µM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5,5mM de glicose; pH 6,8). Mais uma vez PGE<sub>1</sub> foi

adicionada para a concentração final de 0,3  $\mu\text{M}$ . Após mais uma centrifugação à 1500 rpm (730 x g) por 20 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as plaquetas foram ressuspensas em meio M199 (meio 199 com EBSS, L-Glutamina e HEPES; Lonza 12-117F) para a concentração final de  $1 \times 10^9$  células/ml, a contagem foi realizada em centrífuga para micro-hematócrito, cada linha do cartão de hematócrito corresponde a  $1 \times 10^9$  plaquetas humanas.

O nível de pureza das plaquetas isoladas foi avaliado por meio de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur) utilizando um anticorpo monoclonal para CD-41a conjugado à fluoresceína isotiocianato (FITC mouse anti-human CD41a, eBioscience 11-0419) (figura 6). Foram adquiridos 10.000 eventos os quais mostraram ter mais de 99% de células CD41a positivas.

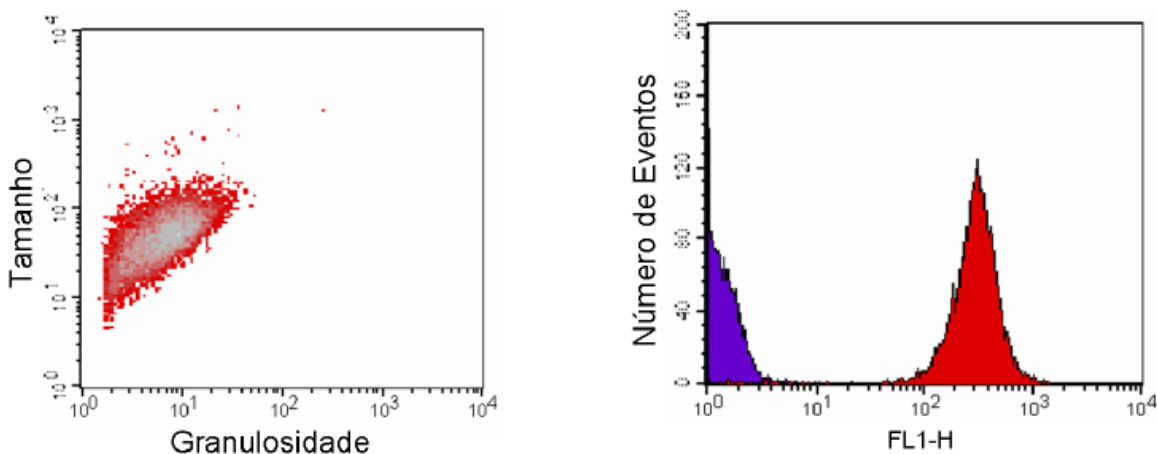


Figura 6. Análise do nível de pureza das plaquetas isoladas. A) População de células purificadas analisadas quanto ao tamanho e granulosidade; B) Perfil de expressão de CD41a nas células isoladas (em azul células não marcadas e em vermelho células marcadas com CD41a-FITC). Observou-se mais de 99% de positividade para CD41a nas plaquetas isoladas.

### **3.7 Depleção de células CD45+**

A depleção de leucócitos foi realizada com um kit comercial, conforme orientações do fabricante (EasySep® Human CD45 Depletion Kit # Cat 18259). Resumidamente, a solução de plaquetas purificadas é acrescida com anticorpos monoclonais anti-CD45 e 2,5 µl de PGE1 (0,3 µM), para prevenir a ativação plaquetária, e incubada por 10 min. Adicionamos as beads magnéticas e 2,5 µl de PGE1 (0,3 µM), encubando por 10 min. A solução de plaquetas com anticorpos e beads magnéticas é colocada no magneto (EasySep® Magnet # Cat 18000) por 10 min e a depleção leucocitária é concluída.

### **3.8 Análise da ativação plaquetária**

A avaliação da expressão de P-selectina na superfície de plaquetas foi utilizada como marcador da ativação e degranulação plaquetária. A análise foi feita por meio de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur) utilizando anticorpo monoclonal para P-selectina (CD62-P) conjugado à fluoresceína isotiocianato (FITC mouse anti-human CD62-P, BD Pharminogen 555523).

### **3.9 Análise da exposição de fosfatidilserina**

A externalização de fosfatidilserina foi avaliada através de marcação com anexina V conjugada à fluoresceína isotiocianato (TACSTM Annexin V-FITC, TA5532) de acordo com especificações do fabricante. As células foram ressuspensas em 100µL de reagente de incubação com anexina V (10µL tampão de ligação 10x [100 mM de HEPES, 1,5 M de NaCl, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 18mM de CaCl<sub>2</sub>], 1µL de anexina V-FITC, e 89µL de água destilada estéril), e incubadas por 15 min a TA protegidas da luz. Foram adicionados 400µL de tampão de ligação em cada tubo e aquisição foi realizada em citômetro de fluxo (BD FACScan Excalibur) até uma hora após a marcação.

### **3.10 Análise do potencial de membrana mitocondrial**

O  $\Delta\Psi_m$  foi avaliado utilizando a sonda fluorescente tetrametilrodamina etil éster (TMRE), a 100 nM, 37°C por 10 min (Molecular Probes, Invitrogen). Resumidamente, a solução de plaquetas contendo  $5 \times 10^6$  células em cada poço foi acrescida de 0,5  $\mu$ l da sonda biológica, encubado por 10 minutos, protegido da luz, a 37 °C e a leitura da marcação foi realizada através de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur), sendo a excitação a 488nm e a emissão na faixa do laranja/vermelho 590 nm.

### **3.11 Análise da produção de óxido nítrico**

A quantificação da produção de óxido nítrico (NO) intracelular foi realizada com a sonda biológica DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato #cat D-23842), conforme orientações do fabricante. Resumidamente, a solução de plaquetas contendo  $5 \times 10^6$  células em cada poço foi acrescida de DAF-FM (5  $\mu$ M a 37°C por 30 min) e realizada a leitura no citômetro de fluxo (BD FACScan Excalibur).

### **3.12 Análise da produção de superóxido mitocondrial**

A geração de superóxido mitocondrial foi avaliada através de MitoSOX Red (2,5  $\mu$ M a 37°C por 10 min), uma sonda catiônica que acumula na mitocôndria e reage com espécies reativas de oxigênio (ROS). Resumidamente, a solução contendo  $5 \times 10^6$  células por poço foi acrescida de 0,5  $\mu$ l da sonda biológica, encubado por 15 minutos, protegido da luz, a 37 °C e a leitura foi realizada no citômetro de fluxo (BD FACScan Excalibur).

### **3.13 Análise da ativação de Caspase 9**

A análise da expressão de caspase 9 foi realizada através de um KIT comercial (FAM FLICA™ CASPASE-9 KIT # Cat 913). Resumidamente a solução de plaquetas

contendo  $5 \times 10^6$  células por poço foi adicionada 25  $\mu$ l de Tyrode e 1  $\mu$ l da sonda biológica, encubado por 1 hora, protegido da luz, a 37 °C. A solução foi lavada com o tampão de lavagem (450  $\mu$ l H<sub>2</sub>O-di + 50  $\mu$ l de tampão), centrifugado a 5.000 rpm por 10 min e o pellet foi ressuspenso em 300  $\mu$ l de Tyrode. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo (BD FACScan Excalibur).

### **3.14 Análise da resposta plaquetária ao estímulo com trombina**

A resposta plaquetária ao estímulo com diferentes concentrações de trombina (0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.2 U/ml, 0.4 U/ml) foi medida através da expressão de P-selectina, após 15 minutos de estímulo. A leitura foi realizada por citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur).

### **3.15 Armazenamento de amostras**

Para cada paciente incluído no estudo foram armazenadas 3 alíquotas de 1 ml de plasma, sobrenadante plaquetário e lisado celular para posterior análises. As amostras foram armazenadas a -70 °C no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

### **3.16 Análise Estatística**

As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se os pacotes estatísticos SPSS for Windows 10.0 (SPSS, Chicago, IL) e GraphPad Prism 3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Variáveis numéricas serão apresentadas como medianas e intervalo interquartil, serão avaliadas quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e as diferenças entre os grupos serão avaliadas por teste t de Student ou Mann Whitney ou ANOVA, quando forem incluídos mais de 2 grupos. Significância estatística será considerada sempre que  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

De Janeiro de 2012 a Janeiro de 2013 avaliamos 30 voluntários saudáveis e 27 pacientes infectados pelo HIV-1 em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Dentre os pacientes infectados avaliados, 18 apresentavam uso regular de TARV e tinham a carga viral para HIV-1 no sangue periférico indetectável ( $< 50$  cópias/mm<sup>3</sup>) e 9 apresentavam carga viral para HIV-1 no sangue periférico detectável ( $> 50$  cópias/mm<sup>3</sup>). A mediana de idade de todos os pacientes infectados foi igual a 40 (IQ 35 – 51) e a dos controles foi igual a 30 (IQ 26 – 33) [ $p < 0,01$ ]. Sexo masculino predominou no grupo de pacientes infectados (58%) e controles (59%), não havendo diferença significativa de sexo ( $p = 0,09$ ). As características clínicas e laboratoriais estão demonstradas na tabela 1.

O grupo de pacientes com controle virológico apresentou mediana de idade igual a 45 (IQ 38 – 49), com predomínio do sexo masculino (56%). Houve diferença de idade entre este grupo e os controles ( $p < 0,05$ ) mas não entre este grupo e o grupo com carga viral detectável, assim como não houve diferença de sexo entre os grupos. O grupo de pacientes sem controle virológico apresentou mediana de idade igual a 38 (IQ 30 – 54), com predomínio do sexo masculino (66%). Houve diferença de idade entre este grupo e os controles ( $p < 0,05$ ).

A mediana de tempo de diagnóstico de HIV dos pacientes com controle virológico foi de 114 meses (IQ 63 – 176) e a dos pacientes sem controle virológico foi de 99 meses (IQ 79 – 162), não havendo diferença significativa entre as medianas ( $p = 0,80$ ). A combinação de classe de antirretrovirais mais utilizada pelo grupo com controle virológico foi 2 ITRN (inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos) + 1 ITRNN (inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos) e a combinação mais utilizada pelo grupo de pacientes sem controle virológico foi 2 ITRN + 1 IP/r (inibidor de protease com buster de ritonavir). Nenhum esquema específico predominou significativamente. Falha virológica neste último grupo esteve relacionada a abandono de tratamento e uso irregular das medicações, embora o presente trabalho não tenha sido desenhado para captar de forma ótima este dado.



Plaquetopenia significativa foi encontrada apenas na comparação do grupo de pacientes sem controle virológico 115 (IQ 71 – 190) com controles 196 (IQ 153 – 238),  $p < 0,05$ .

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais de pacientes e controles. Resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil.

	Não HIV (N = 30)	HIV/AIDS CV > 50 (N = 9)	HIV/AIDS CV < 50 (N = 17)
Idade (anos)	30 (26 – 33)	38 ( 30 – 54)*	45 (38.5 - 49.5)†
Sexo (masculino)	10 (37%)	6 (66%)	9 (53%)
Contagem de células CD4 (por mm <sup>3</sup> )	-	126 (38 – 265)	569 (242 – 866)
Nadir CD4	-	51 (31 – 197)	243 (71 – 550)
Carga viral (x 10 <sup>3</sup> cópias/mm <sup>3</sup> )	-	255 (54 – 493)	indetectável
Tempo de diagnóstico de HIV (meses)	-	99 (79 – 162)	114 (63 – 121)
TARV	-	7 (78%)	17 (100%)
ITRN + ITRNN	-	1 (14%)	9 (56%)
ITRN + IP/R	-	6 (86%)	7 (44%)
Plaquetometria (x 10 <sup>3</sup> )	196 (153 – 238)	115 (71 – 190)*	157 (143 – 213)
TAP (%)	71 (67 – 87)	75 (65 – 88)	85 (70 – 94)
PTT (Segundos)	30 (28 – 32)	32 (28 – 35)	29 (24 – 31)
INR	1,18 (1,0 – 1,2)	1,18 (1,1 – 1,2)	1,1 (1,0 – 1,2)

\*  $p < 0,05$  quando comparado aos não HIV

†  $p < 0,01$  quando comparado aos não HIV

#### **4.1 Aumento da ativação plaquetária em indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico**

Com o intuito de avaliar o estado de ativação celular, plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) de indivíduos infectados pelo HIV-1, com a replicação viral controlada, e de indivíduos não infectados (controles) foram marcadas para CD62-P (P-selectina) e para fosfatidilserina.

