

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

DOCTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

EMERSON CICILINI MESQUITA

**INFECCÕES GRAVES, RISCO CARDIOVASCULAR E FUNÇÃO PLAQUETÁRIA
EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1**

Rio de Janeiro

2018

EMERSON CICILINI MESQUITA

**INFECÇÕES GRAVES, RISCO CARDIOVASCULAR E FUNÇÃO PLAQUETÁRIA
EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1**

Tese apresentada ao curso de Doutorado
do Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas para obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Orientadores:
Dr. Fernando Augusto Bozza
Dra. Lara Esteves Coelho

Rio de Janeiro

2018

Mesquita, Emersom Cicilini.

INFECCÕES GRAVES, RISCO CARDIOVASCULAR E FUNÇÃO
PLAQUETÁRIA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1 / Emersom
Cicilini Mesquita. - Rio de Janeiro, 2018.

XVII, 99 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas,
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2018.

Orientador: Fernando Augusto Bozza.

Co-orientadora: Lara Esteves Coelho.

Bibliografia: f. 79-92

1. HIV-1. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Ativação plaquetária. 4. Terapia
antirretroviral . I. Título.

EMERSOM CICILINI MESQUITA

**INFECCÕES GRAVES, RISCO CARDIOVASCULAR E FUNÇÃO PLAQUETÁRIA
EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1**

Tese apresentada ao curso de
Doutorado do Instituto Nacional
de Infectologia Evandro Chagas
para obtenção do grau de Doutor
em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza
Prof. Dra. Lara Esteves Coelho

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Miguel Japiassú – Presidente
INI/FIOCRUZ

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Antonio Guilherme Fonseca Pacheco
PROCC/FIOCRUZ

Prof. Dra. Sandra Wagner Cardoso
INI/FIOCRUZ

Prof. Dra. Fernanda Heloise Côrtes
IOC/FIOCRUZ

EMERSOM CICILINI MESQUITA

**INFECÇÕES GRAVES, RISCO CARDIOVASCULAR E FUNÇÃO PLAQUETÁRIA
EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1**

Tese apresentada ao curso de
Doutorado do Instituto Nacional
de Infectologia Evandro Chagas
para obtenção do grau de Doutor
em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza
Prof. Dra. Lara Esteves Coelho

Aprovado em: / /

SUPLENTES

Prof. Dr. Rogério Valls de Souza – Revisor
INI/FIOCRUZ

Prof. Dr. Rodrigo Teixeira Amâncio
HSPE/MS

Para meu pai, Luiz Fernando Mesquita (*in memoriam*):

Esta conquista é sua meu pai, eternamente obrigado!

Para Marina e Dudu, meus melhores pedaços.

Para minha sempre presente mãe Benedita Cleusa Cicilini e
aos meus fiéis irmãos Bernardo Adonai Cicilini Mesquita
e Fabrício Cicilini Mesquita.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é composto de dados clínicos e experimentais e só foi possível graças a parceria que meus estimados orientadores, Dr. Fernando Augusto Bozza e Dra. Lara Esteves Coelho, estabeleceram entre o laboratório de imunofarmacologia (IOC/FIOCRUZ), o laboratório de DST/AIDS (INI/FIOCRUZ) e o laboratório de terapia intensiva (INI/FIOCRUZ).

Gostaria de agradecer em especial à Dra. Beatriz Gilda Jegerhorn Grinsztejn (INI/FIOCRUZ) e à Dra. Patrícia Torres Bozza (IOC/FIOCRUZ) pela coordenação e incentivo permanentes neste projeto.

Gostaria de agradecer a todos os membros do Laboratório de Imunofarmacologia (IOC/FIOCRUZ) pelo convívio, especialmente ao Dr. Hugo Castro Faria Neto, Dr. Eugênio Damasceno Hottz, Dr. Edson Assis, Dr. Alan Carneiro e Rose Branco.

Gostaria de agradecer a todos os membros do Instituto Nacional de Infectologia (INI/FIOCRUZ), especialmente ao Dr. André Miguel Japiassú e à Dra. Paula Mendes Luz.

Gostaria de agradecer ao Dr. Matthew T. Rondina, Dr. Guy A. Zimmerman e Dr. Andrew Wayrich pela possibilidade do doutoramento sanduíche, por expandirem minha visão de ciência.

Agradeço ao estimado amigo Dr. Rodrigo Teixeira Amâncio pela amizade sincera e por ter sido um permanente incentivador desta tarefa.

Agradeço ao Dr. Rogério Valls de Souza pela revisão do texto e pela contribuição na minha formação, desde a graduação, residência médica e mestrado.

Agradeço ao Dr. José Cerbino-Neto e ao Dr. Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil, por todo o incentivo na minha formação profissional e na minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao Dr. Ingo Riederer por ter sido um grande orientador de iniciação científica e me mostrado o início desta trilha.

Agradeço à Dra. Ana Danielle Tavares da Silva, Dra. Jordana Vilela Rabello e Dra. Gabriela Lisseth Umana Robleda, pelas trocas do plantão de terça-feira que me possibilitaram trabalhar neste projeto.

Agradeço a minha querida sogrinha por ter ficado com Dudu e permitido que eu escrevesse essa tese.

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

"Therefore, the seeker after the truth is not one who studies the writings of the ancients and, following his natural disposition, puts his trust in them, but rather the one who suspects his faith in them and questions what he gathers from them, the one who submits to argument and demonstration, and not to the sayings of a human being whose nature is fraught with all kinds of imperfection and deficiency."

"Portanto, o buscador da verdade não é aquele que estuda os escritos dos antigos e, seguindo sua disposição natural, confia neles, mas sim aquele que suspeita de sua fé neles e questiona o que reúne deles, é alguém que se submete ao argumento e à demonstração, e não aos ditos de um ser humano cuja natureza está repleta de todos os tipos de imperfeição e deficiência ".

Ibn al-Haytham.

Mesquita, EC. **Infecções graves, risco cardiovascular e função plaquetária em indivíduos infectados pelo HIV-1**. Rio de Janeiro; 2018. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo HIV-1 se tornou uma doença crônica. Este novo cenário clínico está associado a um estado pró-inflamatório e a um aumento proporcional na incidência de doenças cardiovasculares (DCV). Este tema foi abordado e será exposto na forma de dois artigos originais. **Artigo 1:** “Infecções graves aumentam o risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV”. **Objetivo:** Avaliar se a presença de infecções graves influencia a ocorrência de DCV em indivíduos infectados pelo HIV. **Métodos:** Indivíduos infectados pelo HIV incluídos na coorte do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ) entre 2000 e 2013 foram seguidos até a ocorrência do primeiro evento cardiovascular, morte ou fim do estudo. Infecção grave foi definida como hospitalização associada ao tratamento de infecção. Modelos de regressão de Cox, ajustados para potenciais confundidores, foram utilizados para avaliar o efeito de uma hospitalização por infecção no risco de ocorrência de DCV. **Resultados:** O risco de uma DCV foi 4 vezes maior no período de <3 meses pós-hospitalização (*hazard ratio* ajustada [aHR], 4,52; intervalo de confiança de 95% [CI] 2,46-8,30) e permaneceu elevado até um ano (3-12 meses após a alta hospitalar aHR 2.39, IC 95% 1.30-4.38). **Conclusão:** Infecções graves aumentam o risco cardiovascular na população estudada. Um gradiente de efeito foi observado, sendo o risco maior nos primeiros meses após o evento infeccioso. **Artigo 2:** “Persistência da ativação plaquetária e apoptose em indivíduos infectados pelo HIV-1”. **Objetivo:** Investigar marcadores de ativação plaquetária e apoptose em indivíduos infectados pelo HIV-1 e controlados virológicamente. **Métodos:** Citometria de fluxo e microscopia de fluorescência foram utilizadas para avaliar parâmetros de ativação, função mitocondrial e apoptose em plaquetas de indivíduos infectados pelo HIV-1 da coorte do INI/FIOCRUZ, e controles. **Resultados:** Maior ativação (expressão de P-selectina), disfunção mitocondrial (despolarização mitocondrial e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio) e apoptose (fosfatidilserina e caspase-9) foi evidenciada na plaqueta de indivíduos infectados pelo HIV-1, comparada com controles. **Conclusões:** Apesar do controle virológico, infecção pelo HIV-1 está associada a um fenótipo de ativação, apoptose e exaustão granular.

Palavras-chave: HIV-1, TARV, DCV, infecções graves, ativação plaquetária.

Mesquita, EC. **Severe infections, cardiovascular risk and platelet function among HIV-infected individuals**. Rio de Janeiro; 2018. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

Introduction: HIV-1 infection became a chronic disease. This new clinical scenario is associated with a pro-inflammatory state and a proportional increase in the incidence of cardiovascular diseases. This topic has been addressed and will be exposed in the form of two original papers. **Paper 1:** "Severe infections increase cardiovascular risk in HIV-infected individuals". **Objective:** To evaluate the influence of severe infections in the occurrence of cardiovascular diseases (CVD) among HIV-infected individuals. **Methods:** HIV-infected individuals included in the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI/FIOCRUZ) cohort between 2000 and 2013 were followed until the occurrence of the first CVD event, death or end of study. Severe infection was defined as hospitalization for the treatment of any infection. Extended Cox regression models, adjusted for potential confounders, were used to assess the effect of severe infection on the occurrence of CVD. **Results:** The risk of CVD was 4 times greater in the period of <3 months post-hospitalization (adjusted *hazard ratio* [aHR], 4.52; 95% confidence interval [CI] 2.46-8.30) and remained elevated for up to one year (3-12 months after hospital discharge aHR 2.39, 95% CI 1.30-4.38). **Conclusion:** Severe infections increase cardiovascular risk in the study population. A gradient effect was observed where the CVD risk is higher in the first months after the occurrence of severe infection. **Paper 2:** "Persistent platelet activation and apoptosis among HIV-infected individuals". **Objective:** To investigate markers of platelet activation and apoptosis among HIV-infected individuals virologically suppressed through combined antiretroviral therapy (cART). **Methods:** Flow cytometry and fluorescence microscopy were applied to evaluate activation, mitochondrial function and apoptosis in platelets derived from HIV-infected individuals enrolled at INI's cohort, and controls. **Results:** Increased activation (P-selectin expression), mitochondrial dysfunction (mitochondrial depolarization and increased generation of reactive oxygen species) and apoptosis (phosphatidylserine and caspase-9) were observed in platelets derived from HIV-infected individuals, when compared to controls. **Conclusions:** Despite the virological control, HIV-1 infection is associated with a phenotype of platelet activation, apoptosis and granular exhaustion.

Key words: HIV-1, cART, CVD, severe infections, platelet activation.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1	Estrutura do HIV-1.....4
Figura 2	Ciclo de replicação do HIV-1.....7
Figura 3	História natural da infecção pelo HIV-1.....8
Figura 4	Eventos apoptóticos na plaqueta humana.....16
Figura 5	Expressão plaquetária de P-selectina.....41
Figura 6	Modelo atual para compreensão do elevado risco cardiovascular na infecção pelo HIV-141
QUADROS	PÁGINA
Quadro 1	Fatores com atividade imunológica, inflamatória e antimicrobiana produzidos após a ativação plaquetária.....18
Quadro 2	Grupos com benefício para o uso de estatinas.....18
Quadro 3	Inclusão dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e que apresentaram infecções graves no algoritmo modificado para o início de estatina.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3TC	Lamivudina
ACD	Ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ADP	Adenosina 5'-difosfato
aHR	Razão de risco ajustada; <i>Adjusted hazard ratio</i>
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 ₂	Cloreto de cálcio
CCL3	MIP-1-alfa
CCL4	MIP-1-beta
CCL5	RANTES
CCR	Receptor de quimiocinas da família CC
CD	Grupo de diferenciação; <i>cluster of differentiation</i>
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 ³
CV > 50	Carga viral para HIV-1 maior que 50 cópias/mm ³
CVD	Doença cardiovascular; <i>Cardiovascular disease</i>

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	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> ; Ensaio de imunoabsorção enzimática
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino; <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos; <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMPC	Monofosfato de guanosina cíclico; <i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
HCV	Vírus da Hepatite C; <i>Hepatitis C virus</i>
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; <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IL	Interleucina
IMF	Intensidade média de fluorescência
INF	Interferon
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

INSTI	Inibidores da integrase
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; <i>monocyte chemoattractant protein</i>
MgCl	Cloreto de magnésio
MIP-1- α	Proteína inflamatória de macrófago 1- α
MIP-1- β	Proteína inflamatória de macrófago 1- β
MPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial; <i>mitochondrial permeability transition pore</i>
Na ₂ HPO ₄	Monohidrogenofosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NF	Fator nuclear; <i>nuclear factor</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i> - fator de crescimento neural
NK	Células Natural Killers
NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas; <i>platelet activating factor</i>

PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Células mononucleares circulantes; <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Solução salina fosfatada tamponada; <i>Phosphate buffer solution</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase; <i>Polimerase chain reaction</i>
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; <i>N-terminal thrombin receptor fragment</i>
SMART	<i>Strategies for Management of Antiretroviral Therapy</i>
SOX	Superóxido
STAT	Proteínas sinalizadoras e ativadoras de transcrição; <i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAP	Tempo de ação da protrombina
TARV	Terapia antirretroviral de alta potência
TDF	Tenofovir
TF	Fator tecidual; <i>tissue factor</i>
TGF	Transforming growth factor

TLR	<i>Toll-like receptor</i> - Receptor tipo Toll
TMRE	Tetrametilrodamina etil éster
TNF	Fator de necrose tumoral; <i>tumor necrosis factor</i>
TXA2	Tromboxano A2
TXB2	Tromboxano B2
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VT	Virgem de TARV
WHO	Organização Mundial de Saúde; <i>World Health Organization</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
Δt	Intervalo de tempo

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS E QUADROS.....	x
LISTA DE ABREVEIATURAS.....	xi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA AIDS.....	1
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	1
1.3 PATOGÊNESE.....	3
1.4 CRONIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 E MUDANÇA NA MORBIMORTALIDADE ASSOCIADA À AIDS.....	6
1.5 INFLAMAÇÃO PERSISTENTE COMO CAUSA DAS COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1.....	7
1.6 INFECÇÕES AGUDAS AUMENTAM O RISCO CARDIOVASCULAR NA POPULAÇÃO GERAL.....	9
1.7 A PLAQUETA COMO COMPONENTE DA RESPOSTA IMUNO- INFLAMATÓRIA.....	10
1.8 PLAQUETA E HIV.....	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. METODOLOGIA.....	19

4.1	ARTIGO 1: INFECÇÕES GRAVES AUMENTAM O RISCO CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1.....	19
4.2	ARTIGO 2: PERSISTÊNCIA DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E APOPTOSE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1.....	21
5.	RESULTADOS.....	22
5.1	ARTIGO 1: SEVERE INFECTIONS INCREASES CARDIOVASCULAR RISK AMONG HIV-INFECTED INDIVIDUALS.....	22
5.2	ARTIGO 2: PERSISTENT PLATELET ACTIVATION AND APOPTOSIS IN VIROLOGICALY SUPPRESSED HIV-INFECTED INDIVIDUALS.....	43
6.	DISCUSSÃO.....	67
7.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	78
8.	REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS		
	ANEXO 1. APROVAÇÃO PELO CEP DO INI/FIOCRUZ.....	93
	ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	94
	ANEXO 3. FICHA DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	97
	ANEXO 4. CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1.....	98
	ANEXO 5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA AIDS

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 (Timeline of HIV and TB, UNAIDS). Atualmente estima-se que existam 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS e, em 2016, aproximadamente 1,2 milhões de mortes foram atribuídas a esta patologia em todo o mundo (UNAIDS, 2017). No Brasil, desde o início da epidemia até 31 de dezembro de 2016, foram registrados pelo Ministério da Saúde (MS) 882.810 casos de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) e 316.088 mortes relacionadas à AIDS (Boletim Epidemiológico de Aids 2017).

1.2 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 proteico, circundado por um envelope externo de glicoproteínas e uma membrana lipídica (Figura 1) (Wong-Staal *et al*, 1985).

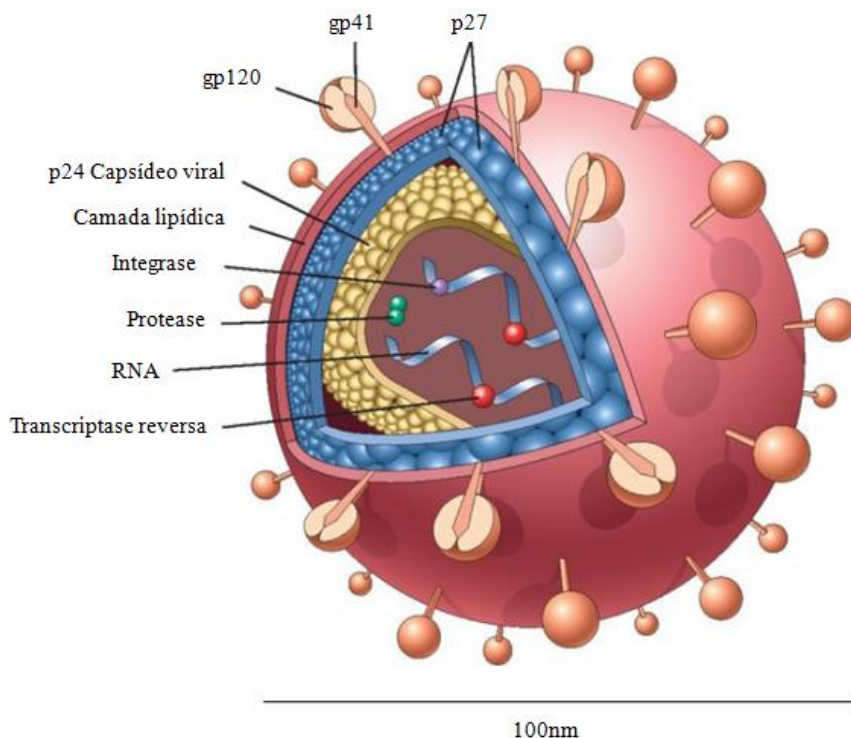


Figura 1: Estrutura do HIV-1. Adaptado de Robbins e Cotran: Pathologic basis of diseases, 8ª Edição.

No capsídeo viral encontramos a proteína p24, utilizada para o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). 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). As regiões LTR (*long terminal repeat*), existentes no início e no final da sequência 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 nucleocapsídeo (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.

1.3 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 α (CCL3), Mip-1 β (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- κ 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 (Peterlin 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 2.

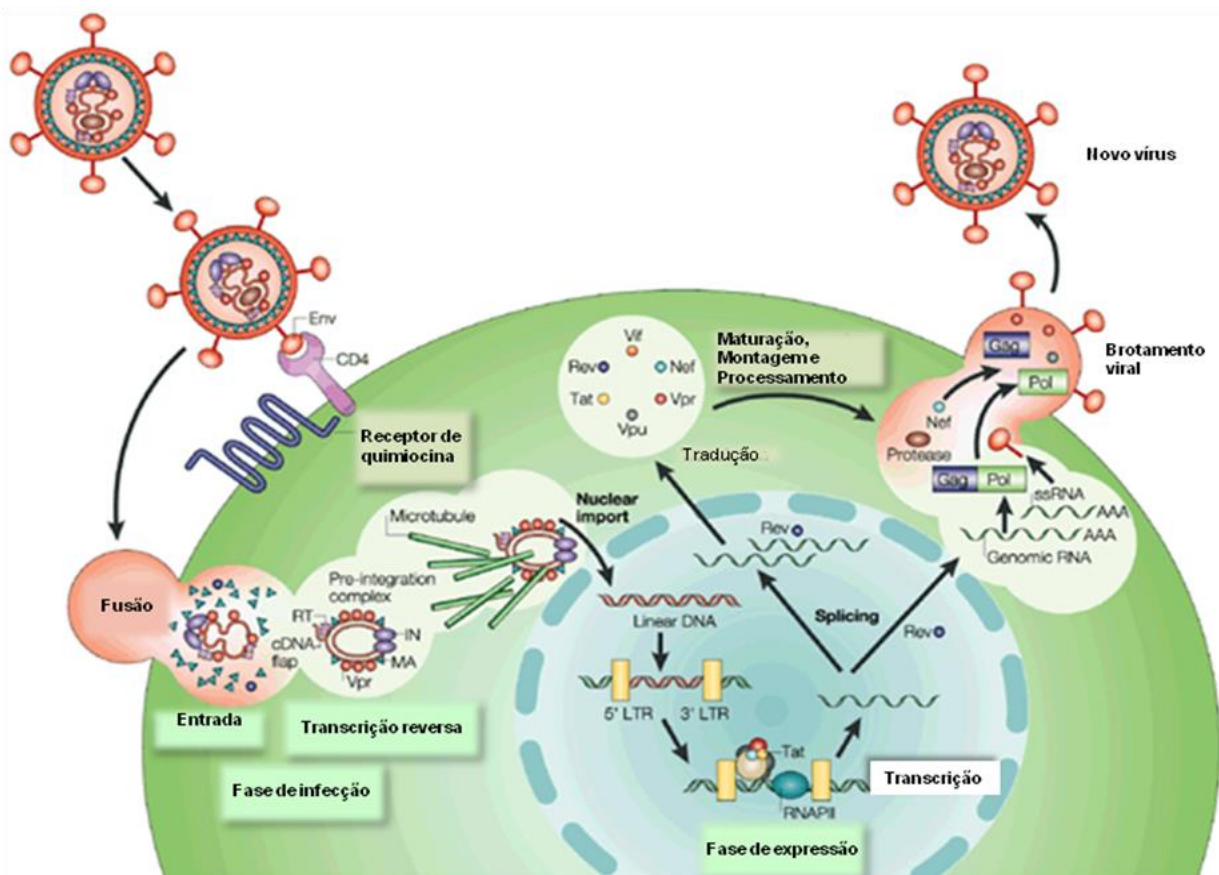


Figura 2: Ciclo de replicação do HIV-1. Adaptado de Peterlin e Trono, 2003.

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- α , que possui receptores nas células TCD4+ com um domínio de sinalização para morte celular (Robbins e Cotran, 2014).

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, cefaleia, 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 (Robbins e Cotran, 2014).

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 3 ilustra a história natural da infecção pelo HIV.

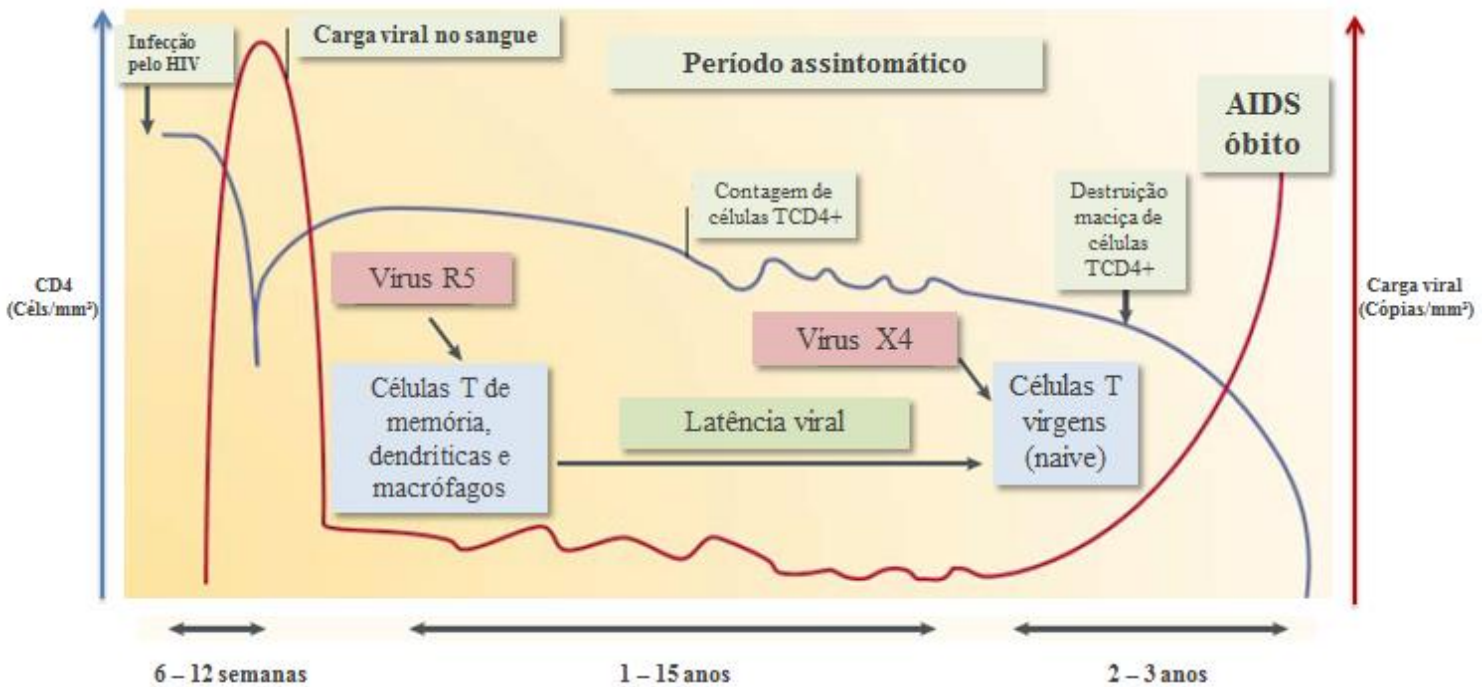


Figura 3: História natural da infecção pelo HIV-1. Adaptado de Rowland-Jones *et al*, 2003.

1.4 CRONIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 E MUDANÇA NA MORBIMORTALIDADE ASSOCIADA À AIDS

O advento da terapia antirretroviral de alta potência (TARV) no tratamento dos pacientes infectados pelo HIV-1 resultou na melhora do prognóstico e diminuição da mortalidade, levando, por conseguinte, a um aumento na sobrevida (Dore *et al*, 2002). O aumento da sobrevida dos pacientes infectados pelo HIV-1 também foi acompanhado por mudanças no perfil de morbimortalidade desta população, com um aumento nas causas de admissão hospitalar não relacionadas ao HIV-1, e um aumento na incidência de eventos cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio (IAM) (Freiberg *et al*, 2013), acidente vascular cerebral (AVC) (Sisco *et al*, 2015), insuficiência cardíaca (Butt *et al*, 2011), trombose venosa (Crum-Cianflone *et al*, 2008) e morte súbita (Tseng *et al*, 2012).

O risco relativo ajustado para desenvolvimento de IAM é maior em homens e mulheres infectados pelo HIV-1, quando comparados a indivíduos não infectados (1,64 vs. 0,76 para os homens e 1,72 vs. 1,03 em mulheres, dados relativos a indivíduos com idade entre 24 a 34) (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.

O risco para evento trombótico no leito venoso também se mostrou elevado em indivíduos infectados pelo HIV-1, 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 trombose venosa profunda (TVP) em indivíduos infectados pelo HIV-1 quando comparado à população controle pareada por idade, sexo e risco cardiovascular. A idade média de TVP nos indivíduos infectados pelo HIV-1 também foi mais baixa (36 vs. 40 população em geral). Ainda, entre os indivíduos infectados pelo HIV-1, o desenvolvimento de TVP esteve associado a nadir mais baixo de células TCD4+, carga viral elevada e contagem baixa de células TCD4+.

1.5 INFLAMAÇÃO PERSISTENTE COMO CAUSA DAS COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1

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/mm³) 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/mm³, 1.43 (1.14-1.79), 95% IC, para CD4 entre 200-350 células/mm³, 1.30 (1.04-1.63), 95% IC, para CD4 entre 350–500 células/mm³ e 1.30 (1.04-1.63), 95% IC, para CD4 > 500 células/mm³ (Tien *et al*, 2010).

Sibramarian *et al* (2012) utilizaram tomografia por emissão de pósitrons e demonstraram que pacientes HIV positivos com controle virológico (HIV RNA < 50 cópias/mm³ no sangue periférico) e boa resposta imunológica (Mediana de células TCD4+ > 600 células/mm³) 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.

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). 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/mm³ e carga viral para HIV por PCR indetectável (< 50 cópias/mm³). 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) relacionam resposta virológica e imunológica com o grau de inflamação. Neste estudo os pesquisadores demonstraram que indivíduos infectados pelo HIV-1 com HIV RNA > 500 cópias/mm³ no sangue periférico e contagem de células TCD4+ < 200 células/mm³ 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).

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. Durand *et al* (2011) analisaram o impacto da infecção pelo HIV-1 e da terapia antirretroviral no desenvolvimento de 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.

De maneira geral, as evidências atuais sugerem que a infecção pelo HIV-1 está associada a um estado pró-inflamatório que, por sua vez, contribui para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares. A TARV é capaz de atenuar mas não de reverter o estado pró-inflamatório.

1.6 INFECÇÕES AGUDAS AUMENTAM O RISCO CARDIOVASCULAR NA POPULAÇÃO GERAL

As doenças cardiovasculares (DCV) são as doenças que mais matam no mundo (WHO, 2016). O reconhecimento de fatores de risco cardiovasculares (hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo, dislipidemia, estresse e sedentarismo) e seu pronto enfretamento permitiram uma redução na incidência e na mortalidade das DCVs em países desenvolvidos (Bandosz *et al*, 2012) (Schmidt *et al*, 2012) (Smolina *et al*, 2012).

Nas últimas décadas, o espectro dos fatores tradicionais de risco cardiovascular supracitados expandiu-se, incluindo insultos infecciosos agudos como a pneumonia comunitária (PAC) grave (Corrales-Medina *et al*, 2015) (Ramirez *et al*, 2008) (Corrales-Medina *et al*, 2009), internação por influenza (Ludwig *et al*, 2015), infecção urinária (Smeeth *et al*, 2004) e gastroenterite (Baylin *et al*, 2007).

Analisando duas coortes (*Cardiovascular Health Study – CHS – e Atherosclerosis Risk in Communities study – ARIC –*) e um total de 21.680 indivíduos, Corrales-Medina *et al* (2015) observaram que a admissão hospitalar por pneumonia está associada com o desenvolvimento de DCV na população estudada. Os autores demonstraram que o efeito do diagnóstico de pneumonia no aumento do risco de doença cardiovascular é tempo dependente, sendo maior nos primeiros 30 dias após a alta hospitalar mas permanecendo significativo por até 10 anos após o evento infeccioso.

A hospitalização por evento infeccioso está associada a um estado pró-inflamatório e uma atividade pró-coagulante que pode persistir por longo período após a resolução da infecção e o clearance antigênico (Yende *et al*, 2008) (Yende *et al*, 2011). Outros importantes mecanismos envolvidos incluem isquemia de demanda, disfunção endotelial e alterações inflamatórias na placa aterosclerótica (Corrales-Medina *et al*, 2010). Até a presente data, a relação entre insultos infecciosos agudos e risco cardiovascular ainda não foi explorada no contexto da infecção pelo HIV-1.

1.7 A PLAQUETA COMO COMPONENTE DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA

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 plaqueta é capaz de sofrer apoptose. Um balanço entre BCL-X_L e BAK regula a meia-vida de plaquetas na circulação periférica. Com o envelhecimento plaquetário ocorre a degradação de BCL-X_L iniciando a via intrínseca de apoptose e consequente 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, Bcl-2 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) (Gyulhandanyan *et al*, 2012). A figura 4 ilustra importantes eventos da apoptose plaquetária.

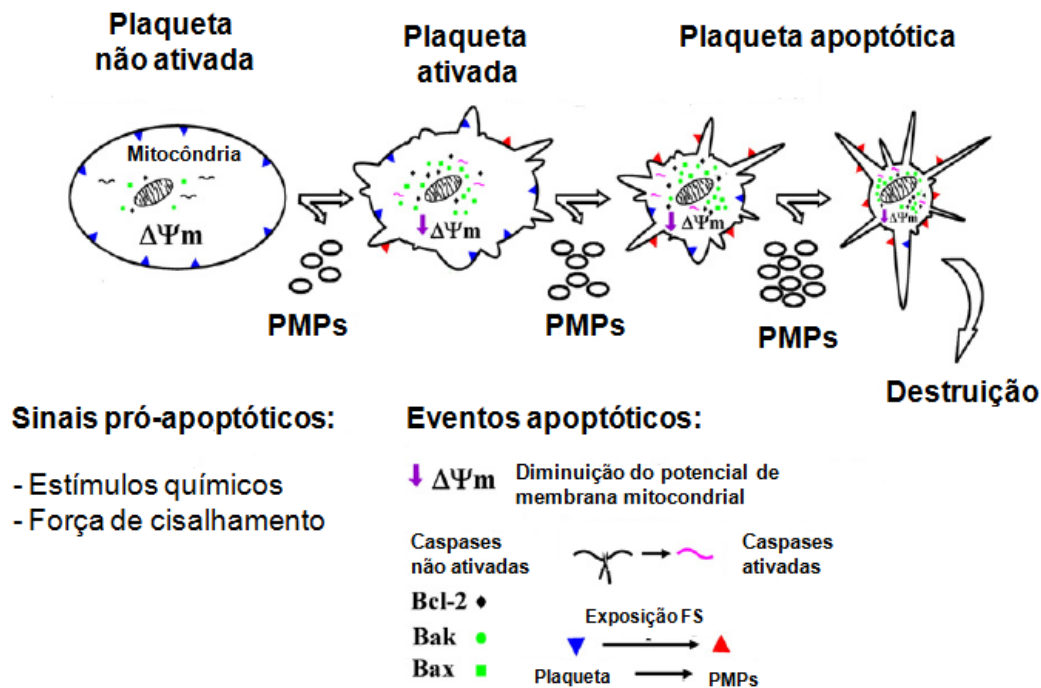


Figura 4. Eventos apoptóticos na plaqueta humana. Observa-se a mudança de forma, com emissão de prolongamentos celulares (Filopodia), diminuição do volume plaquetário, diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), exposição de fosfatidilserina (FS), transposição de Bcl-2, Bak e Bax para a mitocôndria, produção de PMPs (Micropartículas plaquetárias) e ativação de Caspases. (Adaptado de Gyulkhandanyan *et al*, 2012)

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 proteica 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 proteica 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 $\alpha IIb\beta 3$ plaquetas ativadas produzem IL-1 β de maneira sustentada. A IL-1 β 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 β	Sintetizado	Monócitos, Cels edoteliais, DCs e macrófagos
	HMGB1	Armazenado	Macrófagos, PMNs, Cels edoteliais
Quimiocinas	NAP2 (CXCL7)	Clivagem proteolítica	PMNs
	PF4 (CXCL4)	Armazenado	PMNs
	GRO- α (CXCL1)	Armazenado	PMNs
	ENA-78 (CXCL5)	Armazenado	PMNs
	RANTES (CCL5)	Armazenado	Monócitos, eosinófilos, basófilos, Cels NK, Cels T, DCs
	MIP-1 α (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- β	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)

1.8 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- α e será neutralizado. Contudo, se o tráfego vesicular do HIV endocitado não atinge o conteúdo dos grânulos α , 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 plaquetas ativadas exibem maior capacidade de endocitose e subsequente destruição do HIV-1.

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- α plaquetários.

Nos pacientes infectados pelo HIV a trombocitopenia é um achado frequente 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-imunes, 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).

A terapia antirretroviral (TARV) afeta a homeostase plaquetária. von 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 contendo Abacavir apresentavam maior agregação plaquetária quando estimuladas com agonistas (ADP, colágeno, adrenalina e TRAP -peptídeo ativador do receptor de trombina-), quando comparadas 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 na produção plaquetária e leucocitária de PAF, mediador classicamente implicado na gênese de infarto agudo do miocárdio (IAM).

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 infecção pelo HIV e as comorbidades associadas a ela.

2. JUSTIFICATIVA

A terapia antirretroviral foi responsável pela melhoria na qualidade de vida e pelo aumento da sobrevivência de indivíduos infectados pelo HIV-1, levando, por conseguinte, à cronificação da doença. Este cenário clínico é marcado por um estado pró-inflamatório e uma mudança no perfil de morbimortalidade, com o aumento proporcional de complicações não relacionadas ao HIV, como as complicações cardiovasculares. Desta forma, estudos com o objetivo de identificar novos fatores de risco cardiovascular e componentes da resposta inflamatória envolvidos na gênese destas complicações podem fornecer informações vitais para a elaboração de políticas de saúde e protocolos de tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o impacto de eventos infecciosos graves no risco cardiovascular de indivíduos infectados pelo HIV-1 e comparar parâmetros de função plaquetária entre indivíduos infectados pelo HIV-1 controlados virologicamente e indivíduos não infectados pelo HIV-1.

Essa tese foi desenvolvida e será apresentada na forma de 2 artigos. Seus objetivos específicos serão descritos no âmbito de cada artigo, conforme descrição no tópico a seguir.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) **Artigo 1:** Infecções graves aumentam o risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV. (*Severe infections increases cardiovascular risk among HIV-infected individuals.*)

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Estimar a taxa de incidência de doença cardiovascular na população estudada;
2. Avaliar fatores demográficos e clínicos associados com a incidência de doenças cardiovasculares;
3. Avaliar o impacto de doenças infecciosas severas na ocorrência de eventos cardiovasculares.

b) **Artigo 2:** Persistência da ativação plaquetária e apoptose em indivíduos infectados pelo HIV. (*Persistent platelet activation and apoptosis in virologically suppressed HIV-infected individuals.*)

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Avaliar o perfil de ativação plaquetária em pacientes infectados pelo HIV-1 e controles;
2. Caracterizar a presença de disfunção mitocondrial em plaquetas de pacientes infectados pelo HIV-1 e controles;
3. Comparar o perfil de resposta plaquetária induzida por trombina entre pacientes infectados pelo HIV-1 e controles.

4. METODOLOGIA

4.1 ARTIGO 1: INFECÇÕES GRAVES AUMENTAM O RISCO CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV. (SEVERE INFECTIONS INCREASES CARDIOVASCULAR RISK AMONG HIV-INFECTED INDIVIDUALS.)

A descrição completa dos métodos utilizados nesse estudo encontra-se no corpo do artigo número 1, apresentado na seção da tese intitulada *RESULTADOS*.

O Instituto Nacional de Infectologia (INI) é um centro de referência nacional para o tratamento de doenças infecciosas e desde 1986 é um centro de referência para o tratamento de pacientes infectados pelo HIV. Desde 1998, uma base de dados longitudinal dos pacientes em acompanhamento é mantida, e periodicamente atualizada com informações extraídas dos prontuários médicos, por equipe treinada. Os procedimentos da coorte já foram descritos e resultados publicados (Grinsztejn *et al*, 2009, 2013; Moreira *et al*, 2011; Ribeiro *et al*, 2014). Concisamente, a base de dados conta com: informações sócio demográficas; exames laboratoriais (incluindo histórico de exames de CD4 e carga viral, sorologia para hepatites virais entre outros); informações sobre ART (data de início e término de cada esquema terapêutico utilizado); informações sobre comorbidades, incluindo doenças oportunistas e doenças crônicas (hipertensão arterial, diabetes entre outras); informações sobre hospitalizações (datas de admissão, alta hospitalar, tipo de alta hospitalar). Auditorias interna e externa dos dados coletados são realizadas periodicamente.