##### **4.1.1 Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico possuem aumento na expressão de P-selectina**

A expressão de P-selectina (CD62-P) na superfície plaquetária é um dos principais marcadores de ativação celular. A presença desse marcador foi avaliada por citometria de fluxo em plaquetas isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS e em uso de terapia antirretroviral (TARV) que atingiram supressão virológica (quantificação de carga viral por PCR para HIV-1 no sangue periférico menor que 50 cópias/mm<sup>3</sup>).

Observamos uma maior expressão de P-selectina nas plaquetas isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS sob controle virológico quando comparadas aos indivíduos controles [intensidade média de fluorescência (IMF) para CD62-P = 17,63 (IQ 13,1 – 19,8) e 30,7 (IQ 16,66 – 49,20) para controles e pacientes, respectivamente,  $p < 0,05$ ] (figura 7).

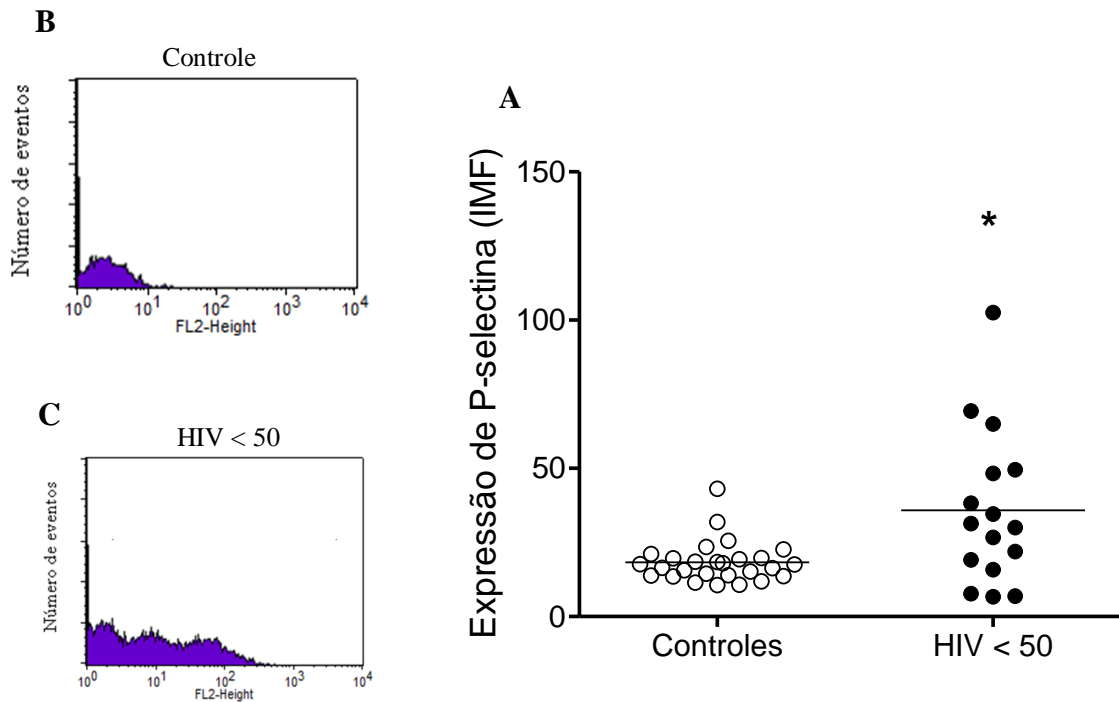


Figura 7: Expressão plaquetária de P-selectina. (A) Intensidade média de fluorescência (IMF) para P-selectina de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 27$ ) e de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 16$ ). (B) e (C): Histogramas representativos. (\*)  $p < 0.05$ , Teste U: Mann Whitney Test.

#### 4.1.2 Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico possuem aumento na exposição de fosfatidilserina

Com o intuito de avaliar a translocação de fosfatidilserina da camada interna para a camada externa da membrana plasmática, outro fenômeno que marca ativação celular, plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS sob controle virológico e controles foram marcadas para anexina V, uma proteína ligadora de fosfolípidos, cálcio-dependente, que se liga com alta especificidade à fosfatidilserina.

Observamos que as plaquetas isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS sob controle virológico exibem aumento da exposição de fosfatidilserina (% Anexina V)

quando comparadas a plaquetas de indivíduos controles [percentual de positividade = 7,15 (IQ 5,17 – 11,41) e 26,24 (IQ = 10,32 – 67,62) para controles e pacientes, respectivamente,  $p < 0,01$ ] (figura 8).

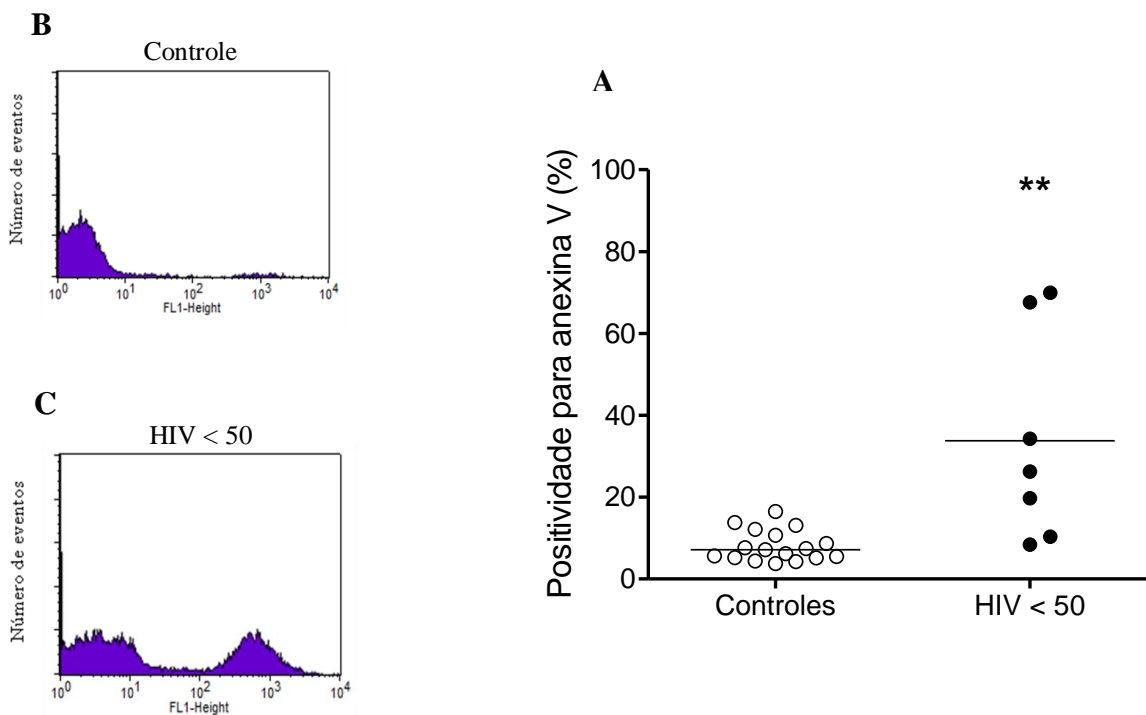


Figura 8: Aumento na exposição de fosfatidilserina plaquetária. (A) Percentual de positividade (%) para anexina V de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 17$ ) e de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 7$ ). (B) e (C): Histogramas representativos. (\*\*)  $p < 0.001$ , Student t Test.

Estes dados apontam que as plaquetas de indivíduos portadores de HIV/AIDS, mesmo com controle virológico, exibem um aumento significativo no grau de ativação celular.

## **4.2 Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico apresentam sinais de disfunção mitocondrial**

Com o intuito de investigar a função mitocondrial plaquetária, analisamos o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (superóxido mitocondrial) de plaquetas de pacientes e controles.

### **4.2.1 Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico apresentam diminuição acentuada do potencial de membrana mitocondrial**

Com o intuito de investigar o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) de pacientes portadores de HIV/AIDS e controles foram marcadas com a sonda fluorescente tetrametilrodamina etil éster (TMRE) e levadas para leitura através de citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur).

Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS e em uso de terapia antirretroviral (TARV) que atingiram supressão virológica (quantificação de carga viral por PCR para HIV-1 no sangue periférico menor que 50 cópias/mm<sup>3</sup>) apresentam diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) quando comparadas a plaquetas de indivíduos controles [intensidade média de fluorescência = 22,16 (IQ 19,05 – 28,07) e 11,59 (IQ 7,93 – 16,52), para controles e pacientes, respectivamente] (figura 9).

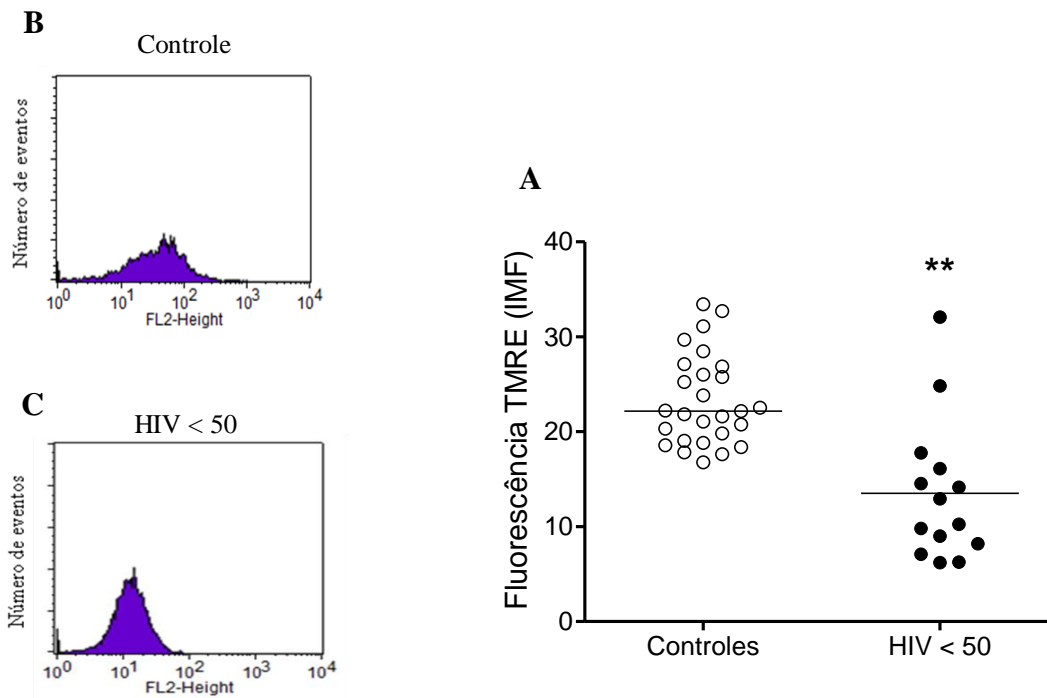


Figura 9: Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). (A) Intensidade média de fluorescência (IMF) para tetrametilrodamina etil éster (TMRE) de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 27$ ) e de pacientes com HIV/ AIDS sob controle virológico ( $n = 14$ ). (B) e (C): Histogramas representativos. (\*\*)  $p < 0.001$ , Student t Test.

#### 4.2.2 Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico apresentam aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Superóxido)

Para melhor caracterizar a disfunção mitocondrial plaquetária do paciente portador de HIV/AIDS avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio (superóxido) através da sonda fluorescente MitoSOX™ Red. Esta sonda biológica atravessa a membrana de células vivas e penetra seletivamente na mitocôndria. Ela é rapidamente oxidada por superóxido, mas não por outras espécies reativas de oxigênio ou espécies reativas de

nitrogênio. Após a oxidação a sonda se torna fluorescente e esta fluorescência é lida por citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur).

Pacientes infectados pelo HIV-1 e sob controle da replicação viral apresentam aumento na produção de superóxido mitocondrial quando comparados aos indivíduos não infectados [intensidade média de fluorescência = 9,39 (IQ 7,60 – 12,02) e 12,66 (IQ 10,12 – 25,24), para controles e pacientes, respectivamente] (figura 10).

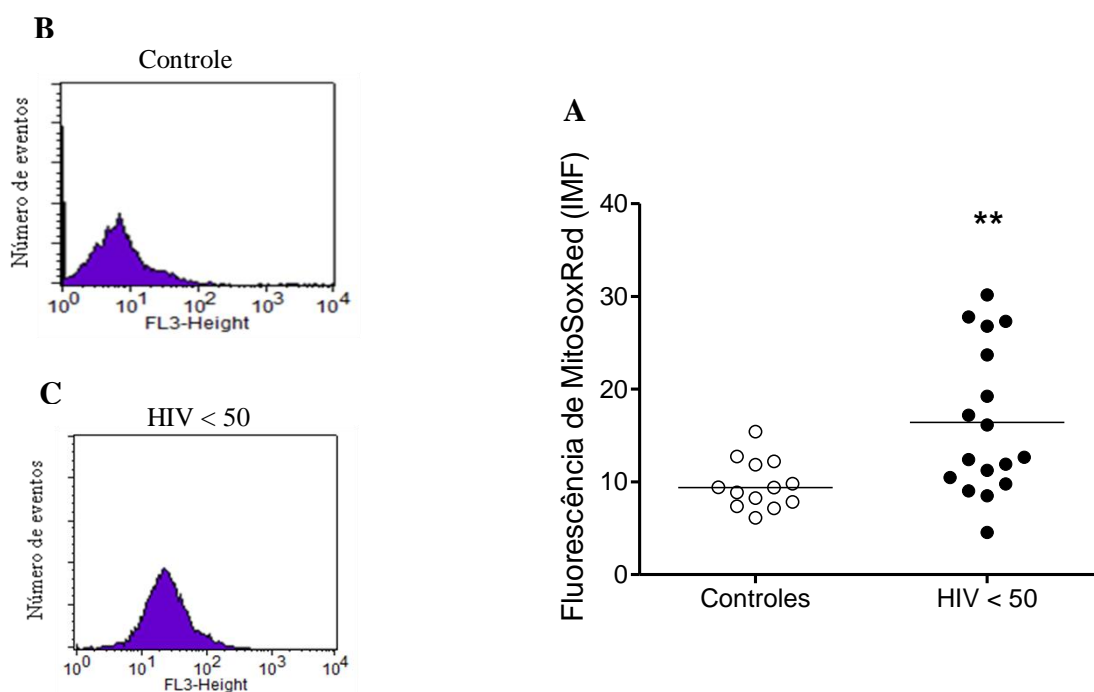


Figura 10: Análise da produção de superóxido mitocondrial. (A) Intensidade média de fluorescência (IMF) para MitoSoxRed de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 13$ ) e de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 17$ ). (B) e (C): Histogramas representativos. (\*\*)  $p < 0.01$ , Student t Test.

### 4.3 Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico apresentam aumento na ativação de Caspase 9

Tendo demonstrado disfunção mitocondrial, um importante sinal da via intrínseca de ativação de apoptose, procedemos a marcação para Caspase 9 (FAM FLICA™CASPASE-9) para melhor caracterizar este evento celular. Observamos que a plaqueta de indivíduos infectados pelo HIV-1 sob controle virológico exibe aumento significativo da expressão de Caspase 9 [intensidade média de fluorescência = 9,03 (IQ 8,1 – 11,14) e 12,91 (IQ 8,72 – 18,93), para controles e pacientes, respectivamente] (figura 11).

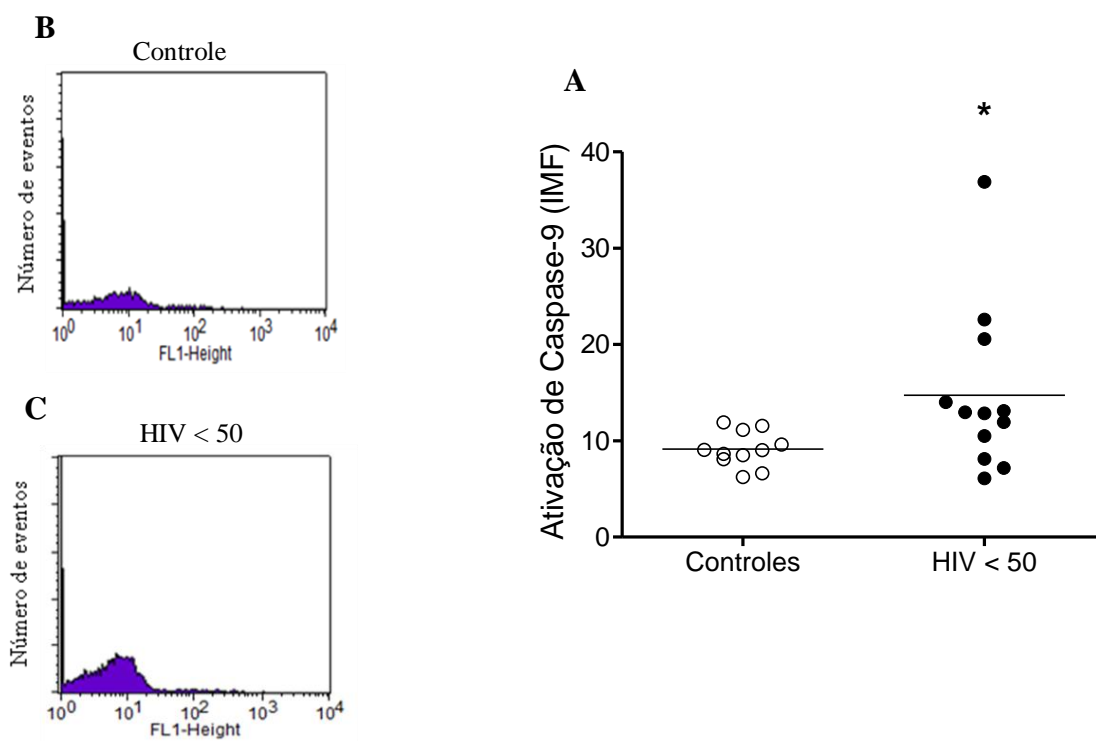


Figura 11: Aumento da ativação plaquetária de Caspase 9. (A) Intensidade média de fluorescência (IMF) para caspase 9 de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 11$ ) e de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 12$ ). (B) e (C): Histogramas representativos. (\*)  $p < 0.05$ ; Teste U: Mann Whitney Test;



#### **4.4 Plaquetas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico produzem mais óxido nítrico que plaquetas isoladas de indivíduos não infectados**

A infecção pelo HIV-1 está associada à disfunção endotelial mediada pela desregulação na produção de óxido nítrico (NO) (Baker et al, 2012). Com o intuito de avaliar a produção plaquetária de NO, utilizamos a sonda biológica DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato). A sonda biológica ganha o interior celular por difusão passiva e é desacetilada para formar DAF-FM, que ao reagir com NO produz um benzotriazol, capaz de emitir fluorescência.

Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS com controle virológico apresentam maior produção de NO quando comparada à produção de plaquetas controles [intensidade média de fluorescência = 11,82 (IQ 10,31 – 12,75) e 27,0 (IQ 17,93 – 34,62), para controles e pacientes, respectivamente,  $p < 0,01$ ] (figura 12).

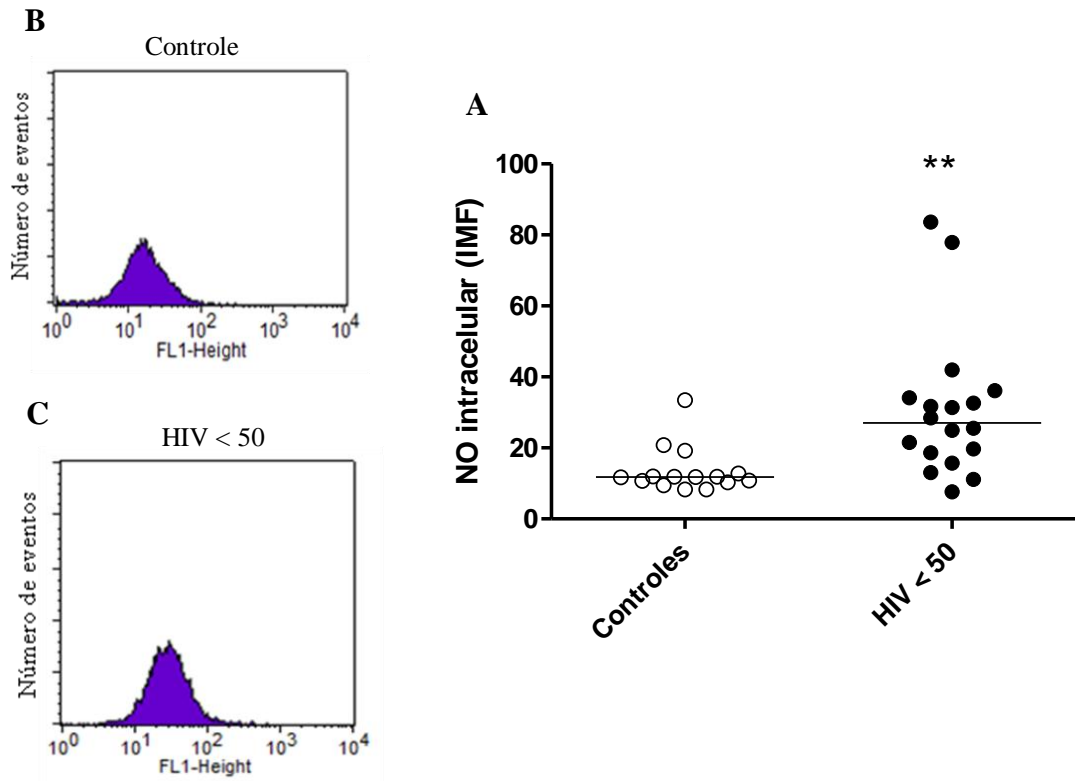


Figura 12: Aumento da produção intraplaquetária de óxido nítrico (NO). (A) Intensidade média de fluorescência (IMF) de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 15$ ) e de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 18$ ). (B) e (C), histogramas representativos. (\*\*)  $p < 0.001$ ; Teste U: Mann Whitney Test.

#### 4.5 Perfil de resposta plaquetária ao estímulo com trombina durante a infecção pelo HIV-1 em pacientes com controle virológico

Com o intuito de realizar um teste funcional nas plaquetas isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS em uso de TARV e com boa resposta clínica (carga viral para HIV-1 por PCR  $< 50$  cópias/mm<sup>3</sup>), estimulamos as plaquetas isoladas com trombina em diferentes concentrações (0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.2 U/ml e 0.4 U/ml), por um período de 15 minutos, e medimos a expressão de CD62-P por citometria de fluxo (BD FACScan

Excalibur). Observamos que as plaquetas isoladas de indivíduos com HIV/AIDS e sob controle virológico falham em equiparar a resposta de plaquetas de indivíduos controles, (figura 13).

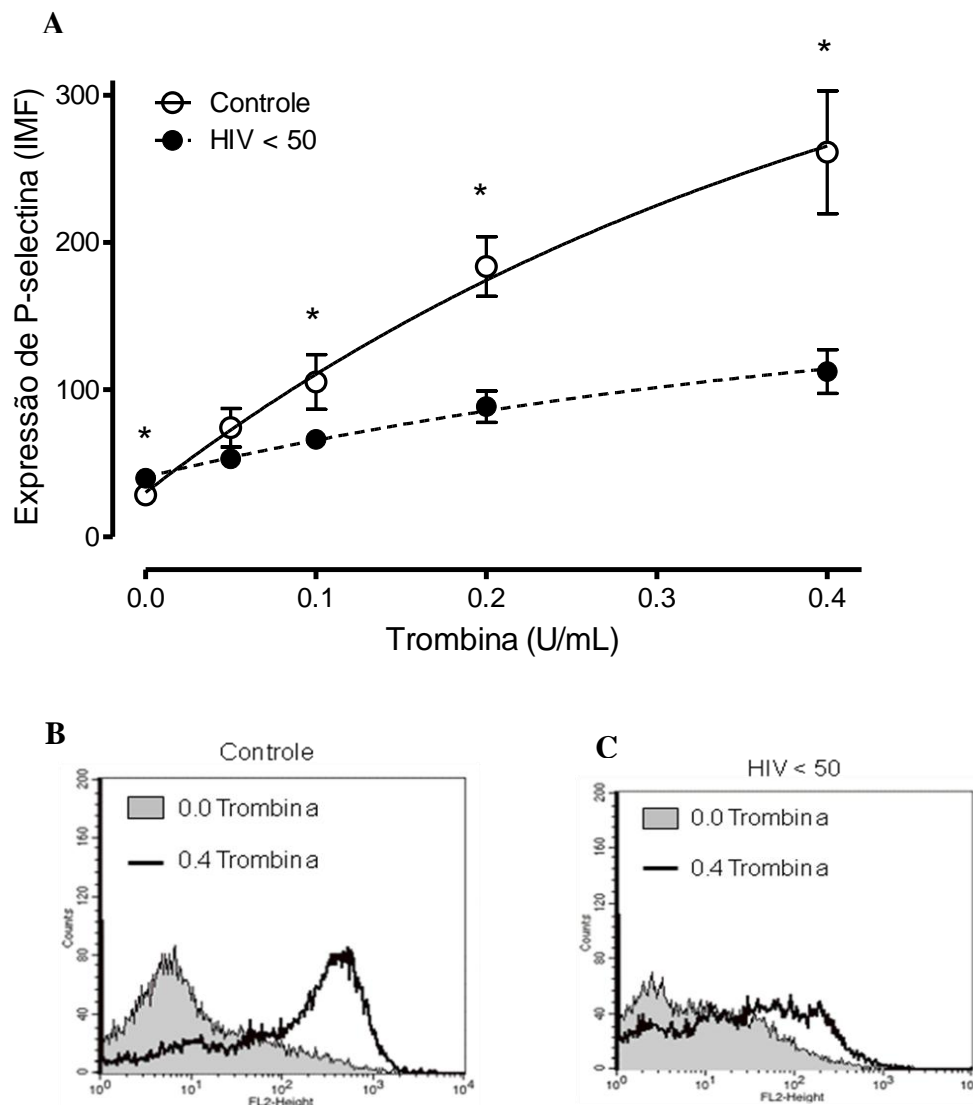


Figura 13: Resposta plaquetária ao estímulo com Trombina. Plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) de controles ( $n = 15$ ) e pacientes com HIV/ AIDS sob controle virológico ( $n = 10$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de trombina (0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.2 U/ml, 0.4 U/ml) por 15 minutos e em seguida marcadas para CD62-P (P-selectina). A: Curva dose resposta. B e C: Histogramas representativos. (\*)  $p < 0.01$ , Student t Test; (IMF) Intensidade Média de Fluorescência.