Para este estudo, de 1 de janeiro de 2000 até 31 de dezembro de 2013, incluímos indivíduos infectados pelo HIV com 18 anos ou mais, que foram seguidos na coorte por pelo menos 60 dias. O início do seguimento foi definido como a primeira consulta médica no INI. O resultado do interesse foi a incidência da primeira doença cardiovascular (DCV) durante o seguimento, de modo que, para aqueles que desenvolveram DCV, o seguimento terminou no dia do diagnóstico. Para aqueles que não apresentaram DCV, o seguimento terminou na data da morte, última visita clínica, última coleta de sangue ou encerramento do estudo (31 de dezembro de 2013), o que ocorrer primeiro. Pacientes com história de doença cardiovascular (DCV) antes da matrícula na coorte (n = 59 pacientes) foram excluídos da população estudada. Perda de seguimento foi definida para pacientes sabidamente vivos e que não tiveram nenhuma visita clínica (visita médica, CD4, carga viral do HIV) após 1 de janeiro de 2013.

Os relatórios de alta hospitalar foram revistos para classificação dos diagnósticos relacionados com a hospitalização. Todos os diagnósticos listados no resumo de alta foram classificados de acordo com a Classificação Internacional de Doenças – 10ª edição (CID-10) (*World Health Organization*, 2011).

O modelo de riscos proporcionais de Cox é uma análise de regressão múltipla indicado quando se deseja estimar o papel de variáveis independentes que agem multiplicativamente sobre o risco (Kleinbaum e Klein, 2011). No presente estudo a variável de exposição principal foi a ocorrência de uma infecção grave, definida como primeira hospitalização por qualquer evento infeccioso, incluindo códigos do CID-10 para infecções bacterianas, virais, fúngicas ou parasitárias. Esta variável foi tratada como uma variável tempo-dependente, com 4 categorias específicas: (a) Sem infecção severa; (b) Infecção severa 0-3 meses; (c) Infecção severa 3-12 meses e (d) Infecção severa há mais de 12 meses. Dessa forma, para pacientes que tiveram uma infecção severa, seus tempos de seguimento foram divididos de acordo com esses cortes no tempo, em relação à data da alta hospitalar. Pacientes que não apresentaram nenhuma infecção severa só contribuíram tempo na categoria sem infecção severa.

Além das infecções graves, outras variáveis independentes exploradas foram idade, sexo, raça, categoria de exposição ao HIV, nível educacional, co-infecções com hepatite B e hepatite C, uso de tabaco, uso de cocaína, hipertensão arterial, diabetes mellitus e dislipidemia. Os modelos ajustados iniciais incluíam todas as variáveis exploradas nos modelos não ajustados que apresentavam $p < 0,20$. O modelo final foi alcançado através da eliminação de variáveis do moledo cheio para o modelo vazio (*backwards elimination*), até que apenas variáveis significativas ($p < 0,05$) estivessem presentes.

4.2 ARTIGO 2: PERSISTÊNCIA DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E APOPTOSE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV. (PERSISTENT PLATELET ACTIVATION AND APOPTOSIS IN VIROLOGICALLY SUPPRESSED HIV-INFECTED INDIVIDUALS.)

A descrição completa dos métodos utilizados nesse estudo encontra-se no corpo do artigo número 2 apresentado na seção da tese intitulada *RESULTADOS*.

Resumidamente, trata-se de um estudo multicêntrico, observacional, seccional, de amostragem de conveniência. Foram selecionados indivíduos com sorologia positiva para HIV-1 e com carga viral indetectável através do uso de terapia antirretroviral. Foram excluídos do estudo: grávidas, 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. Um grupo controle de indivíduos não infectados foi selecionado. 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 de procedimentos como isolamento de plaquetas, análise da ativação plaquetária, análise da exposição de fosfatidilserina, análise do potencial de membrana mitocondrial, análise da produção de óxido nítrico, análise da produção de superóxido mitocondrial, análise da ativação de Caspase 9, análise da resposta plaquetária ao estímulo com trombina. 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).

As análises estatísticas foram 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 foram apresentadas como medianas e intervalo interquartil e avaliadas quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por teste t de Student ou Mann Whitney. Significância estatística foi considerada sempre que $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A seção de resultados será apresentada na forma de dois artigos, conforme descrito nas seções *OBJETIVOS* e *METODOLOGIA*.

5.1 Artigo 1: Infecções graves aumentam o risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV. (*Severe infections increases cardiovascular risk among HIV-infected individuals.*)

➤ Submetido para publicação na revista *Infection* em 09/01/18 (ANEXO 4).

Este artigo explora o impacto da infecção grave no desenvolvimento de doença cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV-1, após a equiparação por fatores tradicionais de risco cardiovascular e por fatores relacionados à infecção pelo HIV-1. O artigo demonstra a associação entre presença de infecção grave e aumento do risco de desenvolver doença cardiovascular na coorte do INI-FIOCRUZ. Também evidencia o papel protetor do uso de TARV no risco de desenvolver doença cardiovascular e aponta uma população que pode se beneficiar de medidas mais agressivas de controle de fatores de risco cardiovascular modificáveis, assim como abordagens farmacológicas que visem modular o grau de inflamação.

5.1 ARTIGO 1

Title: Severe infections increases cardiovascular risk among HIV-infected individuals

Authors:

Emersom C Mesquita¹, Lara E Coelho², Rodrigo T Amancio¹, Valdilea G Veloso, Beatriz Grinsztejn², Paula M Luz² and Fernando A Bozza^{1,3}

Institution:

¹Laboratório de Medicina Intensiva and ²Laboratório de HIV, Instituto de Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.

³Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding Author: Fernando A. Bozza, M.D., Ph.D.

Email: bozza.fernando@gmail.com or fernando.bozza@ini.fiocruz.br

Address: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), FIOCRUZ, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Zip code: 21045-900

Abstract

Introduction

The identification and management of cardiovascular risk factors became a major clinical issue among HIV-infected individuals in the post-cART era. As in the past decades the link between acute infections and cardiovascular diseases became clear in the general population, we sorted to investigate the role of severe infections on incident cardiovascular diseases (CVDs) among HIV-infected individuals.

Methods

HIV-infected individuals aged ≥ 18 years, with no history of CVD were followed from January 2000 to December 2013 until the occurrence of the first CVD event, death or end of study, whichever occurred first. To explore the effect of severe infections on the incidence of CVD we used extended Cox regression models and stratified post-hospitalization follow-up time into three periods: <3 months, 3-12 months and >12 months post discharge.

Results

One hundred-eighty four persons from 3384 HIV-infected individuals developed incident CVD events during the follow-up (incidence rate = 11.10/1000 PY (95%CI: 9.60–12.82)). Risk of an incident CVD was 4-fold higher at <3 months post-hospitalization for severe infections (adjusted hazard ratio [aHR], 4.52; 95% confidence interval [CI] 2.46–8.30), after adjusting for sociodemographic and clinical factors as well as comorbidities. This risk remained significant up to one year (3-12 months post hospital discharge aHR 2.39, 95% CI 1.30–4.38). Additionally, non-white race/ethnicity (aHR 1.49, 95% CI 1.10–2.02), age ≥ 60 years (aHR 2.01, 95% CI 1.01–3.97) and hypertension (aHR 1.90, 95% CI 1.38–2.60) were associated with an increased risk of CVD events. High CD4 (≥ 500 cells/mm³: aHR 0.41, 95% CI 0.27–0.62) and cART use (aHR 0.21, 95% CI 0.14–0.31) reduced the risk of CVD events.

Conclusions

We found that HIV-infected individuals who had severe infections exhibit an increased cardiovascular risk in the subsequent 1-year period. Our results strengthen the evidence towards an overall benefit of early cART initiation and suggest a specific population that may benefit from strategies to reduce modifiable cardiovascular disease risk factors.

Introduction

With introduction and widespread use of combined antiretroviral therapy (cART) a marked shift in causes of hospitalizations and deaths have been observed among HIV-infected individuals, with a relative increase in non-communicable diseases (NCD) and non-AIDS-defining infections [1–4]. Among NCD, cardiovascular diseases (CVD) represent a major challenge. HIV-infected individuals have a higher risk for CVD such as myocardial infarction (MI), stroke, heart failure and sudden cardiac death [5–8]. Although a higher burden of traditional CVD risk factors have been reported in HIV-infected individuals [9,10], an elevated risk remains even after adjusting for these factors [11,12]. Additionally, chronic exposure to cART [13–15], HIV infection itself and HIV-specific clinical parameters, such as detectable HIV-1 RNA and nadir CD4+ count ≤ 50 cells/mm³, may also contribute to this increased CVD risk [16,17].

As AIDS progresses to a chronic condition and HIV-infected individuals live longer [18], severe bacterial infection and sepsis constitute a significant cause of hospitalization in this population [19]. In the intensive care scenario, sepsis is the major determinant of outcome in HIV-infected individuals [20,21] and, despite the presence of severe immunosuppression, a robust innate immune response occurs and is associated with hospital mortality [22]. In this study, we hypothesized that HIV-infected individuals who were hospitalized for severe infections would have an increased CVD risk compared to HIV-infected individuals without hospitalization for severe infections. Identifying specific CVD risk in this population is critical for guiding targeted CVD prevention and treatment.

Methods

Data sources and study population

The Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI, formerly known as Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/IPEC) provides primary and specialized health care for HIV-infected individuals in Rio de Janeiro State, Brazil. It comprises an outpatient clinic, emergency department and inpatient care, including an intensive care unit. All health care services provided by INI are funded by Brazilian's public health system (known as Sistema Único de Saúde, SUS). A longitudinal observational cohort including socio-demographic, laboratory and clinical data has been maintained at INI since 1998. Data of patients receiving primary care at INI is abstracted from medical records and is updated periodically by trained staff. Cohort procedures have been described and results published [3,23,24].

For this study, from January 1 2000 until December 31 2013, we included HIV-infected individuals aged 18 years old or older, who were followed in the cohort for at least 60 days. The start of the follow-up was defined as the first medical appointment at INI. The outcome of interest was the incidence of the first CVD during follow-up such that for those who developed incident CVD, follow-up ended on the day of the diagnosis. For those not presenting any CVD, follow-up ended on the death date, last clinical visit, last blood drawn or study closure (December 31 2013), whichever occurred first. Patients with history of cardiovascular disease (CVD) prior to cohort enrollment (n=59 patients) were excluded from the study population. Lost to follow-up was defined for patients known not to be deceased as not having a clinical visit (medical visit, CD4, HIV viral load) after January 1 2013.

Study definitions

We defined severe infections as any hospitalization related to any acute infection diagnosis (based on the discharge summary), which included ICD-10 codes for bacterial, viral, fungal or parasites infections (supplementary figure 2).

Cardiovascular diseases were defined as: coronary heart disease (CHD), stroke, peripheral arterial disease, deep venous thrombosis (DVT), pulmonary embolism, disorders of the heart muscle – cardiomyopathies – and disorders of the rhythm [25] (see Supplementary Table 1). In cases when the CVD occurred during the hospitalization for infections, this hospitalization counted as an outcome (CVD) but not as an independent variable (severe infection). The following co-morbidities were defined up to patient's end of follow-up. Hepatitis B and C co-infections were defined as having a positive HBsAg antigen and by the presence of anti-HCV antibodies, respectively. Arterial hypertension was defined as use of antihypertensive medication, systolic blood pressure >140 mmHg, or diastolic blood pressure >90 mmHg prior to the end of follow-up. Diabetes was defined as use of diabetes mellitus pharmacological treatment or a fasting glucose level ≥ 126 mg/dL or a hemoglobin A1c value of 6.5 or greater prior to end of follow-up. Dyslipidemia was defined by the use of lipid-lowering therapy, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol >159 mg/dL, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol <40 mg/dL, total cholesterol >239 mg/dL, or triglycerides >199 mg/dL prior to the end of follow-up. cART use was defined for those who had 90 days or more of exposure to at least three antiretroviral drugs: two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and either one protease inhibitor, one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor or one integrase inhibitor. ART adherence information was not available such that ART use was presumed for the entire follow-up time for those meeting the criteria described above. Tobacco ever use and cocaine ever use (comprises inhaled, smoked and injection use) were defined based on self-report.

Statistical methods

Incidence rates of cardiovascular disease were calculated by dividing the number of events by the person-years at risk. Rates were calculated per 1000 person-years (PY) with respective 95% confidence interval using Poisson regression model. To explore the effect of severe infections on the incidence of CVD we used extended Cox regression models. We stratified a patient's post-infection follow-up time into three periods as follows: <3 months post-hospitalization, 3-12 months post-hospitalization and more than a year post-hospitalization. Descriptive statistics for demographic and clinical variables were compared using Kruskal-Wallis test for continuous variables and chi-squared for categorical variables. CD4 nadir was defined as the lowest CD4 count value available for each patient. Last CD4 count, last CD4/CD8 ratio and last HIV-RNA were defined as the last results within the patient's final year of follow-up. Kaplan-Meier survival curves were plotted to show how the survival experience varied among groups. Beyond severe infections, other independent variables explored through unadjusted Cox regression models were age (as a time dependent variable), sex, race, HIV exposure category, educational level, hepatitis B and C co-infections, tobacco use, cocaine use, arterial hypertension, diabetes, and dyslipidemia. The initial adjusted models included all variables explored in the unadjusted models that presented a p-value less than 0.20. The final model was achieved through backwards elimination until only significant variables, at the p-value of < 0.05, were present. Random imputation for missing values in CD4 counts and CD4/CD8 ratio was performed. R (version 3.0.3), library Survival were used for the analyses.

Results

Overall, 3475 HIV-infected individuals aged 18 years or more enrolled the INI cohort between January 1 2000 and December 31 2013. After excluding 59 HIV-infected individuals with past history of CVD and 32 who had no CD4+ cell count during follow-up, 3384 HIV-

infected individuals were included in the present study (accounting for a total follow-up of 16584 PY), with a median follow-up time of 4.4 years (interquartile range (IQR) 1.9–7.3 years). During the study period, 184 persons had CVD yielding an incidence rate of 11.10/1000 PY (95%CI: 9.60–12.82) and 178 (5.3%) individuals were lost to follow-up, yielding a rate of lost to follow-up of 10.73/1000 PY (95 % CI, 9.27–12.43) (Figure 1).

At baseline, median age was 40.5 years (IQR, 33.1–48.4), 68.3% were male, 50.7% non-white, and 52% had more than 9 years of schooling (Table 1). Tobacco and cocaine use were reported in 65.8% and 7.9%, respectively. The median nadir CD4+ count was 200 (IQR 71–325) cells/mm³ and 86.4% used cART for at least 60 days before end of follow-up. Sixty-five percent of participants had a viral load less than 400 copies/mL in the year prior to their event/end of follow-up. Traditional CVD risk factors such as dyslipidemia, hypertension and diabetes mellitus were present in 46.3%, 20.9% and 10% of all HIV-infected individuals, respectively, and were significantly more prevalent among participants with incident CVD.

In unadjusted analyses, non-white race/ethnicity, last HIV RNA \geq 400 copies/mL, hypertension and tobacco use were associated with increased risk of CVD. High last CD4+ count (350-500 and \geq 500 cells/mL) and high CD4+/CD8+ ratio (0.40-0.69 and \geq 0.7) were protective against CVD (Table 1). The Kaplan-Meier survival curve (Figure 2) illustrates the probability of developing incident CVD over time for HIV-infected individuals who never had severe infections and for those who had severe infections and developed incident CVD <3 months, 3-12 months, and >12 months post discharge.

In the adjusted analysis, non-white race/ethnicity (adjusted hazard ratio (aHR) 1.49, p-value = 0.009), age \geq 60 years (aHR 2.01, p-value = 0.045) and hypertension (aHR 1.90, p-value <

0.001) were associated with an increased hazard of CVD events, while high CD4 counts (≥ 500 cells/mm³: aHR: 0.41, p-value < 0.001), cART use (aHR 0.21, p-value < 0.001) reduced the hazards of CVD events. Also, high CD4⁺/CD8⁺ ratio borderline reduced the risk of CVD (≥ 0.7 , aHR 0.66, p-value = 0.062) (Figure 3).

Severe infections during follow-up was strongly associated with incident CVD (Figure 3), greatly increasing the risk of CVD <3 months post discharge (aHR 4.52, 95% CI 2.46–8.30) and 3-12 months post discharge (aHR 2.39, 95% CI 1.30–4.38).

Discussion

Over time, the spectra of CVD risk factors in the general population have expanded to include short term risk factors or triggers such as community acquired pneumonia (CAP) [26–28], influenza-like illness [29], urinary tract infections [30] and gastroenteritis [31].

In this study we investigated the association between severe infections and subsequent development of cardiovascular diseases in a large, well-characterized cohort of HIV-infected individuals in a middle-income country. We demonstrated that, after controlling for traditional and HIV-related CVD risk factors, severe infections greatly increased the risk of CVD in the year following the hospital discharge. Moreover, we observed a time-dependent association where the risk of incident CVD was higher in the first 3 months post hospital discharge and remained high for as long as 1 year after hospital discharge. Prior studies have shown a positive association between acute infections and subsequent CVD [32,26,27] in the general population, but this association remained unknown among HIV-infected individuals. To our knowledge, this study is the first to explore the association between severe infections and CVD risk among HIV-infected individuals.

Hospitalization for infections is associated with an inflammatory state and a pro-coagulant activity that can persist long after infection resolves [33,34]. Corrales-Medina and colleagues [26] recently demonstrated that the positive association between hospital admission for pneumonia and subsequent development of CVD can persist for as long as 10 years after hospital discharge. In the same way, we observed a time-dependent effect where the association between hospitalization for severe infections and the development of CVD remained high up to 1 year after hospital discharge. These findings provide useful information for HIV/AIDS caregivers regarding a possible benefit of a more aggressive approach aimed at reducing CVD risk factors by modulating pro-inflammatory and pro-coagulant state among individuals who survive a severe infection event, for example with statins and anti-thrombotics.

cART is able to attenuate inflammation and endothelial dysfunction among HIV-infected individuals [35,36]. Moreover, an overall benefit of cART use on CVD risk has been demonstrated [37–39]. In the same way, we observed a protective effect of cART use on incident CVD among HIV-infected individuals who survive hospitalization for severe infections. Previous data from our group demonstrated a protective effect of virologic suppression and preservation of CD4+ T-lymphocyte counts on incident CVD [17]. In the same way, we observed a borderline association between high CD4+/CD8+ ratio (≥ 0.7) and a reduced hazard of CVD events, although different cardiovascular diseases definitions were applied in the two studies.

There are limitations to the current study that deserve mention. First, its observational design limited our ability to control for unknown sources of confounding and bias. Second, we only

captured hospitalizations at the INI hospital, which could underestimate severe infections and CVD incidence in this cohort. However, INI is the referral center for HIV-infected individuals experiencing serious hospitalizations such that missing data due to hospitalizations outside INI were likely minimized. Lastly, acute myocardial infarction (AMI) was not differentiated into specific types [40], which could have added important information as recent evidence suggests that the prevalence of type 2 AMI is higher among HIV-infected individuals compared to general population [41].