Tendo demonstrado aumento da ativação, disfunção mitocondrial, apoptose e perfil de resposta ao estímulo com trombina em plaquetas de pacientes portadores de HIV/AIDS com carga viral indetectável, procedemos à avaliação dos mesmos parâmetros em indivíduos portadores de HIV/AIDS sem controle virológico (carga viral para HIV-1 por PCR > 50 cópias/mm<sup>3</sup>).

#### **4.6 Aumento da ativação plaquetária em indivíduos portadores de HIV/AIDS sem controle virológico**

Assim como nos paciente portadores de HIV/AIDS com controle virológico, observamos aumento nos parâmetros de ativação celular nas plaquetas isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS sem controle virológico, quando comparadas aos indivíduos controles. Houve diferença tanto para P-selectina [intensidade média de fluorescência para CD62-P = 17,63 (IQ 13,1 – 19,8); 30,7 (IQ 16,66 – 49,20) e 37,9 (IQ 27,6 – 91,8) para controles, pacientes com controle virológico e sem controle virológico, respectivamente,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente] quanto para fosfatidilserina [percentual de positividade = 7,15 (IQ 5,17 – 11,41); 26,24 (IQ = 10,32 – 67,62) e 37,9 (IQ 26,6 – 91,8) para controles, pacientes com controle virológico e sem controle virológico, respectivamente,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente]. Não observamos diferenças significativas quando comparamos as duas populações de indivíduos portadores de HIV/AIDS (figuras 14 e 15).

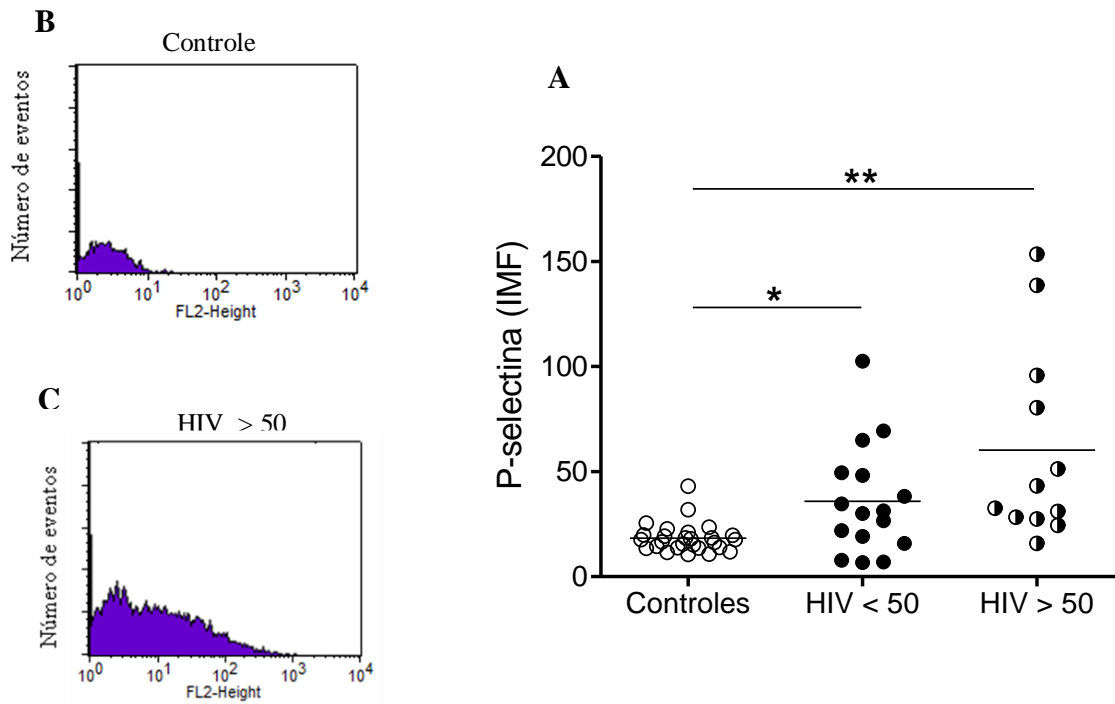


Figura 14: Expressão plaquetária de P-selectina. (A) Intensidade média de fluorescência (IMF) para P-selectina de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 27$ ), de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 16$ ) e sem controle virológico ( $n = 10$ ). (B) e (C): Histogramas representativos. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.05$ , Teste U: Mann Whitney Test.

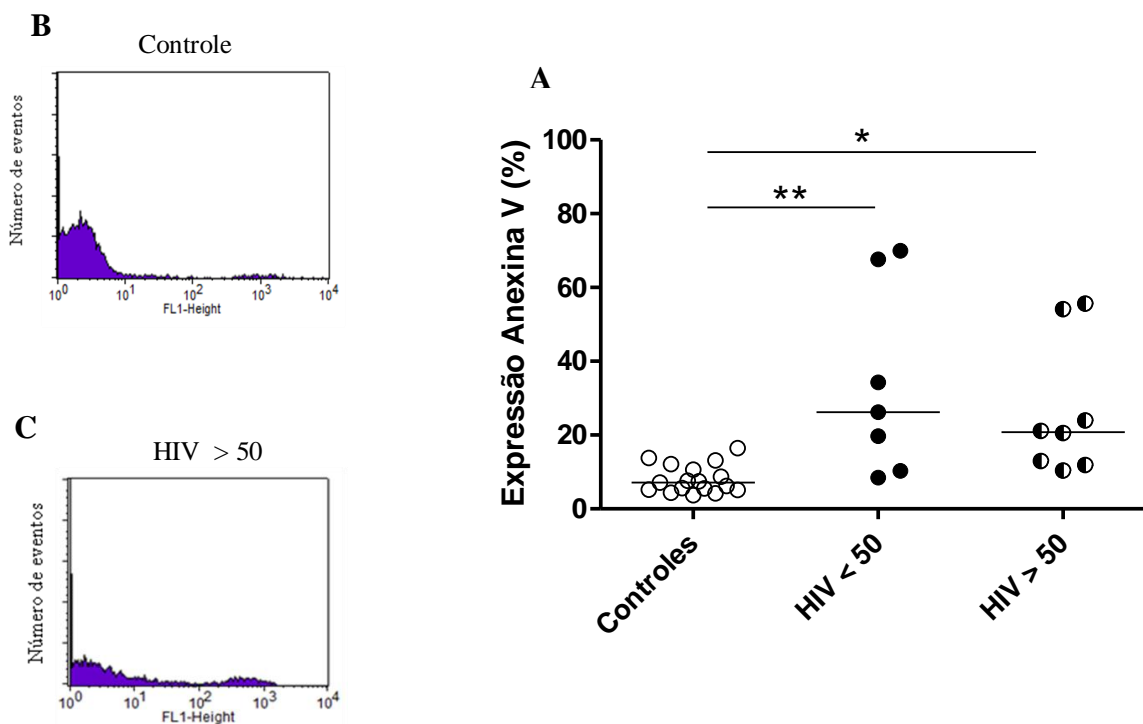


Figura 15: Aumento na exposição de fosfatidilserina plaquetária. (A) Percentual de positividade (%) para anexina V de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 17$ ), de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 7$ ) e sem controle virológico ( $n = 8$ ). (B) e (C): Histogramas representativos. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , Student t Test

#### 4.7 Plaquetas isoladas de indivíduos portadores de HIV/AIDS sem controle virológico apresentam aumento na produção de óxido nítrico

Assim como nos paciente portadores de HIV/AIDS com controle virológico, observamos aumento na produção de NO nas plaquetas isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS sem controle virológico, quando comparadas aos indivíduos controles [intensidade média de fluorescência = 11,82 (IQ 10,31 – 12,75); 27,0 (IQ 17,93 – 34,62) e

17,29 (IQ 14,45 – 27,9), para controles, pacientes com controle virológico e sem controle virológico, respectivamente,  $p < 0,01$  para ambas análises]. Não observamos diferenças significativas quando comparamos as duas populações de indivíduos portadores de HIV/AIDS (figuras 16).

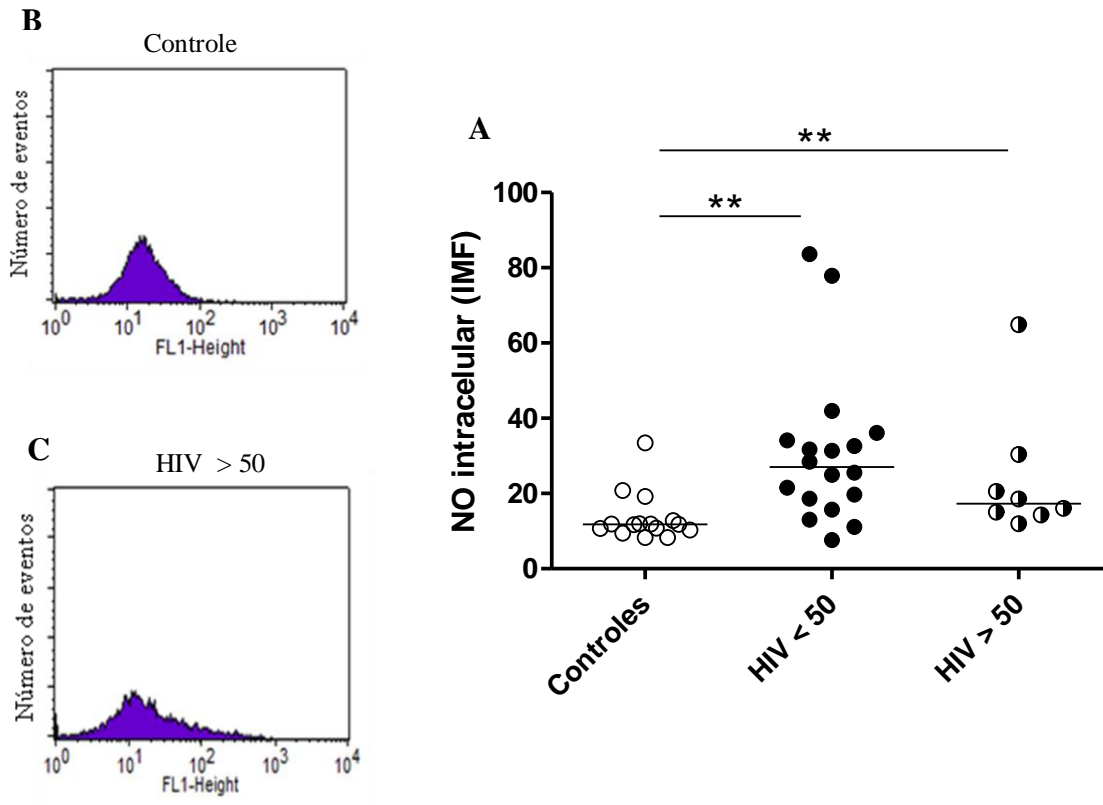


Figura 16: Aumento da produção intraplaquetária de óxido nítrico (NO). (A) Intensidade média de fluorescência (IMF) de plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) controles ( $n = 15$ ), de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico ( $n = 18$ ) e sem controle virológico ( $n = 8$ ). (B) e (C), histogramas representativos. (\*\*)  $p < 0.001$ ; Teste U: Mann Whitney Test.

#### **4.8 Perfil de resposta plaquetária ao estímulo com trombina durante a infecção pelo HIV-1 em pacientes sem controle virológico**

Com o intuito de caracterizar a resposta plaquetária ao estímulo com trombina em pacientes sem controle virológico (carga viral para HIV-1 por PCR > 50 cópias/mm<sup>3</sup>), estimulamos as plaquetas isoladas com trombina em diferentes concentrações (0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.2 U/ml, 0.4 U/ml), por um período de 15 minutos, e medimos a expressão de CD62-P por citometria de fluxo (BD FACScan Excalibur).

Observamos que as plaquetas isoladas de indivíduos com HIV/AIDS sem controle virológico falham em equiparar a resposta de plaquetas de indivíduos controles (figura 17). Não observamos diferença significativa entre as diferentes populações de indivíduos infectados.



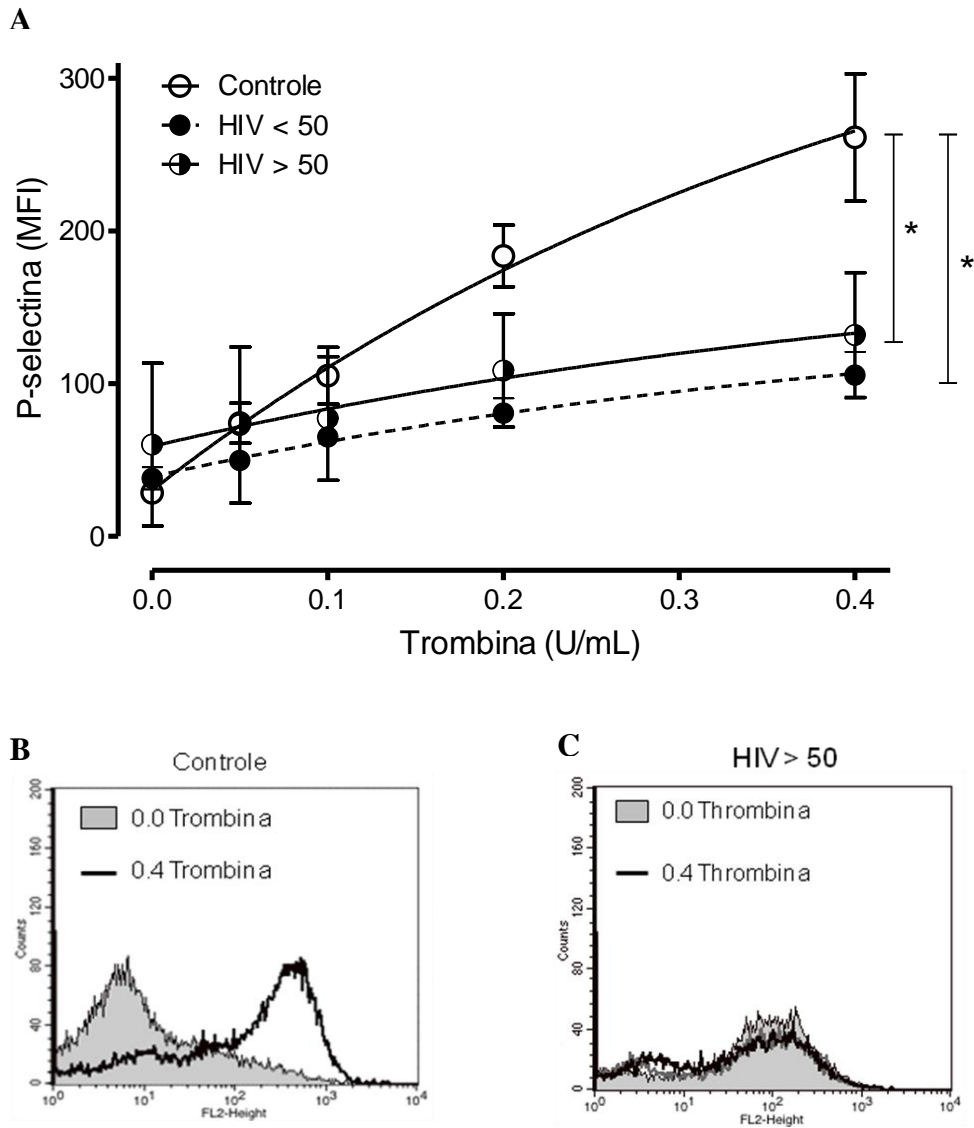


Figura 17. Resposta plaquetária ao estímulo com Trombina. Plaquetas ( $5 \times 10^6$ ) de controles ( $n = 15$ ), pacientes com HIV/ AIDS sob controle virológico ( $n = 10$ ) e sem controle virológico ( $n = 9$ ) foram estimuladas com diferentes concentrações de trombina (0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.2 U/ml, 0.4 U/ml), por 15 minutos, e em seguida marcadas para CD62-P (P-selectina). A: Curva resposta. B e C: Histogramas representativos. (\*)  $p < 0.01$ , Student t Test; (IMF) Intensidade Média de Fluorescência.

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliamos as características clínicas e laboratoriais de pacientes portadores de HIV/AIDS em acompanhamento no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ), de Janeiro de 2012 a Janeiro de 2013. Nosso objetivo foi avaliar a função plaquetária durante a infecção pelo HIV-1, especificamente o grau de ativação, disfunção mitocondrial, morte celular, produção de óxido nítrico e resposta a estímulos agonistas. Para tal, avaliamos 30 voluntários saudáveis e 33 pacientes infectados pelo HIV-1, sendo 18 pacientes portadores de HIV/AIDS com supressão virológica e 9 pacientes portadores de HIV/AIDS sem supressão virológica. Definimos supressão virológica quando a carga viral para o HIV-1 no sangue periférico era inferior a 50 cópias/mm<sup>3</sup>.

### 5.1 Ativação plaquetária durante a infecção pelo HIV-1

A exposição de P-selectina é um evento celular que marca ativação e secreção dos  $\alpha$ -grânulos plaquetários (Rendu *et al*, 2001). Aumento da ativação plaquetária tem sido descrita durante o curso da infecção por diversos agentes virais como adenovírus (Stone *et al*, 2007; Othman *et al*, 2007), Epstein-Barr vírus (EBV) (Ahmad e Menezes, 1997) e o vírus da hepatite C (HCV) (Zahn *et al*, 2006). Recentemente, Hottz *et al* (2011), demonstraram que a infecção pelo vírus do dengue, especificamente o subtipo 2 (DENV-2), é capaz de induzir a ativação plaquetária e morte celular, em um mecanismo dependente da ligação do vírus com a molécula DC-SIGN da superfície plaquetária.

Com o intuito de avaliar a ativação plaquetária na infecção pelo HIV-1 medimos a expressão de P-selectina (CD62-P) e a exposição de fosfatidilserina de pacientes e controles. Observamos que plaquetas isoladas de pacientes portadores de HIV/AIDS apresentam aumento na expressão de P-selectina (CD62-P) e na exposição de fosfatidilserina (% anexina-V), marcadores classicamente associados com ativação celular. Observamos este fenótipo nos dois grupos de pacientes infectados (pacientes com carga viral detectável e pacientes com carga viral indetectável), sugerindo que, diferentemente do que ocorre na infecção pelo DENV-2, a interação direta do HIV-1 com a plaqueta não

parece ser o principal mecanismo envolvido no aumento da ativação plaquetária. Assim como no nosso estudo, Mayne *et al* (2012) também observaram sinais de ativação plaquetária (P-selectina e micropartículas) em indivíduos portadores de HIV/AIDS, embora um diferente ponto de corte para classificar controle virológico tenha sido utilizado (carga viral para HIV-1 no sangue periférico  $< 400$  cópias/mm<sup>3</sup> para definição de controle virológico).

O mecanismo envolvido no aumento da ativação plaquetária durante a infecção pelo HIV-1 ainda não está completamente elucidado mas, possivelmente, envolve a translocação de produtos bacterianos, achado central da imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 (Brenchley *et al*, 2006). As plaquetas humanas expressam TLR4 (Andonegui *et al*, 2005), o receptor de LPS. Quando estimulado por LPS, TLR4 é capaz de provocar diversas alterações na fisiologia plaquetária como indução na transcrição de IL-1 $\beta$  (Shashkin *et al*, 2008), aumento na liberação de PAF (fator ativador de plaquetas) e sCD40L (Cognasse *et al*, 2008), e trombose vascular (Stark *et al*, 2012). Além da ativação por TLR4, a plaqueta também expressa TLR9 funcional, capaz de provocar ativação plaquetária, degranulação e trombose vascular (Panigrahi *et al*, 2013). Além disso, parâmetros de translocação bacteriana (sCD14 e sCD163 ) e de ativação crônica do sistema imune (HLA-DR e CD38) correlacionam-se com marcadores de ativação plaquetária (Mayne *et al*, 2012) e com desfechos clínicos (inflamação aórtica) nos portadores de HIV/AIDS (Subramanian *et al*, 2012). Embora a sinalização por TLR seja uma via de ativação plaquetária, o efeito de LPS na plaqueta humana em condições fisiológicas e patológicas ainda é controverso. De fato, Hashimoto *et al* (2009) demonstraram que o estímulo de TLR4 por LPS, com um  $\Delta t$  de 5 minutos, inibe diretamente a agregação plaquetária, a liberação de ADP pelos grânulos denso-plaquetários e a produção de micropartículas plaquetárias após estímulo com TRAP (peptídeo agonista do receptor de trombina).

Deste modo, demonstramos que a população de pacientes portadores de HIV/AIDS avaliada no presente estudo apresenta maior ativação plaquetária, demonstrada através da expressão de P-selectina e da exposição de fosfatidilserina, independentemente do controle da viremia atingida através da TARV. Provavelmente, a translocação bacteriana e o estado pró-inflamatório gerado no curso da doença representem o principal mecanismo envolvido

na gênese deste fenômeno, embora o efeito direto da interação do HIV-1 com a plaqueta também deva ser considerado.

## 5.2 Produção plaquetária de óxido nítrico durante a infecção pelo HIV-1

O óxido nítrico (NO) é uma molécula diatômica produzida a partir da enzima NO-sintase (NOS), expressa em diversos tipos celulares como células endoteliais, neurônios, plaquetas (Sase *et al*, 1995) e células do sistema imune. Diversas funções biológicas já foram atribuídas à esta molécula como relaxamento da musculatura lisa perivascular, inibição da agregação plaquetária, sinalização intercelular, inflamação e efeito bactericida (Bogdan *et al*, 2001; Freedman *et al*, 1997).

Recentemente, Baker *et al* (2012) demonstraram, a importância de NO na disfunção endotelial relacionada ao HIV/AIDS. Já descrita na população geral (Cooke, 2005), a dimetilarginina assimétrica (ADMA) é uma enzima inibidora da NO-sintase (NOS) e portanto um marcador indireto de deficiência de NO, que se mostrou significativamente elevada na infecção pelo HIV-1 (Baker *et al*, 2012).

A disfunção endotelial associada ao HIV-1 tem sido alvo crescente de diversos grupos de pesquisa na última década, em parte pelo novo perfil de complicações cardiovasculares que surge nesta população. Alguns estudos foram capazes de relacionar estado pró-inflamatório e a intensidade da translocação bacteriana (medida de LPS na circulação sanguínea) observados na infecção pelo HIV-1 com o grau de disfunção endotelial (Blodget *et al*, 2012). Quando se realiza o controle da replicação viral, através do uso regular de TARV, é possível, em alguns cenários clínicos, alcançar reversão parcial da disfunção endotelial (Baker *et al*, 2012).

No presente trabalho utilizamos a sonda fluorescente tetrametilrodamina etil éster (TMRE) para medir a produção plaquetária de NO. Observamos que, independentemente do controle da replicação atingida com o uso da TARV, a plaqueta dos dois grupos de pacientes infectados expressam um aumento significativo na produção de NO, quando comparamos com a produção de NO da plaqueta controle. Demonstramos assim, simultaneamente, aumento no estado de ativação da plaqueta (figura 7 e 8) e aumento na produção de NO. Embora classicamente o NO seja um agente inibidor da ativação e

agregação plaquetária (Freedman *et al*, 1997; Radomski *et al*, 1990), novos trabalhos sugerem que a sinalização plaquetária exercida pelo NO siga um padrão bifásico (Marjanovic *et al*, 2005).

Sob estímulo com concentrações baixas de trombina, a produção de NO pela NOS3 (isoforma 3 da óxido nítrico sintase, a isoforma mais importante na produção de NO plaquetário. Sase *et al*, 1995) ativa a via de sinalização dependente de cGMP (monofosfato de guanosina cíclico), que culminará com a degranulação plaquetária (ativação) (Marjanovic *et al*, 2005).

Desta forma, provavelmente o aumento na produção de NO plaquetário que observamos nos indivíduos portadores de HIV/AIDS acompanhados no IPEC/FIOCRUZ venha da ativação de NOS3, cGMP e PKG (proteína kinase dependente de cGMP), que simultaneamente induz a degranulação e ativação plaquetária (Marjanovic *et al*, 2005). Futuros estudos são necessários para elucidar o papel do NO de origem plaquetária na disfunção endotelial associada ao HIV-1.