Conclusions

Here we demonstrate the association between severe infections and subsequent development of CVD in a large, clinical cohort of HIV-infected individuals in a middle-income country. Our result strengthens the evidence towards an overall benefit of early cART initiation and identifies a specific population that may benefit from an aggressive approach aimed at reducing modifiable cardiovascular disease risk factors.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the patients who made this study possible.

Authors' contributions

ECM and LEC conceived of the study, participated in its design, managed the data, conducted the statistical analyses and drafted the manuscript. FAB, PML, BG and VGV conceived of the study and participated in its design and coordination. RTA helped with literature review and drafting of the manuscript. All authors have given final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions

related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Conflicts-of-Interest Disclosure

The authors declare no competing financial interests.

Ethics approval and consent to participate

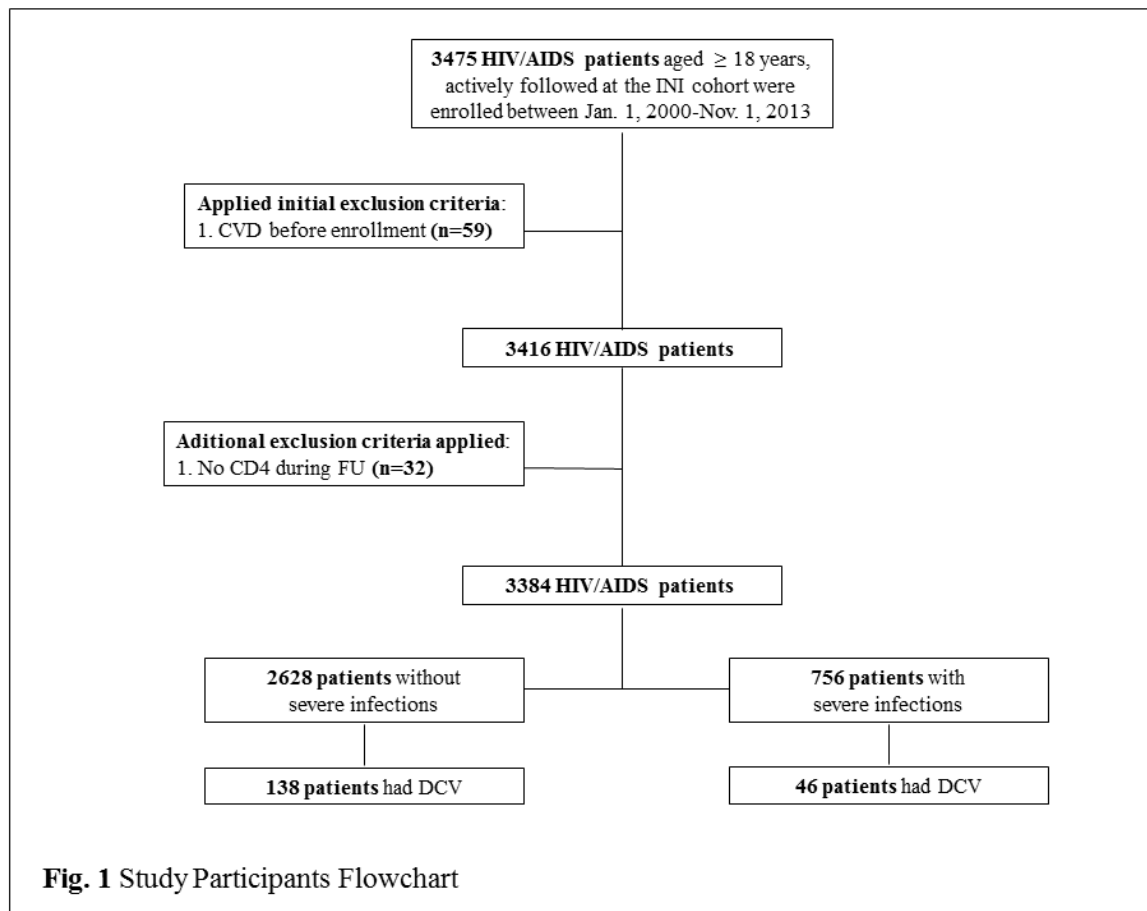
This study was approved by the ethics committee of the INI (CAAE 0032.0.009.000-10) and was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. All patient records/information was de-identified prior to analysis.

References

1. Palella FJ Jr, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks 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.* 1999. 2006;43:27–34.
2. Pacheco AG, Tuboi SH, Faulhaber JC, Harrison LH, Schechter M. Increase in Non-AIDS Related Conditions as Causes of Death among HIV-Infected Individuals in the HAART Era in Brazil. Novotny T, editor. *PLoS ONE.* 2008;3:e1531.
3. Grinsztejn B, Luz PM, Pacheco AG, Santos DVG, Velasque L, Moreira RI, et al. Changing Mortality Profile among HIV-Infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil: Shifting from AIDS to Non-AIDS Related Conditions in the HAART Era. Yazdanpanah Y, editor. *PLoS ONE.* 2013;8:e59768.
4. Rezende ELLF, Vasconcelos AMN, Pereira MG. Causes of death among people living with HIV/AIDS in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* 2010;14:558–63.
5. Freiberg MS, Chang C-CH, Kuller LH, Skanderson M, Lowy E, Kraemer KL, et al. HIV Infection and the Risk of Acute Myocardial Infarction. *JAMA Intern. Med.* 2013;173:614.
6. Sico JJ, Chang C-CH, So-Armah K, Justice AC, Hylek E, Skanderson M, et al. HIV status and the risk of ischemic stroke among men. *Neurology.* 2015;84:1933–40.
7. Butt AA, Chang C-C, Kuller L, Goetz MB, Leaf D, Rimland D, et al. Risk of heart failure with human immunodeficiency virus in the absence of prior diagnosis of coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.* 2011;171:737–43.
8. Tseng ZH, Secemsky EA, Dowdy D, Vittinghoff E, Moyers B, Wong JK, et al. Sudden cardiac death in patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012;59:1891–6.
9. Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased Acute Myocardial Infarction Rates and Cardiovascular Risk Factors among Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92:2506–12.
10. Savès M, Chêne G, Ducimetière P, Leport C, Le Moal G, Amouyel P, et al. Risk factors for coronary heart disease in patients treated for human immunodeficiency virus infection compared with the general population. *Clin. Infect. Dis.* 2003;37:292–298.
11. Lang S, Mary-Krause M, Simon A, Partisani M, Gilquin J, Cotte L, et al. HIV Replication and Immune Status Are Independent Predictors of the Risk of Myocardial Infarction in HIV-Infected Individuals. *Clin. Infect. Dis.* 2012;55:600–7.
12. Paisible A-L, Chang C-CH, So-Armah KA, Butt AA, Leaf DA, Budoff M, et al. HIV Infection, Cardiovascular Disease Risk Factor Profile, and Risk for Acute Myocardial Infarction: JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2015;68:209–16.
13. Young J, Xiao Y, Moodie EEM, Abrahamowicz M, Klein MB, Bernasconi E, et al. Effect of Cumulating Exposure to Abacavir on the Risk of Cardiovascular Disease Events in Patients From the Swiss HIV Cohort Study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999. 2015;69:413–21.
14. DAD Study Group, Friis-Møller N, Reiss P, Sabin CA, Weber R, Monforte A d'Arminio, et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2007;356:1723–35.
15. 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;349:1993–2003.
16. Stein JH, Hsue PY. Inflammation, immune activation, and CVD risk in individuals with HIV infection. *JAMA.* 2012;308:405–6.
17. Diaz CM, Segura ER, Luz PM, Clark JL, Ribeiro SR, De Boni R, et al. Traditional and HIV-specific risk factors for cardiovascular morbidity and mortality among HIV-infected adults in Brazil: a retrospective cohort study. *BMC Infect. Dis.* [Internet]. 2016 [cited 2016

- Aug 24];16. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1735-4>
18. Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *The Lancet*. 2013;382:1525–33.
 19. Huang L, Quartin A, Jones D, Havlir DV. Intensive care of patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:173–181.
 20. Japiassú AM, Amâncio RT, Mesquita EC, Medeiros DM, Bernal HB, Nunes EP, et al. Sepsis is a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS patients. *Crit Care*. 2010;14:R152.
 21. Greenberg JA, Lennox JL, Martin GS. Outcomes for critically ill patients with HIV and severe sepsis in the era of highly active antiretroviral therapy. *J. Crit. Care*. 2012;27:51–7.
 22. Amancio RT, Japiassu AM, Gomes RN, Mesquita EC, Assis EF, Medeiros DM, et al. The innate immune response in HIV/AIDS septic shock patients: a comparative study. *PloS One*. 2013;8:e68730.
 23. Grinsztejn B, Veloso VG, Friedman RK, Moreira RI, Luz PM, Campos DP, et al. Early mortality and cause of deaths in patients using HAART in Brazil and the United States. *AIDS Lond. Engl.* 2009;23:2107–14.
 24. Ribeiro SR, Luz PM, Campos DP, Moreira RI, Coelho L, Japiassu A, et al. Incidence and determinants of severe morbidity among HIV-infected patients from Rio de Janeiro, Brazil, 2000-2010. *Antivir. Ther.* 2014;19:387–97.
 25. WHO | Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. WHO. [cited 2016 Sep 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
 26. Corrales-Medina VF, Alvarez KN, Weissfeld LA, Angus DC, Chirinos JA, Chang C-CH, et al. Association Between Hospitalization for Pneumonia and Subsequent Risk of Cardiovascular Disease. *JAMA*. 2015;313:264.
 27. Ramirez J, Aliberti S, Mirsaeidi M, Peyrani P, Filardo G, Amir A, et al. Acute Myocardial Infarction in Hospitalized Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 2008;47:182–7.
 28. Corrales-Medina VF, Serpa J, Rueda AM, Giordano TP, Bozkurt B, Madjid M, et al. Acute Bacterial Pneumonia is Associated With the Occurrence of Acute Coronary Syndromes: Medicine (Baltimore). 2009;88:154–9.
 29. Ludwig A, Lucero-Obusan C, Schirmer P, Winston C, Holodniy M. Acute cardiac injury events ≤ 30 days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010–2012. *BMC Cardiovasc. Disord.* [Internet]. 2015 [cited 2016 Mar 29];15. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2261/15/109>
 30. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:2611–2618.
 31. Baylin A, Hernandez-Diaz S, Siles X, Kabagambe EK, Campos H. Triggers of Nonfatal Myocardial Infarction in Costa Rica: Heavy Physical Exertion, Sexual Activity, and Infection. *Ann. Epidemiol.* 2007;17:112–8.
 32. Corrales-Medina VF, Madjid M, Musher DM. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 2010;10:83–92.
 33. Yende S, D’Angelo G, Kellum JA, Weissfeld L, Fine J, Welch RD, et al. Inflammatory Markers at Hospital Discharge Predict Subsequent Mortality after Pneumonia and Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008;177:1242–7.
 34. Yende S, D’Angelo G, Mayr F, Kellum JA, Weissfeld L, Kaynar AM, et al. Elevated Hemostasis Markers after Pneumonia Increases One-Year Risk of All-Cause and Cardiovascular Deaths. Bozza PT, editor. *PLoS ONE*. 2011;6:e22847.

35. 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.* 1999. 2012;60:128.
36. Bernal E, Saban J. Hyper-inflammation and Endothelial Activation in HIV Infected Patients with Detectable and Undetectable Viral Load. *J. AIDS Clin. Res.* [Internet]. 2012 [cited 2016 Sep 21];03. Available from: <http://www.omicsonline.org/2155-6113/2155-6113-3-164.digital/2155-6113-3-164.html>
37. Bozzette SA, Ake CF, Tam HK, Chang SW, Louis TA. Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:702–10.
38. Phillips AN, Carr A, Neuhaus J, Visnegarwala F, Prineas R, Burman WJ, et al. Interruption of antiretroviral therapy and risk of cardiovascular disease in persons with HIV-1 infection: exploratory analyses from the SMART trial. *Antivir. Ther.* 2008;13:177–87.
39. Torriani FJ, Komarow L, Parker RA, Cotter BR, Currier JS, Dubé MP, et al. Endothelial Function in Human Immunodeficiency Virus-Infected Antiretroviral-Naive Subjects Before and After Starting Potent Antiretroviral Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008;52:569–76.
40. Thygesen K, Alpert JS, White HD, on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, TASK FORCE MEMBERS: Chairpersons: Kristian Thygesen (Denmark), Joseph S. Alpert (USA), Harvey D. White (New Zealand), Biomarker Group: Allan S. Jaffe, Coordinator (USA), Fred S. Apple (USA), Marcello Galvani (Italy), Hugo A. Katus (Germany), L. Kristin Newby (USA), Jan Ravkilde (Denmark), et al. Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation.* 2007;116:2634–53.
41. Crane HM, Paramsothy P, Drozd DR, Nance RM, Delaney JAC, Heckbert SR, et al. Types of Myocardial Infarction Among Human Immunodeficiency Virus–Infected Individuals in the United States. *JAMA Cardiol.* 2017;2:260.

Figures, tables and legends

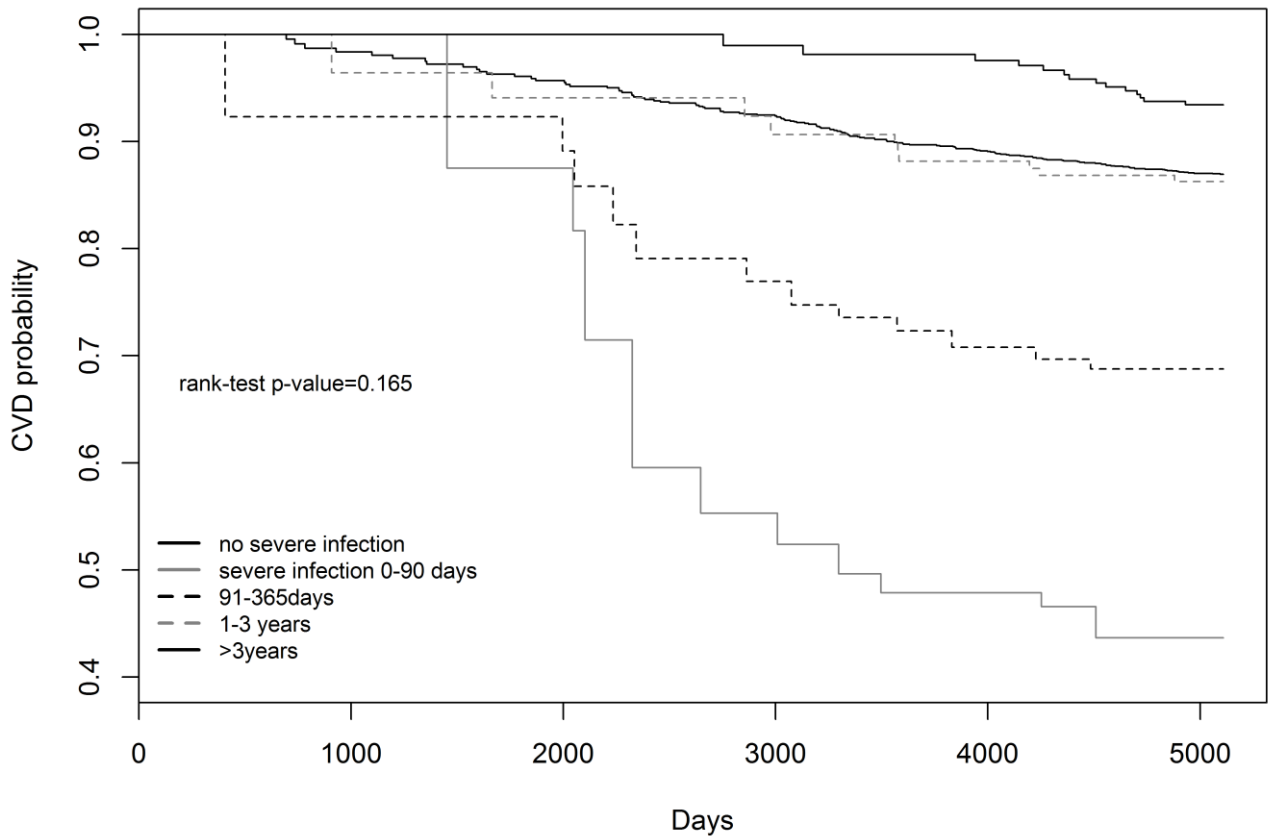


Fig. 2 Kaplan-Meier survival curve illustrating the probability of CVD over follow-up time for patients with no severe infection and with severe infection: < 3 months post hospital discharge; 3-12 months post hospital discharge; > 12 months hospital discharge.

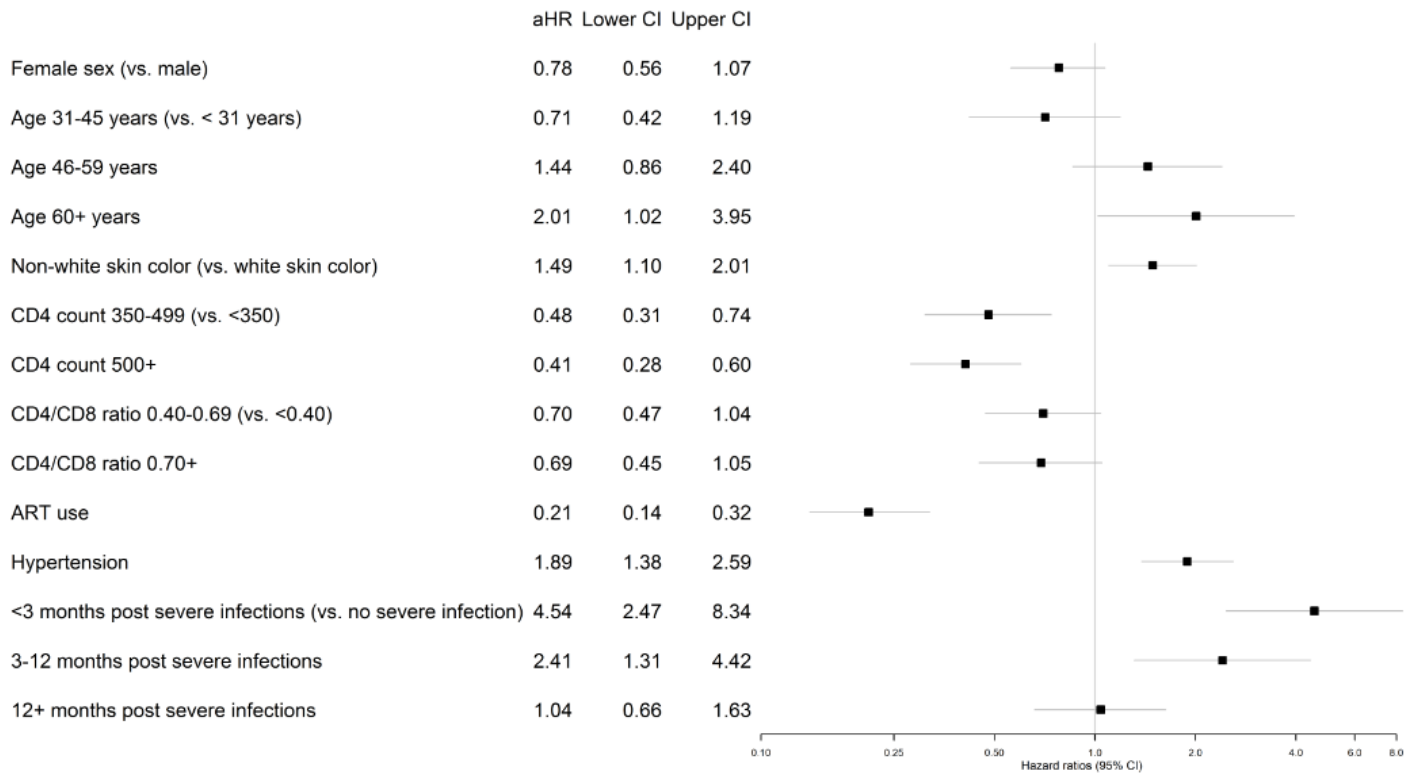


Fig. 3 Adjusted incidence rate ratios for associations between cardiovascular disease (CVD) events and patient demographics and clinical characteristics.