### **5.3 Disfunção mitocondrial e morte celular por apoptose durante a infecção pelo HIV-1**

O envolvimento da mitocôndria na regulação da ativação plaquetária e no controle da morte celular por apoptose tem se tornado evidente (Reed e Kroemer, 2000; Matarrese *et al*, 2009). A despolarização do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) tem sido descrita em plaquetas durante a estocagem e/ou ativação por certos agonistas como trombina ou o ionóforo de cálcio A23187, sendo associada com ativação da via intrínseca de apoptose, demonstrada por aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bid, Bax e Bak, ativação de caspase-3 e exposição de fosfatidilserina (Verhoeven *et al*, 2005; Leytin *et al*, 2006; Lopez 2008).

Diversos agentes virais estão associados com disfunção mitocondrial e morte celular por apoptose. Alguns destes agentes virais são capazes de induzir diretamente a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP), como o vírus da hepatite B (HBV), através da proteína HBx (Su e Schneider, 1997), o vírus da hepatite C (HCV) (Deng *et al*, 2008), o vírus linfotrófico T humano (HTLV) (Hiraragi *et al*, 2005) e o papiloma vírus

humano (HPV) (Raj *et al*, 2004). No presente trabalho, com o intuito de minimizar o efeito confundidor que estes agentes poderiam gerar na caracterização da disfunção mitocondrial plaquetária, excluimos os pacientes portadores de HBV, HCV e HTLV.

O HIV-1 é capaz de induzir apoptose em diversos tipos celulares. A proteína viral R (Vpr) do HIV-1 está associada com a morte celular de neurônios (Guha *et al*, 20012), linfócitos (Arokium *et al*, 2009) e monócitos (Stewart *et al*, 1997). Tat e Env também são capazes de induzir lesão neuronal (Aprea *et al*, 2006; Perry *et al*, 2005) e apoptose em linfócitos (Zuli *et al*, 1995; Castedo *et al*, 2001; Perfettini *et al*, 2004). Até o momento, função mitocondrial e apoptose ainda não haviam sido caracterizadas na plaqueta de indivíduos portadores de HIV/AIDS.

No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez que a plaqueta de indivíduos infectados pelo HIV-1 exibe sinais claros de apoptose (exposição de fosfatidilserina, diminuição do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), produção de superóxido mitocondrial e ativação de caspase 9). Estes achados mostraram-se presentes mesmo com o controle da replicação viral atingida com o uso regular de TARV. Nos pacientes sem controle virológico devido a falha virológica, má adesão ou abandono do tratamento, conseguimos identificar de forma significativa apenas a exposição de fosfatidilserina, provavelmente devido ao reduzido número de indivíduos deste grupo.

Este achado pode representar novo mecanismo envolvido na trombocitopenia associada ao HIV-1 e no nosso estudo identificamos plaquetopenia significativa quando comparamos o grupo de pacientes sem controle virológico e controles ( $p < 0,05$ ). Os mecanismos envolvidos na disfunção hematológica ainda não estão completamente elucidados e parecem diferir nos diferentes momentos da infecção. Inicialmente, os fenômenos auto-imunes, com a geração de auto-anticorpos tendem a prevalecer. Wang *et al* (2011) identificaram que Tat é capaz de ativar diretamente as plaquetas humanas em um processo que culmina com a liberação de CD154 (CD40L) e que o CD40L liberado no meio é capaz de ativar células B a produzirem auto-anticorpos contra plaquetas (Wang *et al*, 2011). Tardiamente na infecção pelo HIV-1, a falência na plaquetopoiese parece predominar (Passos, 2010).

De maneira geral, observamos que a plaqueta de pacientes portadores de HIV/AIDS, independentemente do controle da replicação viral atingida através da TARV,

apresenta sinais típicos de morte celular pela via intrínseca de apoptose. Este mecanismo ainda não havia sido descrito e pode ser um mecanismo importante na gênese da disfunção hematológica/plaquetopenia associada à progressão da infecção pelo HIV-1 para AIDS.

#### **5.4 Alterações da fisiologia plaquetária em pacientes portadores de HIV/AIDS**

Além de sua função clássica na hemostasia, as plaquetas são parte do sistema de defesa do hospedeiro (Youssefian *et al*, 2002). Durante a infecção pelo HIV-1, a plaqueta desempenha importantes medidas de controle viral como endocitose e inativação de partículas virais (Boukor *et al*, 2006), e modulação da rede de citocinas, com liberação de CXCL4 (Auerbach *et al*, 2012).

Contudo, a interação plaqueta-HIV é bidirecional, ou seja, provoca alterações no ciclo de vida do vírus e também na fisiologia plaquetária, como um aumento do volume plaquetário (Mena *et al*, 2011), aumento da ativação, expressão de fator tissular e de micropartículas plaquetárias (PMPs) (Mayne *et al*, 2012), assim como aumento na produção de quimiocinas como CCL5 (Holme *et al*, 1998).

No presente trabalho, com o intuito de testar a ativação plaquetária frente a um estímulo agonista, incubamos a plaqueta de indivíduos infectados e controles com diferentes concentrações de trombina. Observamos que a plaqueta de indivíduos portadores de HIV/AIDS apresentam menor indução da expressão de P-selectina pelo estímulo com trombina quando comparada à resposta da plaqueta de indivíduos controles. Observamos esta disfunção tanto em pacientes portadores de HIV/AIDS com controle virológico quanto em pacientes portadores de HIV/AIDS sem controle virológico.

Este dado sugere que a plaqueta de indivíduos portadores de HIV/AIDS, embora esteja mais ativada (figuras 7 e 8), não é capaz de igualar a resposta de plaquetas controles frente a um novo estímulo agonista (trombina). Este dado é suportado por Holme *et al* (1998). Estes autores observaram uma produção plaquetária basal de CCL5 mais elevada nos pacientes portadores de HIV/AIDS e também uma falha destas células em igualar a produção de CCL5 de controles, após estímulo com SFLLRN (fragmento n-terminal do receptor de trombina). Nossos dados corroboram o estado de “exaustão plaquetária” observados por Holme *et al* (1998), sugerindo que durante a patogênese da AIDS exista um

mecanismo impedindo a degranulação plaquetária ou causando a degranulação permanente das plaquetas circulantes.

## 5.5 Limitações

Este estudo apresenta algumas limitações. Entre estas, o tamanho amostral pequeno, especialmente no grupo de pacientes sem controle virológico ( $n = 9$ ), o que limita a aferição de efeitos com frequência reduzida.

O uso de antirretrovirais também pode alterar a função plaquetária (Hentig *et al*, 2008; Satchell *et al*, 2011; Chini *et al*, 2012) e representa um fator confundidor importante no presente estudo. Pretendemos avaliar os mesmos parâmetros de função plaquetária em pacientes virgem de TARV. Não houve, contudo, predomínio significativo de nenhum esquema de TARV no presente estudo, que evidentemente ficou sob decisão do médico assistente do paciente.

Notamos diferença significativa entre a mediana das idades dos grupos de pacientes infectados analisados e a idade dos controles ( $p < 0,05$ ). Não acreditamos, contudo, que a idade isoladamente seja um fator associado à disfunção plaquetária (Mayne *et al*, 2012). No entanto, pretendemos incluir novos voluntários para parear os grupos por idade.

Utilizamos a citometria de fluxo como ferramenta de aferição dos dados relativos ao fenótipo e à função plaquetária, ferramenta esta que pretendemos complementar com técnicas como ELISA e western blot.

A característica monocêntrica limita a capacidade de generalização dos nossos dados, embora seja importante para a caracterização da coorte de pacientes do IPEC/FIOCRUZ.



## **5.6 Considerações finais**

A cronificação da infecção pelo HIV-1 está associada a um aumento nas complicações não relacionadas com a imunodeficiência, especialmente complicações cardiovasculares. O mecanismo envolvido nestas complicações ainda não está completamente elucidado, mas aponta a disfunção plaquetária como importante personagem.

No presente trabalho descrevemos características clínicas e laboratoriais de pacientes portadores de HIV/AIDS em acompanhamento no IPEC/FIOCRUZ. Fomos capazes de identificar diversas alterações fenotípicas e funcionais da plaqueta destes indivíduos, caracterizando, pela primeira vez, morte celular através da via intrínseca de apoptose na plaqueta humana.

Acreditamos que nossos achados podem ajudar a entender melhor a patogênese da infecção pelo HIV-1, assim como a gênese das complicações cardiovasculares, onde a plaqueta tem papel central.

## 6. PERSPECTIVAS

Pretendemos estender a caracterização da função plaquetária, nos moldes utilizados no presente estudo, para o grupo de pacientes não expostos à terapia antirretroviral. Esta abordagem visa subtrair o potencial efeito confundidor da terapia antirretroviral sobre os parâmetros de disfunção plaquetária analisados.

Com o intuito de complementar a demonstração da apoptose plaquetária aplicaremos a técnica de Western Blot (WB) no lisado celular estocado durante a realização do presente estudo. Através desta, mediremos a ativação de caspase 9 (demonstrada no presente estudo) e caspase 3 (caspase efetora).

Para investigar se existe correlação entre os parâmetros de disfunção plaquetária observados e marcadores de inflamação, pretendemos dosar PCRt, IL-6, D-dímero, LPS e glutamato no plasma armazenado durante a realização do estudo.

Pretendemos aprofundar a caracterização do fenômeno de exaustão plaquetária observado no presente trabalho medindo tromboxano A2 (TXA2) no sobrenadante de plaquetas estimuladas com trombina. Diferentemente do CD62P, que está armazenado nos grânulos alfa, o TXA2 necessita que a capacidade de síntese da plaqueta esteja preservada.

A ausência de trombocitopenia significativa nos pacientes com controle virológico e disfunção plaquetária será investigada, inicialmente, com a dosagem de trombopoetina no plasma estocado durante a realização do presente trabalho.

A elucidação do mecanismo envolvido nas alterações encontradas deverá ser abordada por nosso grupo. Ensaios in vitro de infecção plaquetária pelo HIV-1 são um desdobramento natural do presente estudo. Pretendemos avaliar a importância da “via plaquetária” de infecção de outros tipos celulares bem como avaliar o papel da apoptose plaquetária na imunopatogênese da infecção pelo HIV-1.

## 7. CONCLUSÃO

- A) Observamos que a plaqueta dos dois grupos de pacientes portadores de HIV/AIDS analisados (com controle virológico e sem controle virológico) exibe um perfil de ativação (expressão de P-selectina e exposição de fosfatidilserina) quando comparada a plaqueta de indivíduos controles;
- B) Observamos que a plaqueta de indivíduos portadores de HIV/AIDS sob controle virológico exibe sinais de disfunção mitocondrial e apoptose (diminuição do potencial de membrana mitocondrial, aumento na produção de superóxido mitocondrial, exposição de fosfatidilserina e ativação de caspase 9);
- C) Observamos que a plaqueta dos dois grupos de pacientes portadores de HIV/AIDS analisados (com controle virológico e sem controle virológico) exibem um aumento na produção de óxido nítrico (NO);
- D) Observamos que a plaqueta dos dois grupos de pacientes portadores de HIV/AIDS analisados (com controle virológico e sem controle virológico) são menos sensíveis ao estímulo com trombina (agonista) de que a plaqueta de indivíduos saudáveis.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott A, Brumfiel G. Nobel for AIDS virus discovery, finally. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):712-3.

Ahmad R, Menezes J, Knafo L, Ahmad A. Activated human platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells. *J Leukoc. Biol*. 2001;69(1):123-28.

Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005;106(7):2417-23.

Andrade ACO, Cotter BR. Endothelial Function and Cardiovascular Diseases in HIV Infected Patient. *Braz J Infect Dis* 2006;10(2):139-145.

Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008 Jan;214(2):231-41.

Armah KA, McGinnis K, Baker J, Gibert C, Butt AA, Bryant KJ, et al. HIV status, burden of comorbid disease, and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. *Clin Infect Dis*. 2012;55(1):126-36.

Arokium H, Kamata M, Chen I. Virion-Associated Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Triggers Activation of Apoptotic Events and Enhances Fas-Induced Apoptosis in Human T Cells. *J Virol*. 2009;83(21):11283-97 .

Auerbach DJ, Lin Y, Miao H, Cimbro R, Difiore MJ, Gianolini ME, et al. Identification of the platelet-derived chemokine CXCL4/PF-4 as a broad-spectrum HIV-1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9569-74.

Baker JV, Lundgren JD. Cardiovascular implications from untreated human immunodeficiency virus infection. *Eur Heart J*. 2011;32(8):945-51.

Baker JV, Neuhaus J, Duprez D, Freiberg M, Bernardino JI, Badley AD, et al. HIV replication, inflammation, and the effect of starting antiretroviral therapy on plasma asymmetric dimethylarginine, a novel marker of endothelial dysfunction. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;60(2):128-34.