Table 1. Characteristics of the study population.

	No CVD (N=3200;16029.2 PY)	Had CVD (N=184;554.4PY)	All patients (N=3384; 16583.7PY)	crude HR (95% CI)
Median FU in years (IQR)	4.5 (2,7.3)	2 (0.6,4.3)	4.4 (1.9,7.3)	
Sex				
Male	2180 (68.1)	130 (70.7)	2310 (68.3)	ref.
Female	1018 (31.8)	56 (29.9)	1074 (31.7)	0.80 (0.58, 1.10)
Age in years at end of FU				
median (IQR)	40.2 (32.9,48.1)	46.6 (37.8,53.5)	40.5 (33.1,48.4)	
≤30 (%)	409 (12.8)	16 (8.7)	425 (12.6)	ref.
31-45 (%)	1692 (52.9)	64 (34.8)	1756 (51.9)	0.53 (0.31, 0.89)
46-59 (%)	958 (29.9)	88 (46.7)	1044 (30.9)	0.97 (0.58, 1.61)
≥60 (%)	141 (4.4)	18 (9.8)	159 (4.7)	1.34 (0.69, 2.60)
Race/ethnicity				
white (%)	1585 (49.5)	83 (45.1)	1668 (49.3)	ref.
non-white (%)	1615 (50.5)	101 (54.9)	1716 (50.7)	1.56 (1.16, 2.09)
Educational level				
up to 9 years (%)	1518 (47.4)	107 (58.2)	1625 (48)	ref.
more than 9 years (%)	1682 (52.6)	77 (41.8)	1759 (52)	0.67 (0.50, 0.90)
CD4 nadir (cells/mm ³)				
median(IQR)	204 (71.8,326.2)	140 (53,306)	200 (71,325)	1.03 (0.93, 1.13)
> 350 (%)	677 (21.2)	33 (17.9)	710 (21)	---
201-350 (%)	939 (29.3)	40 (21.7)	979 (28.9)	---
51-200 (%)	960 (30)	68 (37)	1028 (30.4)	---
≤ 50 (%)	624 (19.5)	43 (23.4)	667 (19.7)	---
Last HIV RNA ^a (copies/mL)				
< 400 (%)	2116 (66.1)	108 (58.7)	2224 (65.7)	ref.
≥400 (%)	746 (23.3)	62 (33.7)	808 (23.9)	2.40 (1.75, 3.31)
missing (%)	338 (10.6)	14 (7.6)	352 (10.4)	---
Last CD4 ^a (cells/mm ³)				
median (IQR)	544.5 (341,741.2)	397 (222.5,645.5)	537 (330.5,739)	
<350 (%)	765 (23.9)	80 (43.5)	845 (25)	ref.
350-499 (%)	540 (16.9)	28 (15.2)	568 (16.8)	0.40 (0.26, 0.63)
≥500 (%)	1663 (52)	71 (38.6)	1734 (51.2)	0.27 (0.19, 0.37)
missing (%)	232 (7.2)	5 (2.7)	237 (7)	---
Last CD4:CD8 ratio ^a				
<0.40 (%)	865 (27)	79 (42.9)	944 (27.9)	ref.
0.40-0.69 (%)	894 (27.9)	46 (25)	940 (27.8)	0.49 (0.34, 0.69)
≥0.70 (%)	1157 (36.2)	44 (23.9)	1201 (35.5)	0.33 (0.23, 0.47)
missing (%)	708 (22.1)	21 (11.4)	729 (21.5)	---
ART use ^b	2781 (86.9)	144 (78.3)	2925 (86.4)	0.26 (0.18, 0.38)
Hypertension	626 (19.6)	82 (44.6)	708 (20.9)	2.10 (1.56, 2.84)
Diabetes	311 (9.7)	28 (15.2)	339 (10)	1.23 (0.81, 1.86)
Dyslipidemia	1466 (45.8)	101 (54.9)	1567 (46.3)	0.93 (0.69, 1.26)
Tobacco ^c	1802 (56.3)	117 (63.6)	1919 (56.7)	1.20 (0.88, 1.63)
Cocaine ^c	255 (8)	13 (7.1)	268 (7.9)	0.69 (0.40, 1.23)
Severe infections				
no severe infections	2490 (77.8)	138 (75)	2628 (77.7)	ref.
severe infections				5.02 (2.64, 9.56)
0-90 days	45 (1.4)	10 (5.4)	55 (1.6)	
severe infections				2.32 (1.28, 4.18)
91-365 days	80 (2.5)	12 (6.5)	92 (2.7)	
severe infections				0.99 (0.59, 1.59)
> 1 year	585 (18.3)	24 (13)	609 (18)	

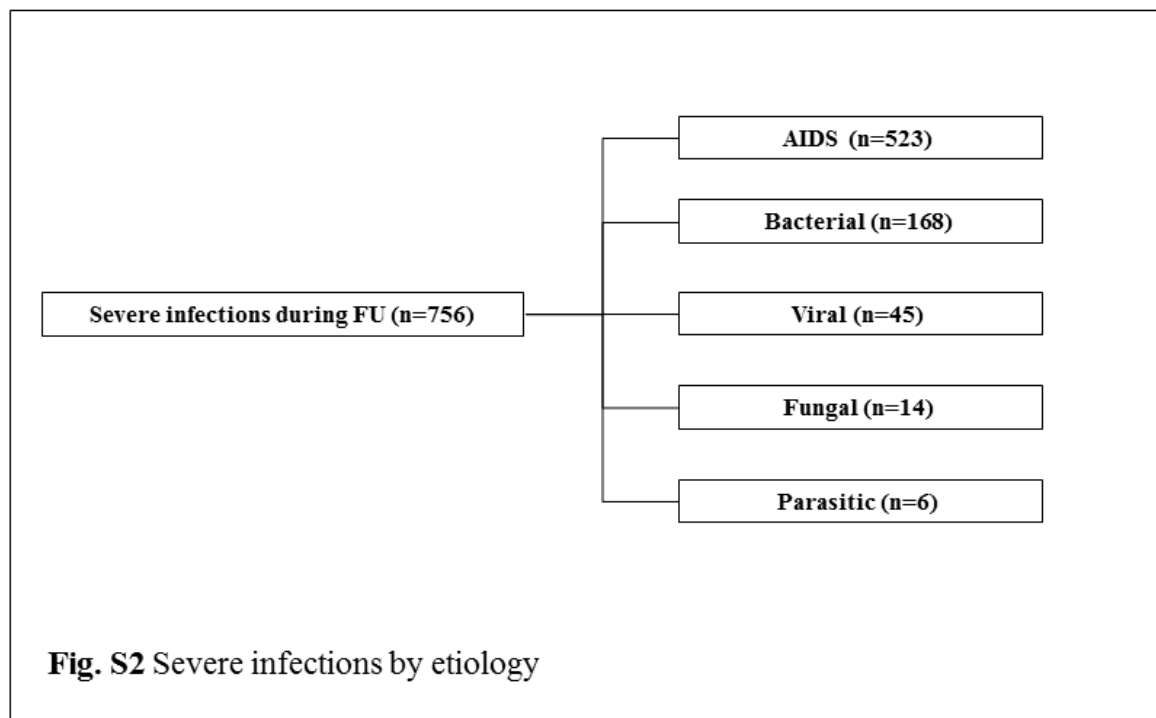
CVD: cardiovascular disease; PY: persons-year; IQR: interquartile range; FU: follow-up; ART: antiretroviral therapy

^a Within the last year of follow-up; ^b Defined as those who had 90 days or more of exposure to at least three antiretroviral drugs; ^c Ever use.

Table S1. Incident cardiovascular diseases among HIV/AIDS patients during follow-up.

Cardiovascular disease	Events (%)	ICD-10
Coronary heart disease (CHD)	76 (41.30)	I20.9, I21, I21.9,
Stroke	34 (18.47)	I61.9, I62.0, I63, I63.9, I64, I63.9
Peripheral arterial disease	15 (8.15)	I74.3, I74.3
Deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism	12 (6.52)	I82.8, I82.9, I26.9
Other cardiovascular diseases*	47 (25.54)	I42, I47.1, I48, I49.0, I49.9, R57

*Disorders of heart muscle (cardiomyopathy) and rhythm.



5.2 Artigo 2: Persistência da ativação plaquetária e apoptose em indivíduos infectados pelo HIV. (*Persistent platelet activation and apoptosis in virologically suppressed HIV-infected individuals.*)

Este artigo investiga a função plaquetária em indivíduos infectados pelo HIV-1 e controlados virologicamente através da TARV. Citometria de fluxo e microscopia de fluorescência foram utilizadas para avaliar parâmetros de ativação, função mitocondrial e apoptose em plaquetas de pacientes e controles. Observamos maior ativação (expressão de P-selectina e espalhamento na superfície de fibrinogênio), disfunção mitocondrial (despolarização mitocondrial e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio) e apoptose (fosfatidilserina e caspase-9) na plaqueta de pacientes, comparada à plaqueta controle. *Ex-vivo*, estímulos com trombina induziram níveis mais baixos de translocação de P-selectina e secreção de RANTES, mas não na síntese de TXA₂, sugerindo que a capacidade sintética encontra-se intacta e que o dano maior encontra-se na fisiologia dos grânulos- α . De fato, a microscopia de fluorescência evidenciou diminuição no conteúdo granular na plaqueta de pacientes, comparada com controles. Estes dados evidenciam uma alteração na função plaquetária durante a infecção pelo HIV-1, alterações estas potencialmente envolvidas na gênese das complicações de longo prazo, como as doenças cardiovasculares.

5.2 ARTIGO 2

Title: Persistent platelet activation and apoptosis in virologically suppressed HIV-infected individuals

Running title: Platelet activation in HIV-infected individuals under stable cART

Authors:

Emersom C. Mesquita, MD^{1*}; Eugenio D. Hottz, PhD^{3,4*}; Rodrigo T. Amancio, MD, PhD¹; Alan B. Carneiro, PhD³; Lohanna Palhinha, MSc³; Lara E. Coelho, MD, PhD²; Beatriz Grinsztejn, MD PhD²; Guy A. Zimmerman, MD⁶; Matthew T. Rondina MD⁶; Andrew Wayrich, MD, PhD⁶; Patrícia T. Bozza, MD PhD³; and Fernando A. Bozza, MD PhD^{1,5}.

Institution:

Laboratório de Medicina Intensiva¹ and Laboratório de HIV², Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Rio de Janeiro, Brazil;

Laboratório de Imunofarmacologia³, Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil;

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil;

D'Or Institute for Research and Education (IDOr)⁵, Rio de Janeiro, Brazil;

Department of Medicine⁶, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA.

*First authors contributed equally

Corresponding Author: Fernando A. Bozza, M.D., Ph.D.

Email: bozza.fernando@gmail.com or fernando.bozza@ini.fiocruz.br

Address: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), FIOCRUZ, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Zip code: 21045-900

Abstract

Introduction: Cardiovascular diseases and thrombotic events became major clinical problems in the combined antiretroviral therapy (cART) era. Although the precise mechanisms behind these clinical problems have not been fully elucidated, a persistent pro-inflammatory state plays a central role. As platelets play important roles on both, thrombus formation and inflammatory/immune response, we aimed at investigating platelet function in HIV-infected subjects virologically controlled through cART. **Methods:** Flow cytometry and confocal fluorescence microscopy were used to evaluate parameters of activation, mitochondrial function and activation of apoptosis pathways in platelets from 19 HIV-infected individuals under stable cART and 30 healthy volunteers. Platelet activation and secretion in response to thrombin-stimulation were also assessed. **Results:** Despite viral control achieved through cART, HIV-infected individuals exhibited increased platelet activation as indicated by P-selectin expression and platelet spreading when adhered on fibrinogen-coated surfaces. Platelets from HIV-infected subjects also exhibited mitochondrial dysfunction as evidenced by mitochondrial depolarization and increased generation of reactive oxygen species. Activation of apoptosis pathways was evidenced by phosphatidylserine exposure and caspase-9 activation. Finally, thrombin stimuli induced lower levels of P-selectin translocation and RANTES secretion, but not TXA₂ synthesis, in platelets from HIV-infected individuals compared to control; and labeling of platelet alpha granules with wheat germ agglutinin shows reduced granule content in platelets from HIV-infected individuals compared to control. **Conclusions:** Here we demonstrate that platelets derived from HIV-infected individuals, virologically controlled through cART, exhibit a phenotype of increased activation, activation of the intrinsic pathway of apoptosis and an undermined response to thrombin stimuli, when compared to control platelets.

Introduction

Combined antiretroviral therapy (cART) is the cornerstone in the treatment of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-infected individuals (1, 2). Despite the viral control achieved through cART, HIV-infected individuals experience higher rates of long-term comorbidities such as cardiovascular diseases and non-AIDS cancers (3-7). Nowadays, ischemic thrombotic events represent one of the most frequent long-term complications and cause of death among virologically suppressed HIV-1 individuals (7-11). Many of long-term complications in HIV-infected individuals, including cardiovascular events, are related to continuing immune suppression (3, 9, 10) and associated with a persistent inflammatory state (12-14).

Platelets are highly specialized and essential effector cells in hemostasis. Aside from their role in coagulation, platelets are also major inflammatory cells with key roles in innate and adaptive immune responses (15, 16). Activated platelets mediate inflammatory and immune responses by a variety of mechanisms, including release of stored chemokines and interactions with leukocytes through P-selectin-mediated adhesion (16, 17). It has been previously shown that HIV-infected individuals present increased platelet activation (18-22). Platelet activation correlates with measures of immune and inflammatory activation in HIV-infected individuals (18-20), and the levels of P-selectin surface expression associate with viral loads (18, 19, 21). However, it is not known whether platelet activation persists in HIV-infected individuals virologically suppressed through ART.

Leukocytes are highly susceptible to apoptosis in HIV-1-infected individuals (23-25). Intrinsic cell death pathways, originally described to nucleated cells, were recently demonstrated in platelets (26, 27), but whether platelet apoptosis takes place in HIV-infected individuals has not been previously investigated. Here we show that platelets from subjects living with HIV under stable ART present increased platelet activation compared to healthy

volunteers. We also demonstrate increased mitochondrial dysfunction and activation of the intrinsic pathway of apoptosis in platelets from HIV-infected individuals. We found evidence that chronic activation in platelet from HIV-infected subjects lead to platelet exhaustion of granule stored factors and lower granule translocation and secretion after thrombin stimulation. Our data indicate that, despite viral suppression, HIV-infected individuals under stable ART present sustained platelet activation and dysfunction, which may impact on persistent inflammation and long-term comorbidities as cardiovascular diseases.

Material and Methods

Ethics Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all volunteers or their surrogate decision makers, prior to any study-related procedure. The Institutional Review Board approved the study protocol (CAAE 0043.0.009.000-11 and IRB_00077138).

Design and setting

Thirty five healthy volunteers and 30 HIV-infected individuals under stable ART were included from the outpatient clinic of the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil or from the Molecular Medicine Program, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA. All samples were collected in the morning. Exclusion criteria for this study included age < 18 years, current use of NSAID or other antithrombotic agents, history of myocardial infarction, co-infection with HCV, HBV or HTLV, co-existing cancer and co-existing active infection.

Platelet Isolation

Platelets were isolated using the methods described by Hamburger & McEver(50). Briefly, peripheral blood samples were drawn into acid-citrate-dextrose (ACD; 3 ml ACD/ 17 ml of blood) coated syringe. Samples were then centrifuged at 200 x g for 20 min to obtain platelet-rich plasma (PRP). PRP was centrifuged at 500 x g for 20 min in the presence of 100 nM PGE₁ (Cayman Chemicals, Michigan, USA). The supernatant was discarded and platelet pellet was resuspended in 25 mL of PIPES/saline/glucose (5 mM piperazine-N,N-bis[2-ethanesulfonic acid], 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂-6 H₂O, and 5.5 mM glucose) containing 100 nM of PGE₁. The platelet suspension was recentrifuged at 500 x g for 20 min, the supernatant was discarded, and the pellet was re-suspended in medium 199 (M199, Lonza Biologics; Basel, Switzerland). All centrifugations were performed in the absence of a brake. The purity of the platelet preparations (greater than 99% CD41⁺ events) was confirmed by flow cytometry.

Flow Cytometry Analysis

Freshly isolated platelets (1×10^7) were re-suspended in 500 μ L of modified Tyrode's (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 11.9 mM NaHCO₃, 0.42 mM NaH₂PO₄ e 4.7 mM glucose; pH 7.4) and analyzed through flow cytometry. The following indices were assessed: P-selectin (CD62-P) surface expression was determined by incubating (37°C for 30 min) platelets with a PE- or FITC-conjugated antibody (1:25 μ g/mL) that targets CD62P (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA); mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured using the cationic probe Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE; Fluka Analytical, St. Gallen, Switzerland) (100 nM at 37°C for 10 min); mitochondria-generated reactive oxygen species (ROS_m) were detected using the cationic probe MitoSOX Red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (2.5 μ M at 37°C for 10 min); activation of caspase-9 was

assessed using the fluorescent probe green FAM-LEDH-FMK, FLICA according to the manufacturer's instructions (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN USA.) and; phosphatidylserine exposure on the surface of platelets was determined using FITC-conjugated Annexin V according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen). Platelets were gated by specific binding to CD41 and characteristic forward and side scattering. A minimum of 10,000 gated events were acquired using a FACS Calibur flow cytometer (BD Bioscience). For each condition, we defined the appropriate color compensations and determined the mean fluorescence intensity (MFI) or the percentage of positive platelets.

In vitro platelet stimulation

Platelets (05×10^6 in 100 μL) from healthy uninfected donors or from HIV-infected individuals were stimulated with 0.05, 0.1, 0.2 or 0.4 U/mL of thrombin (Sigma, T1063; MO, USA), or kept in medium only. Platelet P-selectin surface expression and the concentration of RANTES/CCL5 and TXA₂ in the supernatants were evaluated 1 hour after thrombin stimulation.

Quantification of RANTES and TXA₂ in supernatant

The content of the chemokine RANTES/CCL5 and the eicosanoid TXA₂ in supernatant from thrombin-stimulated platelets were measured using commercially available ELISA and EIA Kits, respectively, according to the manufacturer's instructions (R&D systems and Cayman chemicals, respectively).

Static platelet adhesion assay and confocal microscopy analysis

For platelet spreading experiments, borosilicate glass Lab-Tek chambers were coated with fibrinogen (100 µg/ml, 1 h at 37°C). Platelets (1×10^7) from HIV-infected individuals or healthy volunteers were stimulated with thrombin (0,0 or 0,4 U/mL) for 20 min prior to exposure to fibrinogen coated surfaces. After 1 hour incubation at 37°C, platelets were fixed in 4% paraformaldehyde and washed three times with PBS. Platelets were stained with WGA (Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 555 #W32464) and phalloidin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin #A12379) for 30 min at room temperature and imaged using FV1000 1X81 confocal microscope and FluoView software (Olympus). Images were analyzed using ImageJ version 1.49m software (National Institutes of Health, USA) with Java 1.6.0_24 (64-bit). We developed a macro to analyze the total WGA stained area (red) in each field adjusting the same parameters of color balance, contrast, background and noise. Images were processed so that the threshold setting for quantifying the total and relative area of WGA staining excluded most of interferences from the image acquisition. A different macro was developed for the counting of platelet numbers in each field (phalloidin – green). In this case, threshold was adjusted to consider the differential platelet spreading among groups. Then, total WGA stained area was normalized by the number of platelets in each field and the mean of these measurements was plotted for HIV-infected individuals or healthy volunteers.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA). Kolmogorov-Smirnov test was used to determine whether samples followed normal distribution. Nonparametric Mann Whitney U test was used to determine whether differences were present between two experimental groups. A paired two-tail t-test was used to compare

thrombin-stimulated with non-stimulated platelets from HIV-infected individuals or control group. Correlations were assessed using the Pearson's test.

Results

Clinical characteristics of healthy volunteers and HIV-infected individuals

The demographic and clinical characteristics of the study populations are summarized in **Table 1**. All HIV-infected individuals were under stable cART and had undetectable viral load at study inclusion time. Two nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) plus one non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitor (NNRTI) was the most prevalent combination of antiretrovirals (56%). The median duration of ART up to inclusion was 63.5 months (IQR 38 – 82). The median CD4 cell count at inclusion was 569 cells/mm³ (IQR 242 – 866), and the median time elapsed since HIV-1 diagnosis was 114 months (IQR 63 – 121). There were no differences in platelet counts and coagulation parameters between HIV-infected individuals and healthy volunteers (**Table 1**).

Increased platelet activation in HIV-infected individuals virologically suppressed through ART

To assess whether platelet activation was present in HIV-infected individuals virologically suppressed by ART, platelets from healthy volunteers and HIV-infected individuals were evaluated for P-selectin surface expression. The percent of P-selectin-positive platelets and the intensity of P-selectin labeling (mean fluorescence intensity, MFI) on platelets were significantly ($p < 0.01$) higher in samples from HIV-infected individuals [47.4 % (IQR 27.9 – 55.1) and 34.6 MFI (IQR 19.1 – 64.9)] when compared to healthy volunteers [17.6 % (IQR 15.2 – 31.0) and 17.84 MFI (IQR 13.92 – 22.90)] (**Figure 1A-B**). Next, we evaluated the spreading area of platelets from HIV-infected individuals or healthy volunteers when adhered

to fibrinogen-coated surfaces. As shown in **Figure 1C**, platelets from HIV-infected individuals under cART spread to a significantly ($p < 0.05$) increased area in response to fibrinogen when compared to platelets from healthy volunteers. Altogether, these data indicate increased platelet activation in HIV-1-infected subjects despite viral suppression through stable ART.

Mitochondrial dysfunction and apoptosis in platelets from HIV-infected individuals under stable ART

It has been previously demonstrated that increased platelet activation is associated to mitochondrial dysfunction and activation of the intrinsic pathways of apoptosis (add reference 26 and Jobe et al. *Blood* 2008). To evaluate the mitochondrial function in platelets from HIV-infected individuals, we used the mitochondrial targeted probes TMRE and MitoSox Red, which label mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial-derived ROS (ROS_m), respectively. Mitochondrial specificity of the probes was confirmed by complete depolarization of platelet mitochondria with the proton ionophore FCCP (0.5 μ M, 15 min) as previously reported (28). As shown in **Figure 2A**, basal $\Delta\Psi_m$ was significantly ($p < 0.01$) reduced in platelets isolated from HIV-infected individuals [11.59 MFI (IQ 7.93 – 16.52)] when compared to healthy volunteers [22.39 MFI (IQ 19.64 – 26.93)]. Baseline production of ROS_m was also significantly ($p < 0.05$) higher in platelets from HIV-infected individuals than in controls [12.66 MFI (IQ 10.12 – 25.24) versus 9.61 MFI (IQ 7.95 – 12.11), respectively] (**Figure 2B**).

Mitochondria are important regulators of the intrinsic pathway of apoptosis, and increased mitochondrial dysfunction strongly suggests that apoptotic pathways are more active in platelets (29). To assess activation of apoptosis pathways, we evaluated phosphatidylserine exposure and caspase-9 activation in platelets from HIV-infected

individuals and controls. Platelet phosphatidylserine exposure was significantly higher ($p < 0.01$) in HIV-infected individuals [34.29 % (IQ 15.03 – 55.24)] compared to healthy volunteers [7.30 % (IQ 5.18 – 12.39)] (**Figure 2C**). In addition, caspase-9 activation was increased in platelets isolated from HIV-infected individuals [13.09 (IQ 11.22 – 29.75)] compared to healthy subjects [9.04 (IQ 8.20 – 11.45)] (**Figure 2D**). In association with collapsed mitochondrial function, these data indicate activation of the intrinsic pathway of apoptosis in platelets during HIV-1 infection, even with viral suppression by ART.

Platelet exhaustion in HIV-infected individuals undergoing virological suppression through ART

Next, we determined the platelet response to thrombin stimulation in HIV-infected individuals under stable ART. Platelets from healthy donors or from HIV-infected individuals were incubated with 0.0 to 0.4 U/mL of thrombin according to described in material and methods. Even though platelets from HIV-infected individuals had increased P-selectin surface expression at baseline, P-selectin trafficking to surface in response to thrombin was lower in platelets from HIV-infected individuals compared to control subjects (**Figure 3A-B**). Consistently, higher concentrations of thrombin were necessary to achieve 100% of P-selectin-expressing platelets in samples from HIV-infected individuals than in control (**Figure 3A**). The intensity of P-selectin labeling on platelet surface (MFI) was significantly ($p < 0.05$) increased after thrombin stimuli in both healthy volunteers (270.9 ± 124.1 MFI versus 24.7 ± 11.3 MFI, for 0.4 U/ml of thrombin and unstimulated platelets, respectively) and HIV-infected individuals (119.6 ± 48.7 MFI versus 43.9 ± 23.8 MFI for 0.4 U/mL of thrombin and non-stimulated, respectively). However, P-selectin labeling on thrombin-stimulated platelets was significantly higher in platelets from healthy volunteers than HIV-infected individuals (**Figure 3B**), even with 100% of platelets expressing P-selectin in both groups (**Figure 3A**).

Thrombin stimuli also increased the secretion of the stored chemokine RANTES/CCL5 in platelets from both, HIV-infected individuals (248.9 ± 63.5 pg/ml versus 154 ± 71.3 pg/ml for 0.4 U/mL of thrombin and unstimulated platelets, respectively; $p = 0.043$) and healthy volunteers (930.4 ± 584.2 pg/ml versus 137.1 ± 95.4 pg/ml for 0.4 U/mL of thrombin and unstimulated platelets, respectively; $p = 0.034$). However, chemokine secretion was significantly ($p < 0.05$) lower in platelets derived from HIV-infected individuals compared to healthy volunteers (**Figure 3C**). As both P-selectin and RANTES proteins are pre-formed and stored in platelet α -granules (16), these data suggest exhaustion of platelet granules content in HIV-infected individuals under stable ART.

To assess platelet exhaustion during HIV-1 infection in more depth, we labeled sialic acid residues in α -granules of fibrinogen-adhered platelets using wheat germ agglutinin (WGA) and quantified the area of labeled granules per platelet. As shown in **Figure 4A-B**, platelets from HIV-infected individuals had reduced granule content when compared to platelets from healthy volunteers. Thrombin stimulation significantly ($p < 0.05$) reduced WGA labeled area to the same extent in both HIV and control platelets (**Figure 4B**). Similarly, platelets from HIV-infected individuals increased their spreading area on fibrinogen after thrombin stimulation through the same extent that control platelets (**Figure 4C**). We then measured the levels of thromboxane B₂ (TXB₂), a stable metabolite of the eicosanoid TXA₂, synthesized after platelet stimulation with thrombin. As shown in **Figure 3D**, platelet stimulation with 0.1 to 0.4 U/mL of thrombin significantly ($p < 0.05$) increased the synthesis of TXA₂ compared to unstimulated platelets in both healthy volunteers and HIV-infected individuals. Taken together, these results indicate that platelets from HIV-infected individuals are responsive to thrombin, but secrete lower levels of granule stored factors (RANTES and P-selectin) because of exhausted granule content.

Discussion

Despite viral suppression achieved through cART, HIV-infected individuals have a heightened risk for developing long-term complications, including cardiovascular and thrombotic events (3, 7, 11). Emerging evidence suggests a role for persistent immune activation and dysfunction (10, 13, 30), and platelet activation may play an important role in these outcomes. Here we show that HIV-infected individuals virally suppressed through cART had increased platelet activation and signs of apoptosis when compared to control subjects. Moreover, we observed lower P-selectin surface translocation and RANTES secretion, but not TXA₂ synthesis, after thrombin stimulation of platelets from HIV-infected individuals compared to platelets from healthy volunteers. Chronic activation of platelets from HIV-infected individuals was associated with exhaustion of platelet granule content. Our data demonstrate that platelet activation and dysfunction persists in HIV-infected individuals undergoing viral suppression through cART.

Prior studies have demonstrated increased platelet activation in HIV-infected individuals (18-22). Platelet surface P-selectin expression and plasma markers of platelet activation, such as soluble P-selectin, CD40-L and glycoprotein VI, are increased in HIV-infected individuals and decrease during the first weeks after cART initiation (18, 31). Here we show that, compared to healthy volunteers, platelet activation is still higher in HIV-infected individuals after at mean 60 months of ART.

Although HIV can directly activate platelets (32), other mechanisms for platelet activation should be considered since, according to our data, platelet activation is also observed in virally suppressed HIV-infected individuals. One possible mechanism is microbial translocation, which is a central feature of HIV/AIDS pathogenesis and is still observed for years after antiretroviral treatment (33, 34). According to this hypothesis, platelets express functional TLR4 (35) and lipopolysaccharide binding to TLR4 on platelets

triggers platelet activation (36, 37). Other possibilities are the increased generation of platelet activating factor (PAF) in HIV-1-infected subjects (38-40) and/or the effects of antiretroviral treatment itself. Regarding the latter, abacavir-containing antiretroviral regimens have been shown to associate with increased platelet activation in HIV-infected individuals (41, 42).

Apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals occurs in parallel to collapse of $\Delta\psi_m$ and unbalanced ATP production (24, 43). Follow up of HIV-infected individuals initiating antiretroviral treatment shows significant improvement of mitochondrial function and leukocyte apoptosis, but this cell death phenotype persists under ART and an influence of the treatment itself has been considered (24, 44, 45). We similarly observed mitochondrial dysfunction and apoptosis in platelets from HIV-infected individuals virologically suppressed by ART. Platelets from HIV-infected individuals showed decreased $\Delta\psi_m$, increased generation of ROS_m , increased caspase-9 activity and increased phosphatidylserine exposure, strongly suggesting activation of the intrinsic pathway of apoptosis. Platelet mitochondrial dysfunction and apoptosis is related to thrombocytopenia in other diseases conditions as dengue and sepsis (28, 46, 47). In the present study, we did not observe a relationship of platelet mitochondrial dysfunction and apoptosis with platelet counts (data not shown). Future studies with larger cohorts and greater numbers of thrombocytopenic HIV-infected individuals will be necessary to address the role of platelet apoptosis in HIV-1-associated thrombocytopenia.

We also observed that HIV-infected individuals under stable ART presented platelet exhaustion, with reduced P-selectin translocation and RANTES secretion, but normal TXA_2 synthesis, in response to thrombin stimulation. Holme and colleagues (18) have previously demonstrated lower secretion of RANTES by platelets from HIV-1-infected subjects after stimulation with thrombin receptor agonist peptide. In this study, RANTES secretion by platelets from HIV-infected individuals reached closer to normal levels after 12 weeks of

antiretroviral treatment, even though remained different from healthy volunteers (18). Accordingly, our results show lower RANTES secretion by thrombin-stimulated platelets from HIV-infected individuals even under stable ART. In contrast to the lower platelet degranulation in response to thrombin observed in our study, increased aggregation response due to ADP, collagen or arachidonic acid stimulation was reported in platelets from HIV-infected individuals under stable antiretroviral treatment (48). These data suggest that persistent platelet activation in HIV-1-infected subjects virologically suppressed by ART may have as consequence not only a deficient release of granule-stored factors, but also hyperreactive aggregation response and thrombus formation.

Our study has limitations. Because of the cross-sectional design and small sample size in this study we could not address the potential effects of different ART regimens on platelet physiology. Also, we observed a small difference in age between HIV-infected individuals and controls. However, age is not classically associated with P-selectin expression in other studies (19, 49).

In summary, we report increased platelet activation, mitochondrial dysfunction and apoptosis in platelets from HIV-infected individuals under stable ART. We also provide evidence for platelet exhaustion as a possible consequence of chronic platelet activation during HIV-1 infection. To our knowledge, this is the first description of platelet apoptosis in HIV-1-infected subjects. These data demonstrate that platelets are persistently activated during HIV-1 infection, even though viral suppression is achieved through ART. Each of these cellular events potentially contributes to sustained inflammation and increased cardiovascular risk in HIV-infected individuals undergoing virological suppression through ART.

Acknowledgements

E.C.M. and E.D.H. wrote the manuscript; E.C.M., E.D.H., and A.B.C. performed the experiments; E.C.M., R.T.A, L.E.C. and B.G. enrolled the patients; E.C.M., E.D.H., M.T.R., L.P., F.A.B., and P.T.B. analyzed the data; F.A.B., P.T.B., G.A.Z., M.T.R., A.W. and B.G. designed the study; P.T.B. and F.A.B. directed all aspects of the study. All authors critically revised and approved the manuscript.

We thank Joseph Aslan for critical discussion of the study and Edson Fernandes de Assis for technical assistance.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and PAPES/Fiocruz.

Conflicts-of-Interest Disclosure

The authors declare no competing financial interests.

Figures, tables and legends

Table 1: Clinical and laboratory characteristics of controls and HIV-infected individuals.

	Controls (n = 36)	HIV/AIDS (n = 30)
Age (years)	30 (27 – 35)	45 (38 - 50)*
Gender (male)	14 (38.8%)	14 (46.6%)
TCD4 ⁺ cell count (per mL)	-	526 (258 – 862)
Nadir TCD4 ⁺	-	243 (71 – 550)
HIV-1 Viral load (x 10 ³ copies/mL)	-	Undetectable
Time since HIV diagnosis (months)	-	114 (63 – 121)
cARV	-	30 (100%)
NRTI + NNRTI	-	18 (60%)
NRTI + PI/R	-	9 (30%)
NRTI + INSTI	-	3 (10%)
Platelet count (x 10 ³)	196 (153 – 238)	205.8 (143 – 213)
APT (%)	71 (67 – 87)	85 (70 – 94)
PTT (Seconds)	30 (28 – 32)	29 (24 – 31)
INR	1,18 (1,0 – 1,2)	1,1 (1,0 – 1,2)

Results are expressed as median and interquartile range (IQR). NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor; INSTI, integrase inhibitor; APT, activated prothrombin time; PTT, partial thromboplastin time; INR, international normal ratio. * p< 0.05;

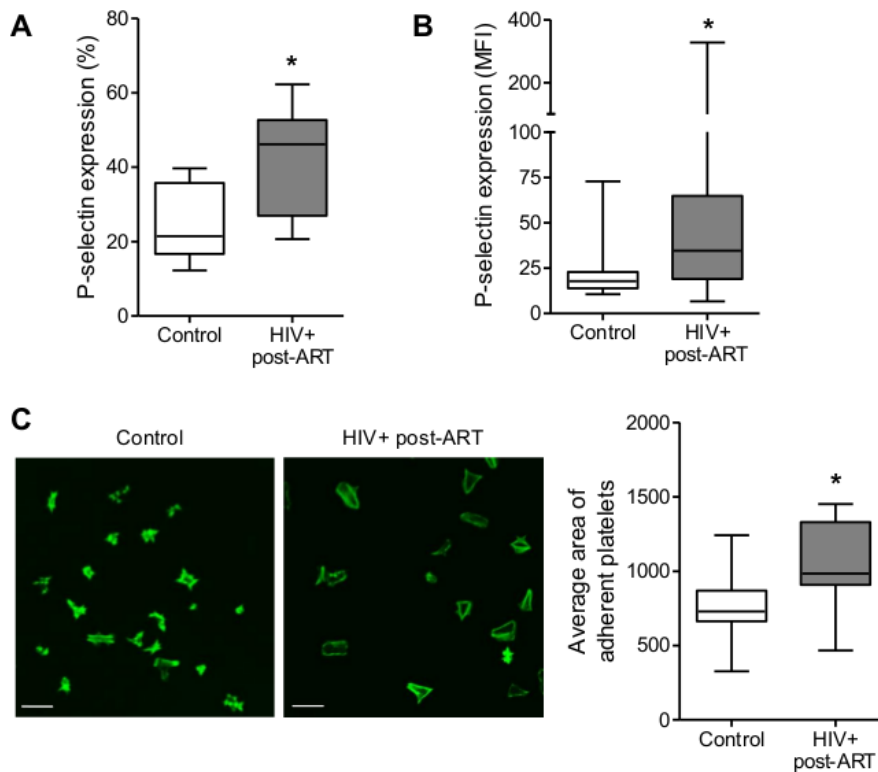


Figure 1: Increased platelet activation in HIV-infected individuals under stable ART. (A-B) The percentage of platelets with P-selectin surface expression (A) and the mean fluorescence intensity (MFI) for P-selectin labeling on platelets (B) were assessed in freshly-isolated platelets from healthy subjects (control) or from HIV-infected individuals under viral control (undetectable HIV-1 viral load in the peripheral blood). (C) Average area of spontaneous spreading on fibrinogen-coated surfaces by platelets from control or HIV-1-infected subjects labeled with phalloidin. Images are representative of eight HIV-infected individuals and healthy volunteers analyzed in parallel. Scale bars represent 10 μm . The boxes indicate the median and interquartile ranges and the whiskers indicate 5-95 percentile. The asterisk (*) signifies $p < 0.05$ compared to healthy volunteers.