Baker JV, Neuhaus J, Duprez D, Kuller LH, Tracy R, Belloso WH, et al. 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;56(1):36-43.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868-71.

Bartlett JG. The Johns Hopkins Hospital 2002 Guide to Medical Care of Patients with HIV Infection. Lippincott William and Wilkis. Philadelphia.2002

Berndt C, Mo B, Angermu"ller S, Gierschik P, Krammer PH. CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD41 T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95(21): 12556-61.

Bernal E, Saban J, Munoz A, Marin I, Garcia-Medina A, Vicente T. Hyper-inflammation and Endothelial Activation in HIV Infected Patients with Detectable and Undetectable Viral Load. J AIDS Clinic Res. 2012;3(6): 3-6.

Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. Blood Rev. 2009;23(4):177-89.

Blodget E, Shen C, Aldrovandi G, Rollie A, Gupta SK, Stein JH, et al. Relationship between microbial translocation and endothelial function in HIV infected patients. PLoS One. 2012;7(8):e42624.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol. 2001 Oct;2(10):907-16.

Boukour S, Masse JM, Benit L, Dubart-Kupperschmitt A, Cramer EM. Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes. J Thromb Haemost. 2006;4(2):426-35.

Bozza FA, Weyrich AS. Mitochondria push platelets past their prime. Blood. 2008; 111(5):2496-97.

Bozza FA, Shah AM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;40(2):123-34.

Brass L. Understanding and Evaluating Platelet Function. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010;2010:387-96.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med. 2006 Dec;12(12):1365-71.

Cantor AB. Death-defying apoptotic caspases in thrombopoiesis. Blood. 2012;119(18):4098-9.

CDC. Classification system for human T-lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus infection. MMWR;35:334-339.

CDC. Revised Classification system for HIV infection and expanded surveillance of definition for AIDS among adolescent and aults. MMWR.1992;41:1-19.

Chan LG, Kandiah N, Chua A. HIV-associated neurocognitive disorders (HAND) in a South Asian population - contextual application of the 2007 criteria. *BMJ Open*. 2012;2(1):1-6.

Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, et al. DC-SIGN and CLEC-2 Mediate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capture by Platelets. *J. Virol*. 2006;80(18):8951-60.

Chia WK, Blanchette V, Mody M, Wright JF, Freedman J. Characterization of HIV-1-specific antibodies and HIV-1-crossreactive antibodies to platelets in HIV-1-infected haemophiliac patients. *Br J Haematol*. 1998;103(4):1014-22.

Chiu IM, Yaniv A, Dahlberg JE, Gazit A, Skuntz SF, Tronick SR, et al. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature*. 1985 Sep 26-Oct 2;317(6035):366-8.

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007 Apr;13(4):463-9.

Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol*. 2008;141(1):84-91.

Cohen AJ, Fauci AS. Pathogenesis and Medical Aspects of HIV-1 Infection. In Knipe, D.M.; Howley, P.M. In *Fields Virology*, 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1656-1698, 2001.

Collman R, Godfrey B, Cutilli J, Rhodes A, Hassan NF, Sweet R, et al. Macrophage-Tropic Strains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Utilize the CD4 Receptor. *J. Virol*. 1990;64(9):4468-4476

Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med*. 2005 Jul;10 Suppl 1:S11-7.

Crum-Cianflone NF, Weekes J, Bavaro M. Review: thromboses among HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era. *AIDS Patient Care STDS*. 2008;22(10):771-8.

Currier JS, Taylor A, Boyd F, Dezii CM, Kawabata H, Burtcel B, et al. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;33(4):506-12.

Davi G, Patrono C. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007;357(24):2482-94.

Deeks SG, Walker BD. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity*. 2007; 27(3): 406-16.

Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med*. 2011;62:141-55.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):661-6.

Dore GJ, Li Y, McDonald A, Ree H, Kaldor JM. Impact of highly active antiretroviral therapy on individual AIDS-defining illness incidence and survival in Australia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Apr 1;29(4):388-95.

Durand M, Sheehy O, Baril JG, Leloir J, Tremblay CL. Association Between HIV Infection, Antiretroviral Therapy, and Risk of Acute Myocardial Infarction: A Cohort and Nested Case–Control Study Using Quebec’s Public Health Insurance Database. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; 57(3): 245-53.

Elstad MR, La Pine TR, Cowley FS, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, et al. P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes. *J Immunol*. 1995; 155(4):2109-22.

Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity: A Communication Link between Innate and Adaptive Immune Compartments. *Immunity*, 2003; 19(1): 9–19.

Esmon CT, Xu J, Lupu F. Innate Immunity and Coagulation. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(1): 182-188.

Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Esté JA, Kroemer G. Mitochondrial Control of Cell Death Induced by HIV-1-Encoded Proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;926:149-64.

Flaujac C, Boukour S, Borde EC. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. *Cell. Mol. Life Sci*. 2010; 67(4):545–56.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996 May 10; 272(5263):872-7.

Franklin DZ, Seremetis S, Zheng ZY. Internalization of Human Immunodeficiency Virus Type I and Other Retroviruses by Megakaryocytes and Platelets. *Blood*, 1990; 75 (10):1920-23.

Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney Jr. JF, Michelson AD. Nitric Oxide Released from Activated Platelets Inhibits Platelet Recruitment. *J. Clin. Invest*. 1997;100(2): 350-56.

Friis-Møller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio Monforte A, El-Sadr WM, Reiss P, et al. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 Nov 20;349(21):1993-2003.

Funderburg NT, Mayne E, Sieg SF, Asaad R, Jiang W, Kalinowska M, et al. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation. *BLOOD*, 2010;115(2): 161-67.

Gallo RC, Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2283-5.

Galluzzi L., Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. *Plos Pathol* 2008 May 30;4(5):e1000018

Grinspoon SK, Grunfeld C, Kotler DP, Currier JS, Lundgren JD, Dubé MP, et al. State of the Science Conference Initiative to Decrease Cardiovascular Risk and Increase Quality of Care for Patients Living With HIV/AIDS. *Circulation* 2008, 118(2):198-210

Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* (2012) 33(4):397–411.

Hashimoto K, Jayachandran M, Owen WG, Miller VM. Aggregation and Microparticle Production Through Toll-like Receptor 4 Activation in Platelets From Recently Menopausal Women. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;54(1):57–62.

Hentig NV, Forste AK, Kuczka K, Klinkhardt U, Klauke S, Gute P, et al. Platelet–leucocyte adhesion markers before and after the initiation of antiretroviral therapy with HIV protease inhibitors. *JAC* .2008; 62 (5): 1118–21.

HIV-CAUSA Collaboration. The effect of efavirenz versus nevirapine-containing regimens on immunologic, virologic and clinical outcomes in a prospective observational study. *AIDS*. 2012;26(13):1691-705.

Holme P, Muller F, Solum NO, Brosstad F, Froland SS, Aukrust P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FASEB J*. 1998; 12(1): 79–90.

Hogg R, Lima V, Sterne JA, Grabar S, Battegay M, D'Arminio Monforte A, et al. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* 2008;372(9635):293-9.

Hottz ED. Caracterização da Interação entre Vírus da Dengue e Plaquetas Humanas: Ativação Plaquetária, Função Mitocondrial e Secreção de Citocinas. Rio de Janeiro; 2010. Dissertação [Mestre em Ciências em Medicina Tropical] – Instituto Oswaldo Cruz.



Hsue PY, Scherzer R, Grunfeld C, Nordstrom SM, Schnell A, Kohl LP, et al. HIV infection is associated with decreased thrombin generation. *Clin Infect Dis*. 2012;54(8):1196-203.

Hunt PW. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012;9(2):139-47.

Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, Marchese P, Castro MG, Lowenstein PR, et al. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat Med*. 2005; 11(11):1167-69.

Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, Ferri KF, Vieira HLA, Zamzami N, et al. The HIV-1 Viral Protein R Induces Apoptosis via a Direct Effect on the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *JEM*. 2000;191(1): 33-45.

Jayachandran M, Miller VM, BrunnGJ, Owen WG. Platelet Response as a Sentinel Marker of Toll-like Receptor 4 Activation in Mice. *Thromb Res*. 2010; 126(5): 414-17.

Johnson RP. How HIV guts the immune system. *N Engl J Med*. 2008 May 22;358(21):2287-9.

Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 2012 report on the global AIDS epidemic. Available at: [http://data.unaids.org/pub/Report/2012/JC1700\\_Epi\\_Update\\_2012\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2012/JC1700_Epi_Update_2012_en.pdf).

Kalayjian RC, Machekano RN, Rizk N, Robbins GK, Gandhi RT, Rodriguez BA, et al. Pretreatment levels of soluble cellular receptors and interleukin-6 are associated with HIV disease progression in subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2010;201(12):1796-805.

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.

Letendre S. Central Nervous System Complications in HIV Disease:HIV-Associated Neurocognitive Disorder. 2011;19(4):137-42

Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Bood Rev*. 2012;26(2):51-63

Lewden C, Chene G, Morlat P, Raffi F, Dupon M, Dellamonica P, et al. HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm<sup>3</sup> on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007 Sep 1;46(1):72-7.

Li Z, Yang F, Dunn S, Gross AK, Smyth SS. Platelets as immune mediators: Their role in host defenses responses and sepsis. *Thromb Res*. 2011 March ; 127(3): 184-188

Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 synthesis. *J Cell Biol.* 2001;154(3):485-90.

Loeff MFS, Awasana AA, Njie RS, Sande MV, Jaye A, Sabally S. Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent epidemic trends of HIV-1 and HIV-2. *Int J Epidemiol* 2006;35(5):1322–1328.

Marjanovic JA, Li Z, Stojanovic A, Du X. Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *J Biol Chem.* 2005 Nov 11;280(45):37430-8.

Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell.* 2007;128(6):1173-86.

Matarrese P, Straface E, Palumbo G, Anselmi M, Gambardella L, Ascione B, et al. Mitochondria regulate platelet metamorphosis induced by opsonized zymosan A activation and long-term commitment to cell death. *FEBS Journal*, 2009; 276: 845-856.

Mayne E, Funderburg NT, Sieg SF, Asaad R, Kalinowska M, Rodriguez B, et al. Increased platelet and microparticle activation in HIV infection: upregulation of P-selectin and tissue factor expression. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;59(4):340-6

Matijevic N, Wu KK, Howard AG, Wasserman B, Wang WYW, Folsom AR, et al. Association of Blood Monocyte and Platelet Markers with Carotid Artery Characteristics: The Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Cerebrovasc Dis* 2011;31(6):552–58.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004 Sep 20;200(6):761-70.

Mena A, Meijide H, Vazquez P, Castro A, Lopez S, Bello L, et al. HIV increases mean platelet volume during asymptomatic HIV infection in treatment-naive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;57(5):112-3.

Metcalf Pate KA, Mankowski JL. HIV and SIV associated thrombocytopenia: an expanding role for platelets in the pathogenesis of HIV. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2011;8(1-2):25-32.

Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico – AIDS / DST – Ano VII nº1. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília, DF, 2010.

Moller NF, Sabin CA, Weber R, Monforte AD, El-Sadr WM, Reiss P, et al. Combination Antiretroviral Therapy and the Risk of Myocardial Infarction *N Engl J Med.* 2003;349(21):1993-2003.

Morrell C, Sun H, Ikeda M, Beique JC, Swaim AM, Mason E, et al. Glutamate mediates platelet activation through the AMPA receptor. *JEM*. 2008;205(3): 575-84.

Morrell CN. Exciting times for life without a nucleus: broad roles for platelets in vascular inflammation. *ddmec*. 2011;8:1-2.

Nardi M, Tomlinson S, Greco MA, Karpatkin S. Complement-Independent, Peroxide-Induced Antibody Lysis of Platelets in HIV-1-Related Immune Thrombocytopenia. *Cell*. 2001;106(5):551-61

Nolan D, Watts GF, Herrmann SE, French MA, John M, Mallal S. Endothelial function in HIV-infected patients receiving protease inhibitor therapy: does immune competence affect cardiovascular risk?. *Q J Med*. 2003;96 (11):825-32.

Pacheco AG, Tuboi SH, May SB, Moreira LF, Ramadas L, Nunes EP, et al. Temporal changes in causes of death among HIV-infected patients in the HAART era in Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;51(5):624-30.

Passos AM, Treitinger A, Spada C. An overview of the mechanisms of HIV-related thrombocytopenia. *Acta Haematol*. 2010;124(1):13-8.

Patella FJ, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Broot JT, et al. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 Sep;43(1):27-

Panigrahi S, Ma Y, Hong L, Gao D, West XZ, Salomon RG, et al. Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis. *Circ Res*. 2013 Jan 4;112(1):103-12.