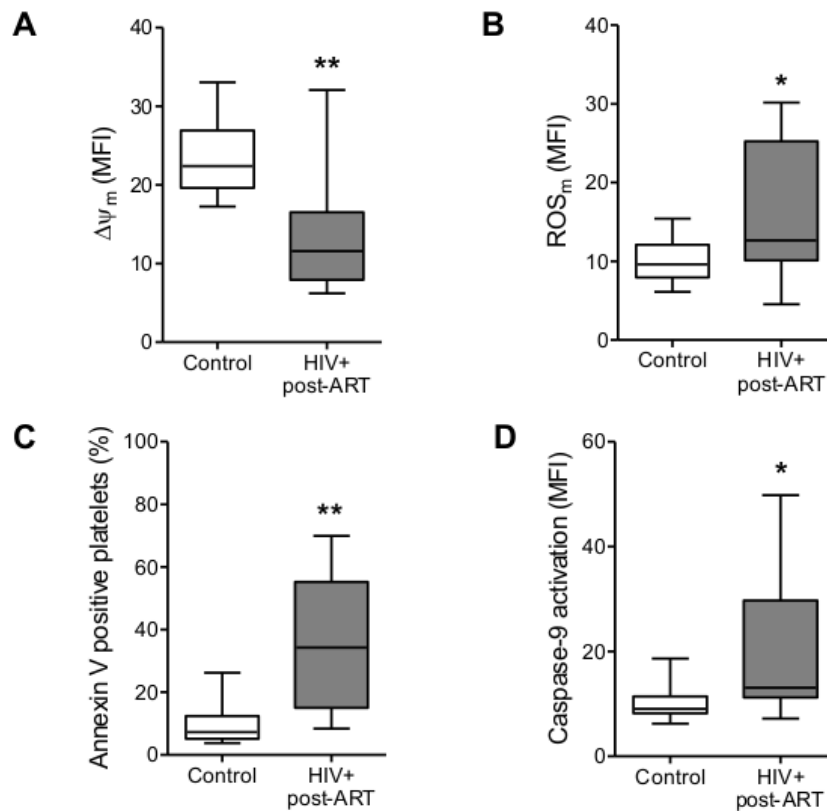


Figure 2: Mitochondrial dysfunction and apoptosis in platelets from HIV-infected individuals under stable ART. (A) The mean fluorescence intensity (MFI) for TMRE indicating the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), (B) the MFI for MitoSoxRed indicating mitochondrial generation of reactive oxygen species (ROS_m), (C) the percentage of platelets that bind annexin V, and (D) the MFI for the probe FLICA indicating caspase-9 activation were assessed in platelets freshly-isolated from healthy volunteers (control) or from HIV-infected individuals under viral control (HIV-1 viral load < 50 copies/ml in the peripheral blood). The boxes indicate the median and interquartile ranges and the whiskers indicate 5-95 percentile. The asterisk (*) signify $p < 0.05$ compared to healthy volunteers.

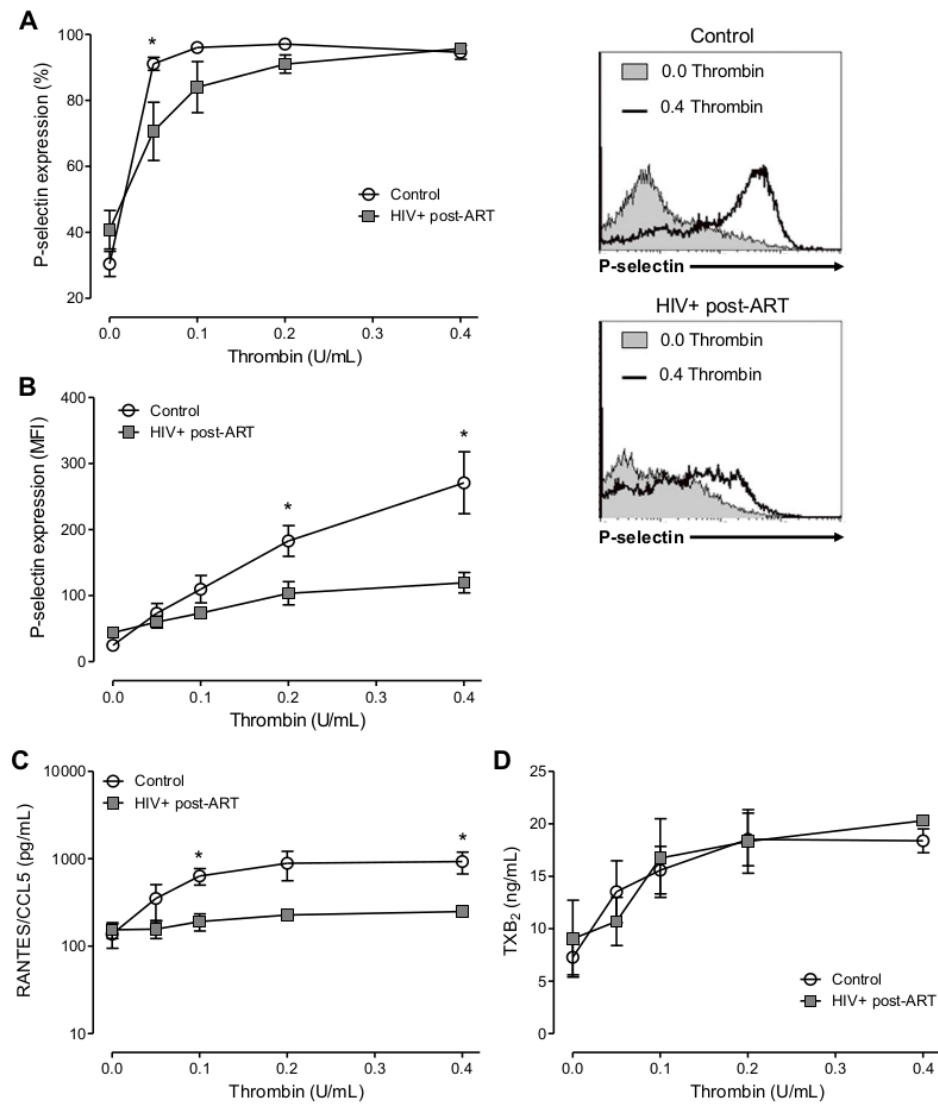


Figure 3: Platelet response to thrombin in platelets from HIV-infected individuals under stable ART and healthy volunteers. (A-B) The percentage of platelets with P-selectin surface expression (A) and the mean fluorescence intensity (MFI) for P-selectin labeling (B) on platelets from healthy subjects (control) or from HIV-infected individuals under viral control (HIV-1 viral load < 50 copies/ml in the peripheral blood) after stimulation with thrombin (0.05 UI/mL, 0.1 UI/mL, 0.2 UI/mL and 0.4 U/mL). (C-D) The concentration of RANTES (C) or thromboxane B₂ (D) in the supernatant of platelets from control or HIV-1-infected subjects stimulated with each concentration of thrombin. The dots indicate the mean \pm standard error of the mean of 5-10 HIV-infected individuals or healthy volunteers. Representative histograms are shown. The asterisk (*) signifies $p < 0.05$ between platelets from control or healthy volunteers stimulated with the same concentration of thrombin.

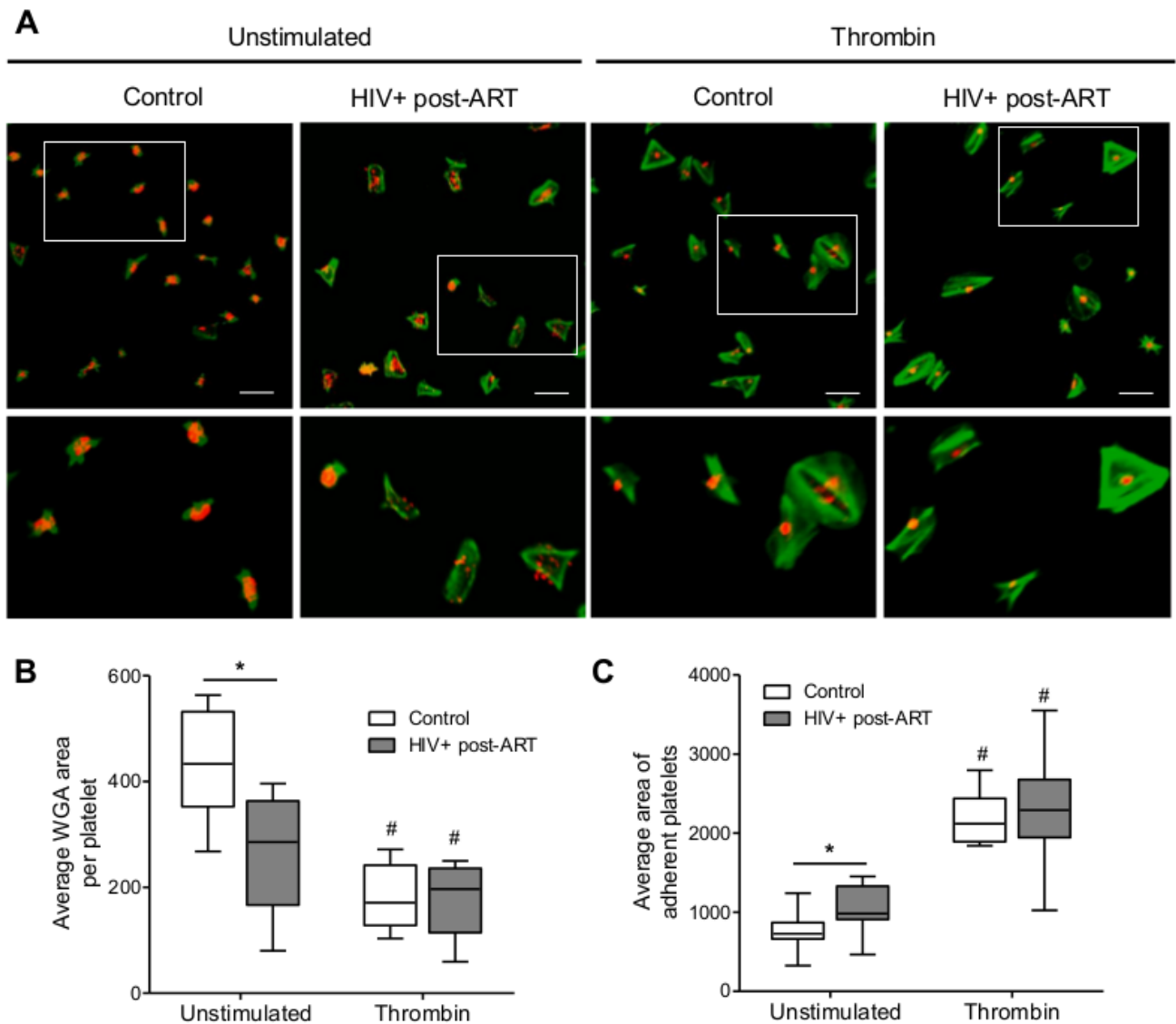


Figure 4: Thrombin-induced platelet spreading and degranulation in HIV-infected individuals under stable ART and healthy volunteers. (A) Platelets from healthy subjects (control) or HIV-infected individuals under viral control (HIV-1 viral load < 50 copies/ml in the peripheral blood) were stimulated with thrombin (0,0 or 0,4 U/mL), adhered to fibrinogen-coated surfaces and labeled with phalloidin (green) and wheat germ agglutinin (WGA – red) as described in methods. (B) Average area of WGA labeling per platelet number in each field for unstimulated or thrombin-stimulated platelets from control or HIV-1-infected subjects. (C) Average area of spontaneous or thrombin-induced platelet spreading on fibrinogen-coated surfaces in each condition. Images are representative of eight HIV-infected individuals and healthy volunteers analyzed in parallel. Scale bars represent 10 μ m. The boxes indicate the median and interquartile ranges and the whiskers indicate 5-95 percentile. The asterisk (*) signify $p < 0.05$ compared to healthy volunteers and # means $p < 0.05$ compared to unstimulated platelets.

References

1. Lewden C, Chene G, Morlat P, et al. HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm³ 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.
2. Dore GJ, Li Y, McDonald A, et al. 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.
3. Marin B, Thiebaut R, Bucher HC, et al. Non-AIDS-defining deaths and immunodeficiency in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2009 Aug 24;23(13):1743-53.
4. Casper C. The increasing burden of HIV-associated malignancies in resource-limited regions. *Annu Rev Med* 2011;62:157-70.
5. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007 Jul 7;370(9581):59-67.
6. Hasse B, Ledergerber B, Furrer H, et al. Morbidity and aging in HIV-infected persons: the Swiss HIV cohort study. *Clin Infect Dis* 2011 Dec;53(11):1130-9.
7. Goehringer F, Bonnet F, Salmon D, et al. Causes of Death in HIV-Infected Individuals with Immunovirologic Success in a National Prospective Survey. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2017 Feb;33(2):187-93.
8. d'Arminio A, Sabin CA, Phillips AN, et al. Cardio- and cerebrovascular events in HIV-infected persons. *AIDS* 2004 Sep 3;18(13):1811-7.
9. Lang S, Mary-Krause M, Simon A, et al. HIV replication and immune status are independent predictors of the risk of myocardial infarction in HIV-infected individuals. *Clin Infect Dis* 2012 Aug;55(4):600-7.
10. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, et al. Low CD4+ T cell count is a risk factor for cardiovascular disease events in the HIV outpatient study. *Clin Infect Dis* 2010 Aug 15;51(4):435-47.
11. Lazar R, Kersanske L, Xia Q, et al. Hospitalization rates among people with HIV/AIDS in New York City, 2013. *Clin Infect Dis* 2017 Apr 24.
12. Kuller LH, Tracy R, Belloso W, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med* 2008 Oct 21;5(10):e203.
13. Tien PC, Choi AI, Zolopa AR, et al. Inflammation and mortality in HIV-infected adults: analysis of the FRAM study cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010 Nov;55(3):316-22.
14. McDonald B, Moyo S, Gabaitiri L, et al. Persistently elevated serum interleukin-6 predicts mortality among adults receiving combination antiretroviral therapy in Botswana: results from a clinical trial. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013 Jul;29(7):993-9.
15. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011 Apr;11(4):264-74.
16. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, et al. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* 2012 Jan;34(1):5-30.
17. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost* 2003 Sep;1(9):1897-905.
18. Holme PA, Muller F, Solum NO, et al. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FASEB J* 1998 Jan;12(1):79-89.
19. Mayne E, Funderburg NT, Sieg SF, et al. Increased platelet and microparticle activation in HIV infection: upregulation of P-selectin and tissue factor expression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012 Apr 1;59(4):340-6.
20. Nkambule BB, Davison G, Ipp H. The value of flow cytometry in the measurement of platelet activation and aggregation in human immunodeficiency virus infection. *Platelets* 2014 May 15:1-8.
21. Nkambule BB, Davison GM, Ipp H. The evaluation of platelet function in HIV infected, asymptomatic treatment-naive individuals using flow cytometry. *Thromb Res* 2015 Jun;135(6):1131-9.

22. Trevillyan JM, Gardiner EE, Andrews RK, et al. Decreased levels of platelet-derived soluble glycoprotein VI detected prior to the first diagnosis of coronary artery disease in HIV-positive individuals. *Platelets* 2016 May;28(3):301-4.
23. de Oliveira Pinto LM, Garcia S, Lecoer H, et al. Increased sensitivity of T lymphocytes to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)- and TNFR2-mediated apoptosis in HIV infection: relation to expression of Bcl-2 and active caspase-8 and caspase-3. *Blood* 2002 Mar 1;99(5):1666-75.
24. Bociaga-Jasik M, Goralska J, Polus A, et al. Mitochondrial function and apoptosis of peripheral mononuclear cells (PBMCs) in the HIV infected patients. *Curr HIV Res* 2013 Jun;11(4):263-70.
25. Fraietta JA, Mueller YM, Yang G, et al. Type I interferon upregulates Bak and contributes to T cell loss during human immunodeficiency virus (HIV) infection. *PLoS Pathog* 2013;9(10):e1003658.
26. Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, et al. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J Thromb Haemost* 2006 Dec;4(12):2656-63.
27. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007 Mar 23;128(6):1173-86.
28. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost* 2013 May;11(5):951-62.
29. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, et al. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2012;942:157-83.
30. van Lelyveld SF, Gras L, Kesselring A, et al. Long-term complications in patients with poor immunological recovery despite virological successful HAART in Dutch ATHENA cohort. *AIDS* 2012 Feb 20;26(4):465-74.
31. O'Halloran JA, Dunne E, Gurwith M, et al. The effect of initiation of antiretroviral therapy on monocyte, endothelial and platelet function in HIV-1 infection. *HIV Med* 2015 Nov;16(10):608-19.
32. Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, et al. DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol* 2006 Sep;80(18):8951-60.
33. Brechley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006 Dec;12(12):1365-71.
34. Rajasuriar R, Booth D, Solomon A, et al. Biological determinants of immune reconstitution in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: the role of interleukin 7 and interleukin 7 receptor alpha and microbial translocation. *J Infect Dis* 2010 Oct 15;202(8):1254-64.
35. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005 Oct 1;106(7):2417-23.
36. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, et al. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol* 2008 Sep 1;181(5):3495-502.
37. Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1beta-rich microparticles. *J Immunol* 2011 May 01;186(9):5489-96.
38. Tsoupras AB, Chini M, Mangafas N, et al. Platelet-activating factor and its basic metabolic enzymes in blood of naive HIV-infected patients. *Angiology* 2012 Jul;63(5):343-52.
39. Papakonstantinou VD, Chini M, Mangafas N, et al. In vivo effect of two first-line ART regimens on inflammatory mediators in male HIV patients. *Lipids Health Dis* 2014;13:90.
40. Kelesidis T, Papakonstantinou V, Detopoulou P, et al. The Role of Platelet-Activating Factor in Chronic Inflammation, Immune Activation, and Comorbidities Associated with HIV Infection. *AIDS Rev* 2015 Oct-Dec;17(4):191-201.
41. Falcinelli E, Francisci D, Belfiori B, et al. In vivo platelet activation and platelet hyperreactivity in abacavir-treated HIV-infected patients. *Thromb Haemost* 2013 Aug;110(2):349-57.
42. Satchell CS, O'Halloran JA, Cotter AG, et al. Increased platelet reactivity in HIV-1-infected patients receiving abacavir-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2011 Oct 15;204(8):1202-10.
43. Sternfeld T, Tischleder A, Schuster M, et al. Mitochondrial membrane potential and apoptosis of blood mononuclear cells in untreated HIV-1 infected patients. *HIV Med* 2009 Sep;10(8):512-9.
44. de Oliveira Pinto LM, Lecoer H, Ledru E, et al. Lack of control of T cell apoptosis under HAART. Influence of therapy regimen in vivo and in vitro. *AIDS* 2002 Feb 15;16(3):329-39.

45. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS* 2010 Aug 24;24(13):1991-2000.
46. Grundler K, Angstwurm M, Hilge R, et al. Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome. *Crit Care* 2014 Feb 12;18(1):R31.
47. Alonzo MT, Lacuesta TL, Dimaano EM, et al. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis* 2012 Apr 15;205(8):1321-9.
48. O'Brien M, Montenont E, Hu L, et al. Aspirin attenuates platelet activation and immune activation in HIV-1-infected subjects on antiretroviral therapy: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013 Jul 1;63(3):280-8.
49. Choudhury A, Chung I, Panja N, et al. Soluble CD40 ligand, platelet surface CD40 ligand, and total platelet CD40 ligand in atrial fibrillation: relationship to soluble P-selectin, stroke risk factors, and risk factor intervention. *Chest* 2008 Sep;134(3):574-81.
50. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990 Feb 1;75(3):550-4.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstramos que a admissão hospitalar por insulto infeccioso (infecção grave) proporciona um aumento de aproximadamente quatro vezes no risco de desenvolver evento cardiovascular, em indivíduos infectados pelo HIV-1. Demonstramos também que o efeito da presença de infecção grave sobre o risco cardiovascular é tempo-dependente, sendo maior nos primeiros 3 meses após a alta hospitalar mas permanecendo significativamente elevado por até 1 ano após a alta hospitalar. Outras variáveis associadas com aumento do risco cardiovascular foram idade maior que 60 anos, raça não branca e hipertensão. Uso de TARV e contagem de células TCD4+ > 500 células/ml associaram-se com redução do risco de desenvolver DCV.

Demonstramos também que, mesmo com o controle virológico atingido com a TARV, a plaqueta de indivíduos infectados pelo HIV-1 exibe um fenótipo marcado por ativação e apoptose. Além disso, observamos que, quando estimulada *ex-vivo* com trombina, existe menor translocação de P-selectina dos grânulos- α para a superfície plaquetária e menor secreção de RANTES, quando comparamos com plaquetas controle. A capacidade de síntese de TXA2 não se mostrou diferente entre os grupos. Finalmente, evidenciamos esgotamento do conteúdo dos grânulos- α através da microscopia de fluorescência.