Perry SW, Norman JP, Litzburg A, Zhang D, Dewhurst S, Gelbard HA. HIV-1 Transactivator of Transcription Protein Induces Mitochondrial Hyperpolarization and Synaptic Stress Leading to Apoptosis 1. *J Immunol* 2005; 174 (7):4333-44.

Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):97-107.

Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HRLV III) from patients with AIDS and Pre- AIDS. *Science*. 1984;224(4648):497-500.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(13):5193-7.

Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001 Aug;12(5):261-73.

Rodger AJ, Fox Z, Lundgren JD, Kuller LH, Boesecke C, Gey D, Skoutelis A, Goetz MB, Phillips AN; INSIGHT Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group. Activation and coagulation biomarkers are independent predictors of the development of opportunistic disease in patients with HIV infection. *J Infect Dis.* 2009 Sep 15;200(6):973-83.

SMART - Strategies for Management of Antiretroviral Therapy - Study Group, El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC, Babiker A, Burman W, Clumeck N, Cohen CJ, Cohn D, Cooper D, Darbyshire J, Emery S, Fätkenheuer G, Gazzard B, Grund B, Hoy J, Klingman K, Losso M, Markowitz N, Neuhaus J, Phillips A, Rappoport C. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med.* 2006 Nov 30;355(22):2283-96.

Stone D, Liu Y, Shayakhmetov D, Li ZY, Ni S, Lieber A. Adenovirus-platelet interaction in blood causes virus sequestration to the reticuloendothelial system of the liver. *J Virol.* 2007 May;81(9):4866-71.

Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial Peptides from Human platelets. *Infection and immunity.* 2002;70(12): 6524-33.

Tien PC, Choi AI, Zolopa AR, Benson C, Tracy R, Scherzer R, et al. Inflammation and mortality in HIV-infected adults: analysis of the FRAM study cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;55(3):316-22.

Triant VA, Regan S, Lee H, Sax PE, Meigs JB, Grinspoon SK. Association of Immunologic and Virologic Factors with Myocardial Infarction Rates in a U.S. Health Care System. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;55(5): 615–19.

Reed JC, Kroemer G. Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ.* 2000 Dec;7(12):1145.

Rieg G, Yeaman M, Lail AE, Donfield SM, Gomperts ED, Daar ES. Platelet count is associated with plasma HIV type 1 RNA and disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007;23(10):1257-61.

Rowland-Jones SL. Timeline: Aids pathogenesis: What have two decades of hiv research taught us? *Nat Rev Immunol.* 2003 apr;3(4):343-8.

Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci.* 1995;57(22):2049-55.

Satchell CS, O'Halloran JA, Cotter AG, Peace AJ, O'Connor EF, Tedesco AF, et al. Increased Platelet Reactivity in HIV-1–Infected Patients Receiving Abacavir-Containing Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2011;204(8):1202–10.

- Scaradavou A. HIV-related thrombocytopenia. *Bood Rev.* 2002;16(1):73-6.
- Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a Direct Agonist for Platelet RNA Splicing. *J Immunol.* 2008;181(5): 3495-3502.
- Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, Hua M, Qiao J, White MJ, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopathy that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood.* 2011;118(6):1663-74.
- Schmidt WP, Schim Van Der Loeff M, Aaby P, Whittle H, Bakker R, Buckner M, et al. Behaviour change and competitive exclusion can explain the diverging HIV-1 and HIV-2 prevalence trends in Guinea-Bissau. *Epidemiol. Infect.* 2008;136(4):551-61.
- Schwartz HR, Ster SK, Kahr WHA, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, et al. Anucleate platelets generate progeny. *Blood.* 2010;115(18):3801-09.
- Shi G, Morrell CN. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thromb Res.* 2011;127(5):387-90.
- Stark RJ, Aghakasiri N, Rumbaut RE. Platelet-Derived Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) Is Sufficient to Promote Microvascular Thrombosis in Endotoxemia. *Plos One.* 2012; 7(7):1-6.
- Stein JH, Hsue PY. Inflammation, immune activation, and CVD risk in individuals with HIV infection. *Jama.* 2012;308(4):405-6.
- Sterling TR, Chaiosson RE. General manifestations of human immunodeficiency virus infection (including the acute retroviral syndrome, oral, cutaneous, renal, ocular, metabolic and cardiac diseases). In Mandell GL, Bannett JE, Dolin R. In *Principles and Practices of Infectious Diseases*, 7 ed. Philadelphia: Elsevier Publishers, p. 1656-1698.
- Subramanian S, Tawakol A, Burdo TH, Abbara S, Wei J, Vijayakumar J, et al. Arterial Inflammation in Patients With HIV. *JAMA.* 2012;308(4):379-386
- Swaim AF, Field DJ, Fox-Talbot K, Baldwin WM, 3rd, Morrell CN. Platelets contribute to allograft rejection through glutamate receptor signaling. *J Immunol.* 2010;185(11):6999-7006
- Valcour V, Sithinamsuwan P, Letendre S, Ances B. Pathogenesis of HIV in the central nervous system. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011;8(1):54-61.
- Van der Loeff MF, Awasana AA, Sarge-Njie R, van der Sande M, Jaye A, Sabally S, et al. Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent epidemic trends of HIV-1 and HIV-2. *Int J Epidemiol.* 2006 Oct;35(5):1322-8.

Venkat A, Piontkowsky, Cooney RR, Srivastava AK, Soares GA, Heidelberger CP. Care of the HIV-Positive Patient in the Emergency Department in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Ann Emerg Med.*2008;52(3):274-85.

Verhoeven, AJ; Verhaar, R; Gouwerok, EGW; de Korte, D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*, Vol.45, p.82-89, 2005.

Vieira HLA, Haouzi D, Hamel CEI, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, et al. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ.* 2000;7(12):1146-54.

Wang J, Zhang W, Nardi MA, Li Z. HIV-1 Tat-induced platelet activation and release of CD154 contribute to HIV-1-associated autoimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2011;9(3):562-73.

Wang HB, Wang JT, Zhang L, Geng ZH, Xu WL, Xu T. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol.* 2007 Aug;8(8):882-92

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953;171(4356):737-8.

Warshaw AL, Laster L, Shulman NR. Protein Synthesis by Human Platelets. *JBC.*1967;242(9): 2094-97.

Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* 2004;25(9):489-95.

Wong-Staal F, Gallo RC. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature.* 1985 Oct 3-9;317(6036):395-403.

Yao XJ, Mouland AJ, Subbramanian RA, Forget J, Rougeau N, Bergeron D, et al. Vpr Stimulates Viral Expression and Induces Cell Killing in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Dividing Jurkat T Cells. *J Virol.* 1998;72(6):4686–93.

Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood.* 2002;99(11):4021-9.

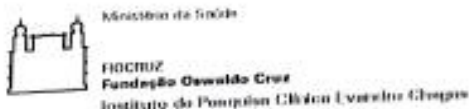
Zahn A, Jennings N, Ouwehand WH, Allain JP. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. *J Gen Virol.* 2006 Aug;87(Pt 8):2243-51.

Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-Dependent Protein Synthesis by Activated Platelets: New Pathways to Altered Phenotype and Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(3):17-24.

Zucker-Franklin D, Seremetis S, Zheng ZY. Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retroviruses by megakaryocytes and platelets. *Blood*. 1990 May 15;75(10):1920-3.

# ANEXOS

## ANEXO 1. APROVAÇÃO PELO CEP DO IPEC/FIOPCRUIZ



Comitê de Ética em Pesquisa

### PARECER CONSUBSTANCIADO -- 085/2011

CAAE 0043.0.009.000-11

#### 1. Identificação:

**Título do Projeto:** "Avaliação da função plaquetária na infecção pelo HIV".

**Pesquisador Responsável:** Fernando Augusto Bozza.

**Mestrando:** Emerson Ciclini Mesquita.

**Instituição Responsável:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOPCRUIZ.

**Data de Apresentação ao CEP:** 19/10/2011.

#### 2. Sumário:

Visa a avaliar a função plaquetária nos diferentes momentos clínicos da infecção pelo HIV. Tem como objetivos específicos: 1) Comparar marcadores de ativação plaquetária entre os diferentes grupos do estudo; 2) Comparar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em plaquetas dos diferentes grupos do estudo; 3) Correlacionar a ativação plaquetária com parâmetros clínicos nos diferentes grupos do estudo; 4) Comparar a produção de citocinas e quimiocinas plaquetária nos diferentes grupos do estudo; 5) Comparar os parâmetros de morte celular plaquetária entre os diferentes grupos. Este estudo tem um desenho observacional seccional e consistirá na coleta única e pontual de 20 ml de sangue de pacientes portadores de HIV/BIDA em acompanhamento ambulatorial ou internados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOPCRUIZ) e 50 ml de sangue de pacientes não infectados. Serão incluídos indivíduos com sorologia positiva para HIV em diferentes estágios clínicos de doença; e indivíduos não infectados: 1) Indivíduos infectados e assintomáticos, virgem de TARV; 2) Indivíduos infectados e em uso de TARV com supressão virológica; 3) Indivíduos infectados e em uso de TARV sem supressão virológica; 4) Indivíduos infectados pelo HIV com infecções oportunistas ou sépticas; 5) Indivíduos não infectados (Grupo Controle - será constituído por acompanhantes saudáveis dos pacientes dos demais grupos). Trata-se de uma amostra de conveniência. Estima-se que cerca de 100 pacientes, distribuídos em 20 pacientes/voluntários por grupo, serão incluídos nos 12 meses de duração da inclusão do estudo.

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

Projeto com delineamento adequado. Foram apresentados dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo um para o grupo "Não controle" e o outro para o grupo "Controle", elaborados em linguagem acessível ao sujeito da pesquisa.

#### 4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

#### 5. Parecer: APROVADO.

Data: 16 de dezembro de 2011.

Assinatura do Coordenador:

Dr. Cláudio Augusto Bozza  
Coordenador do CEP  
de FIOCRUZ  
19/12/2011



## ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### **Termo de Consentimento LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **Título: Avaliação da função plaquetária na infecção pelo vírus do HIV**

#### **Justificativa e objetivos**

Este estudo tem como objetivo identificar alguns fatores associados à queda da contagem de plaquetas associada a infecção pelo HIV, visando o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas.

#### **Proposta do Estudo**

O Sr(a) \_\_\_\_\_ está sendo convidado a participar deste estudo, para estudar se o HIV altera a função plaquetária.

#### **Explicação dos Procedimentos**

Será realizada uma coleta de sangue de 20 (vinte) ml, através de uma punção de veia periférica ou linha arterial, utilizando-se material estéril e descartável. Este procedimento é semelhante à coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina.

Após a análise inicial, estas amostras ficarão 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.

#### **Benefícios**

Pode haver benefícios com sua participação à medida que este estudo contribua para o aumento do conhecimento a respeito da infecção pelo HIV e para melhorias no tratamento, pois o material colhido será utilizado em diversos testes que ajudarão a entender como o HIV altera o HIV e a imunidade.

### **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. Este estudo não implica em riscos, nem 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.

### **Armazenamento de amostras biológicas**

O plasma será separado e armazenado em  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), para posterior análise. As amostras serão processadas para detectar certas substâncias para a atual pesquisa. Se no futuro houver necessidade da dosagem de outras substâncias nestas amostras de soro, plasma e células, o paciente ou responsáveis serão contactados para nova avaliação e autorização para uso deste material.

### **Se você tem dúvidas**

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor, telefone para o Dr. Emersom Mesquita ou Dr. Fernando Bozza nos telefones 3865-9620 ou 8886-7045.

## 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)

\_\_\_\_\_  
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  
(em letra de forma)

\_\_\_\_\_  
Grau de parentesco com o paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura (Representante legal)

\_\_\_\_\_  
Data

### ANEXO 3. FICHA DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS



#### “Avaliação da função plaquetária na infecção pelo HIV”

#### Protocolo clínico de coleta de dados:

No: \_\_\_ NOME: \_\_\_\_\_ IDADE: \_\_\_ anos SEXO: \_\_\_

PRONT: \_\_\_\_\_ Inclusão em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Origem: \_\_\_\_\_

Diagnóstico HIV/SIDA: \_\_\_/\_\_\_  Voluntário não HIV

CD4: \_\_\_ (data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) CV: \_\_\_ (data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Albumina: \_\_\_ (data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Plaquetas: \_\_\_ (data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Terapia antirretroviral: (Data início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Virgem de HAART  AZT  3TC  TDF  ATZ/R

LPV/R  HAL  RTV  DRV  APV

Outro: \_\_\_\_\_

#### Comorbidades

DM  HAS  Neoplasias (\_\_\_\_\_)  HBV

HCV  HTLV  Outras \_\_\_\_\_

#### Sociais

Tabagismo  Etilismo  Outras drogas: \_\_\_\_\_

Responsável pelo preenchimento: \_\_\_\_\_