Nossos achados contribuem para o entendimento do risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV-1 e identifica potenciais mecanismos envolvidos na gênese das complicações cardiovasculares.

6.1 POTENCIAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E NA DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL OBSERVADAS DURANTE A INFECCÃO PELO HIV-1

Embora o HIV-1 seja capaz de ativar diretamente a plaqueta humana *in vitro* (Boukor *et al*, 2006) e de induzir a apoptose em diversos tipos celulares como neurônios (Guha *et al*, 20012), linfócitos (Arokium *et al*, 2009) e monócitos (Stewart *et al*, 1997), um mecanismo direto *plaqueta-HIV* é improvável no contexto da supressão virológica atingida com a TARV. Neste cenário, a translocação de produtos bacterianos, achado central da imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 (Brenchley *et al*, 2006), e a presença de outros mediadores solúveis tornam-se mais prováveis.

O tecido linfoide associado ao intestino (GALT) abriga grandes quantidades de células TCD4+ de memória e é o principal sítio de replicação do HIV (Johnson, 2008). Apenas no oitavo dia de infecção já é possível detectar uma destruição maciça desta população celular (Mehandru *et al*, 2004). 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).

As plaquetas humanas expressam TLR4 (receptor do tipo Toll – 4), o receptor de LPS, de forma funcional (Andonegui *et al*, 2005). Quando estimulado por LPS, TLR4 é capaz de provocar diversas alterações na fisiologia plaquetária como indução na transcrição de IL-1 β (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). Jayachandran *et al* (2010) demonstraram que mesmo doses baixas de LPS (1/4 – 1/10 da dose necessária para induzir trombocitopenia ou a produção de TNF), semelhante às concentrações circulantes em indivíduos infectados pelo HIV-1 e controlados virologicamente (Brenchley *et al*, 2006), são capazes de promover a ativação plaquetária. Nesse estudo, a ativação plaquetária foi bloqueada com o uso de modelos *knockout* para TLR4, sugerindo fortemente que o efeito do LPS na plaqueta é dependente da sinalização por TLR4.

Além do LPS, outros mediadores solúveis podem participar na ativação plaquetária. O'Brien *et al* (2013) investigaram o efeito do tratamento com aspirina (dose de ataque 325mg + 81mg ao dia por 7 dias) na função plaquetária de indivíduos infectados pelo HIV-1 e controles. Os investigadores estimularam plaquetas de indivíduos não infectados pelo HIV-1 (1×10^8 plaquetas / ml) com cinquenta microlitros de plasma de pacientes infectados pelo HIV-1 controlados virologicamente, tratados e não tratados com aspirina, e mediram a ativação plaquetária através da expressão de P-selectina (anti-CD61-FITC, Dako) e da quantificação de tromboxano A2 (TXA2) urinário. O estímulo com plasma de pacientes infectados pelo HIV-1 e sem tratamento com aspirina promoveu a ativação da plaqueta de indivíduos não infectados enquanto que o plasma de pacientes infectados pelo HIV-1 que receberam o tratamento com aspirina não foi capaz de estimular a ativação plaquetária. Os autores também observaram que o tratamento com aspirina reduz marcadores de ativação

crônica do sistema imune como HLA-DR-CD38⁺ (células TCD8 que expressam HLA-DR) e sCD14.

Analisados conjuntamente, estes dados sugerem que, durante a supressão virológica atingida pela TARV, os mecanismos responsáveis pela disfunção plaquetária mais provavelmente envolvem mediadores plasmáticos solúveis, como o LPS.

Aumento da ativação plaquetária tem sido descrito durante o curso da infecção por outros agentes virais como adenovírus (Stone *et al*, 2007; Othman *et al*, 2007), Epstein-Barr vírus (EBV) (Ahmad e Menezes, 1997), vírus da hepatite C (HCV) (Zahn *et al*, 2006) e vírus da dengue (DENV) (Hottz *et al*, 2011). Similarmente, fora do cenário de supressão virológica atingida com a TARV, mecanismos diretos de ativação plaquetária pelo HIV-1 (interação *plaqueta-HIV*) ganham maior relevância. A plaqueta humana é capaz de endocitar o HIV-1 através da interação DC-SIGN e CLEC-2 da superfície plaquetária com a gp120 da superfície do HIV-1 (Chaipan *et al*, 2006). Este pode ser um dos mecanismos relacionados à tendência na maior expressão de CD62-P observada em indivíduos infectados pelo HIV-1 e não controlados virológicamente, comparados à indivíduos infectados pelo HIV-1 e controlados virológicamente (figura 5).

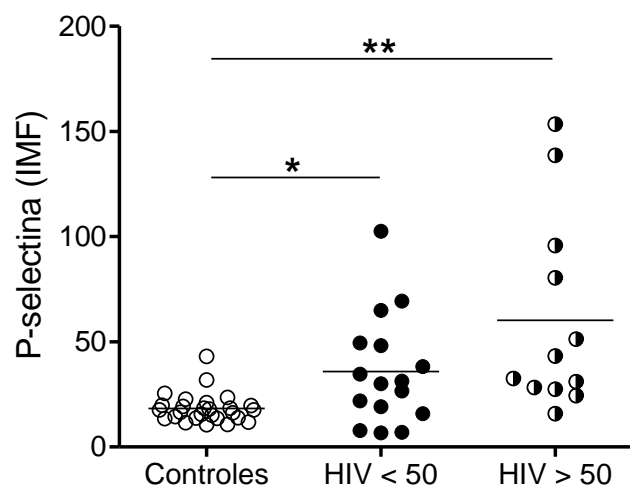


Figura 5: Expressão plaquetária de P-selectina. Intensidade média de fluorescência (IMF) para P-selectina de plaquetas (5×10^6) controles (n = 27), de pacientes com HIV/AIDS sob controle virológico (n = 16) e sem controle virológico (n = 10). (*) p < 0.05, (**) p < 0.05, Teste U: Mann Whitney Test.

6.2 CARACTERIZANDO O FENÓTIPO DE EXAUSTÃO PLAQUETÁRIA

Existe algum debate na literatura sobre o impacto da infecção crônica pelo HIV-1 na função plaquetária. Estudos conduzidos na década de 90 sugeriram que o estágio avançado da infecção pelo HIV-1 (AIDS) está associado com uma produção basal de CCL5 significativamente elevada e uma hiporresponsividade ao estímulo com o agonista do receptor de trombina – SFLLRN – (Holme *et al*, 1998). Estes achados apontaram para um fenótipo de “exaustão” plaquetária, semelhante ao fenótipo de exaustão do sistema imune já caracterizado durante a infecção pelo HIV-1 (Brenchley *et al*, 2006).

A exposição de P-selectina é um evento celular que marca ativação e secreção dos α -grânulos plaquetários (Rendu *et al*, 2001), processo que depende do rearranjo do citoesqueleto plaquetário (Peters *et al*, 2012). No presente trabalho observamos que plaquetas isoladas de indivíduos infectados pelo HIV-1 e controlados virológicamente apresentam aumento na expressão de P-selectina e maior espalhamento em superfície recoberta com fibrinogênio (figura 1, artigo 2), marcadores classicamente associados com ativação celular. Demonstramos também que a expressão plaquetária de CD62-P frente a um estímulo *ex-vivo* com trombina (0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.2 U/ml, 0.4 U/ml) é significativamente menor em indivíduos infectados pelo HIV-1, comparada com controles (figura 3B, artigo 2). Estes resultados nos remeteram a três principais hipóteses: (a) a sinalização através de PAR1 e PAR4 (receptores de trombina) está alterada; (b) a capacidade de rearranjo do citoesqueleto/exocitose está alterada; (c) o conteúdo granular está alterado.

Com o intuito de investigarmos a primeira hipótese, repetimos o estímulo *ex-vivo* com trombina (0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.2 U/ml, 0.4 U/ml) e medimos a produção de RANTES e TXA2 no sobrenadante plaquetário através de ELISA. O TXA2 é proveniente do metabolismo do ácido araquidônico liberado pelo metabolismo dos fosfolipídios da membrana plaquetária. Este experimento tinha por objetivo avaliar a sinalização por PAR-1 e PAR-4 e o conteúdo dos grânulos- α por uma molécula diferente da P-selectina. Adicionalmente, por utilizar uma técnica diferente da citometria de fluxo (ELISA), minimizamos vieses de aferição.

Observamos que, assim como na expressão de CD62-P, existe uma produção de RANTES significativamente menor pela plaqueta de indivíduos infectados pelo HIV-1, comparada com controles (figura 3C, artigo 2). Observamos também que não existe diferença na produção de TXA2 no sobrenadante plaquetário após o estímulo com diferentes concentrações de trombina, comparando pacientes e controles (figura 3D, artigo 2). Estes

dados demonstram que tanto a sinalização por PAR-1 e PAR-4 como a capacidade de síntese plaquetária encontram-se preservadas.

Após, focamos a investigação na capacidade de rearranjo do citoesqueleto plaquetário. Observamos que o estímulo com trombina é capaz de aumentar significativamente o espalhamento plaquetário na superfície com fibrinogênio (figura 4C, artigo 2). E, finalmente, para caracterizar de forma direta a exaustão dos grânulos- α , marcamos o conteúdo granular com WGA (lectina de gérmen de trigo) e avaliamos a relação conteúdo granular/área plaquetária através da microscopia de fluorescência. Observamos diferença significativa entre o conteúdo granular da plaqueta de pacientes infectados pelo HIV-1 e controlados virologicamente, quando comparada a plaqueta controle (figura 4B, artigo 2).

Esses dados mapeiam a função plaquetária no cenário do controle virológico em indivíduos infectados pelo HIV-1 e sugerem fortemente um fenótipo de maior ativação, apoptose e exaustão granular. Cada um destes eventos celulares contribuiu potencialmente para o elevado risco cardiovascular observado nesta população considerando que a habilidade da plaqueta em modular a resposta inflamatória decorre da interação com células endoteliais, mediada pela integrina α IIb β 3 e CD40L, induzindo um fenótipo pró-inflamatório no endotélio; da interação de plaquetas ativadas com leucócitos, mediada pela P-selectina, modulando a ativação e expressão de genes inflamatórios dessas células; da secreção de fatores inflamatórios e mediadores imunes estocados nos grânulos- α plaquetários, dentre eles citocinas como IL-6, quimiocinas como RANTES, MIP-1 α e MCP-3, fatores de crescimento como PDGF e TGF- β , e aminas vasoativas como histamina; e síntese de IL-1 β , TXA2, TF e PAF (Bergmeier e Wagner, 2007; Bozza *et al*, 2009).

6.3 PERSPECTIVAS PARA O MANEJO DO RISCO CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1

As estatinas são a pedra angular do tratamento da hipercolesterolemia. Diversos ensaios clínicos demonstraram redução na morbidade e na mortalidade das doenças cardiovasculares, tanto na prevenção de eventos primários como na prevenção de eventos secundários através do uso de estatinas (Baigent *et al*, 2010) (Brugts *et al*, 2009). Na população geral, cada redução de 1,0 mmol/L (39 mg/dl) no nível de LDL-C está associada a uma redução de 10% em mortalidade por todas as causas, refletindo em grande parte reduções

na mortalidade por doença cardíaca coronariana (Baigent *et al*, 2010). Além do efeito no LDL, as estatinas reduzem significativamente marcadores de inflamação e de ativação linfocitária e monocitária em indivíduos infectados pelo HIV-1 em uso de TARV. Funderburg *et al* (2015) demonstraram que o uso de estatina (rosuvastatina) por 48 semanas reduziu significativamente os níveis de sCD14 e de linfócitos T CD38+HLA-DR+.

Até que os resultados do estudo REPRIEVE (Ensaio Randomizado para Prevenir evento Vascular em HIV), cujo objetivo é investigar o uso de pitavastatina diária versus placebo para a prevenção primária de eventos cardiovasculares em indivíduos infectados pelo HIV-1, estejam disponíveis, o manejo clínico da dislipidemia nestes indivíduos permanece baseado em diretrizes clínicas para indivíduos não infectados pelo HIV-1. Em sua diretriz mais recente, o colégio americano de cardiologia e a associação americana de cardiologia (ACC / AHA) introduziram um novo algoritmo para o cálculo do risco cardiovascular e identificaram quatro grupos de indivíduos para os quais a terapia com estatina deve ser iniciada (Stone *et al*, 2014):

Quadro 2. Grupos com benefício para o uso de estatinas ACC/AHA (2013)

1.	Pacientes com DCV aterosclerótica ^a
2.	Pacientes sem DCV aterosclerótica, com LDL-C \geq 190 mg / dl
3.	Pacientes com idade entre 40-75 anos, com diabetes mellitus e LDL-C <190 mg / dl
4.	Pacientes sem DCV aterosclerótica ou diabetes, de 40-75 anos, com LDL-C <190 mg / dl, e um risco de desenvolver DCV em 10 anos \geq 7,5% ^b

^a DCV, doença cardiovascular incluindo: síndrome coronariana aguda, infarto agudo do miocárdio, angina, revascularização miocárdica, ataque isquêmico transitório, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica.

^b Calculado usando a ferramenta de avaliação de risco ACC / AHA de 2013.

No presente trabalho demonstramos que a admissão hospitalar por insulto infeccioso (infecção grave) proporciona um aumento de aproximadamente quatro vezes no risco de desenvolver evento cardiovascular, em indivíduos infectados pelo HIV-1. Demonstramos também que o efeito da presença de infecção é tempo-dependente, sendo maior nos primeiros 3 meses após a alta hospitalar mas permanecendo significativamente elevado por até 1 ano após a alta hospitalar. Embora a relação entre infecção aguda e risco cardiovascular já tenha sido abordada na população geral (Corrales-medina *et al*, 2008), este é o primeiro trabalho,

que seja de nosso conhecimento, a abordar esta relação na população de indivíduos infectados pelo HIV-1. Embora os mecanismos exatos responsáveis por desencadear o evento cardiovascular após os insultos infecciosos agudos não estejam completamente elucidados, eles incluem isquemia de demanda, disfunção endotelial e alterações inflamatórias na placa aterosclerótica (Corrales-Medina *et al*, 2010).

Desta forma, considerando o potente efeito das estatinas na redução dos níveis de LDL-C, seu efeito anti-inflamatório, baixo custo, perfil de segurança e toxicidade, propomos considerar o início de estatinas em indivíduos infectados pelo HIV-1 e que apresentem infecções graves, por um período de até um ano após a data da alta hospitalar (quadro 3). Estudos futuros, randomizados e mascarados, deverão ser conduzidos com o intuito de avaliar o efeito das estatinas nesta população.

Quadro 3. Inclusão dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e que apresentaram infecções graves no algoritmo para o início de estatina do ACC/AHA (2013)

-
1. Pacientes **com DCV aterosclerótica^a ou infectados pelo HIV-1 com histórico de infecções graves no último ano**
 2. Pacientes sem DCV aterosclerótica, **com LDL-C \geq 190 mg / dl**
 3. Pacientes com idade entre 40-75 anos, **com diabetes mellitus e LDL-C $<$ 190 mg / dl**
 4. Pacientes sem DCV aterosclerótica ou diabetes, de 40-75 anos, com LDL-C $<$ 190 mg / dl, e **um risco de desenvolver DCV em 10 anos \geq 7,5%^b**

^a DCV, doença cardiovascular incluindo: síndrome coronariana aguda, infarto agudo do miocárdio, angina, revascularização miocárdica, ataque isquêmico transitório, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica.

^b Calculado usando a ferramenta de avaliação de risco ACC / AHA de 2013.

6.4 INFLUÊNCIA DA TARV NA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA E NO RISCO CARDIOVASCULAR

A instituição da TARV em meados da década de 90 foi determinante na mudança do prognóstico e aumento na expectativa de vida dos indivíduos infectados pelo HIV-1 (Dore *et al*, 2002). Contudo, o uso crônico de algumas classes de antirretrovirais é capaz de produzir alterações metabólicas importantes como lipodistrofia, dislipidemia e resistência insulínica (Grinspoon *et al*, 2005) (Brown *et al*, 2011), além de predispor estes indivíduos a hipertensão arterial (HAS) através da desregulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Lo *et al*, 2009). Com relação a função plaquetária, esquemas antirretrovirais contendo Abacavir estão associados à maior ativação tanto *in vitro* (Baum *et al*, 2011) como *in vivo*. 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. Esquemas contendo Abacavir também estão associados a maior agregação plaquetária. 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 comparadas com plaquetas controle. Maior ativação plaquetária também está associada ao uso de inibidores de protease. von Hentig *et al* (2008) demonstraram que o início de TARV contendo Saquinavir, Lopinavir, Fosamprenavir ou Atazanavir aumenta significativamente a interação plaqueta-leucócito e a expressão plaquetária de CD40-L, marcadores associados com o desenvolvimento de aterosclerose.

Com o tempo, a compilação de dados de diversas coortes deixou claro o benefício geral da TARV no risco cardiovascular. No estudo SMART – *Strategies for Management of Antiretroviral Therapy* – a TARV foi suspensa em um grupo de pacientes com contagem de células TCD4+ acima de 350 células/mm³, 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). Bozzette *et al* (2003) reportaram redução na taxa de internação por DCV de 1.7 para 0.9 por 100 pacientes-ano e

redução na taxa de morte por qualquer causa de 21.3 para 5.0 óbitos por 100 pacientes-ano, com o uso da TARV. Neste estudo não houve diferença entre as classes de antirretrovirais (ITRNN Vs. IP/r Vs. ISTI). Torriani *et al* (2008) demonstraram que a TARV é capaz atenuar a disfunção endotelial, medida através da dilatação fluxo-mediada (FMD) da artéria braquial. Diaz *et al* (2016) identificaram fatores de risco cardiovascular específicos para o HIV-1, como carga viral detectável e nadir TCD4+ ≤ 50 cels/mm³, e demonstraram o efeito protetor da TARV no risco cardiovascular. Zetterber *et al* (2013) demonstraram que a TARV reverte a plaquetopenia relacionada ao HIV-1 (Zetterber *et al*, 2013) e Holme *et al* (1998) observaram que a TARV atenua a ativação plaquetária. Novas classes de antirretrovirais, como os inibidores da integrase (INSTI), além de apresentarem melhor perfil lipídico-metabólico (Quercia *et al*, 2015), também estão associados a uma menor hiper-reatividade plaquetária. Tunjungputri *et al* (2014) compararam diferentes esquemas antirretrovirais (ITRNN x IP/r x RAL) na função plaquetária e observaram que esquemas contendo Raltegravir (inibidor da integrase) está associado a um menor grau de hiperreatividade plaquetária, avaliada neste estudo através da expressão de P-selectina após estímulos crescentes com ADP e através da interação plaqueta-monócito.

Tomados em conjunto, estes dados reforçam a importância do uso precoce da TARV, especialmente de esquemas que alterem o mínimo possível o perfil endócrino-metabólico e a função plaquetária. De forma análoga, nosso trabalho demonstra que uso de TARV e contagem de células TCD4+ > 500 cels/ml associam-se com redução do risco cardiovascular (aHR 0.21, p-valor < 0.001 e aHR: 0.41, p-valor < 0.001 , respectivamente). A figura 6 resume os achados do presente trabalho e os insere sob a luz do atual conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nas complicações cardiovasculares em indivíduos infectados pelo HIV-1.

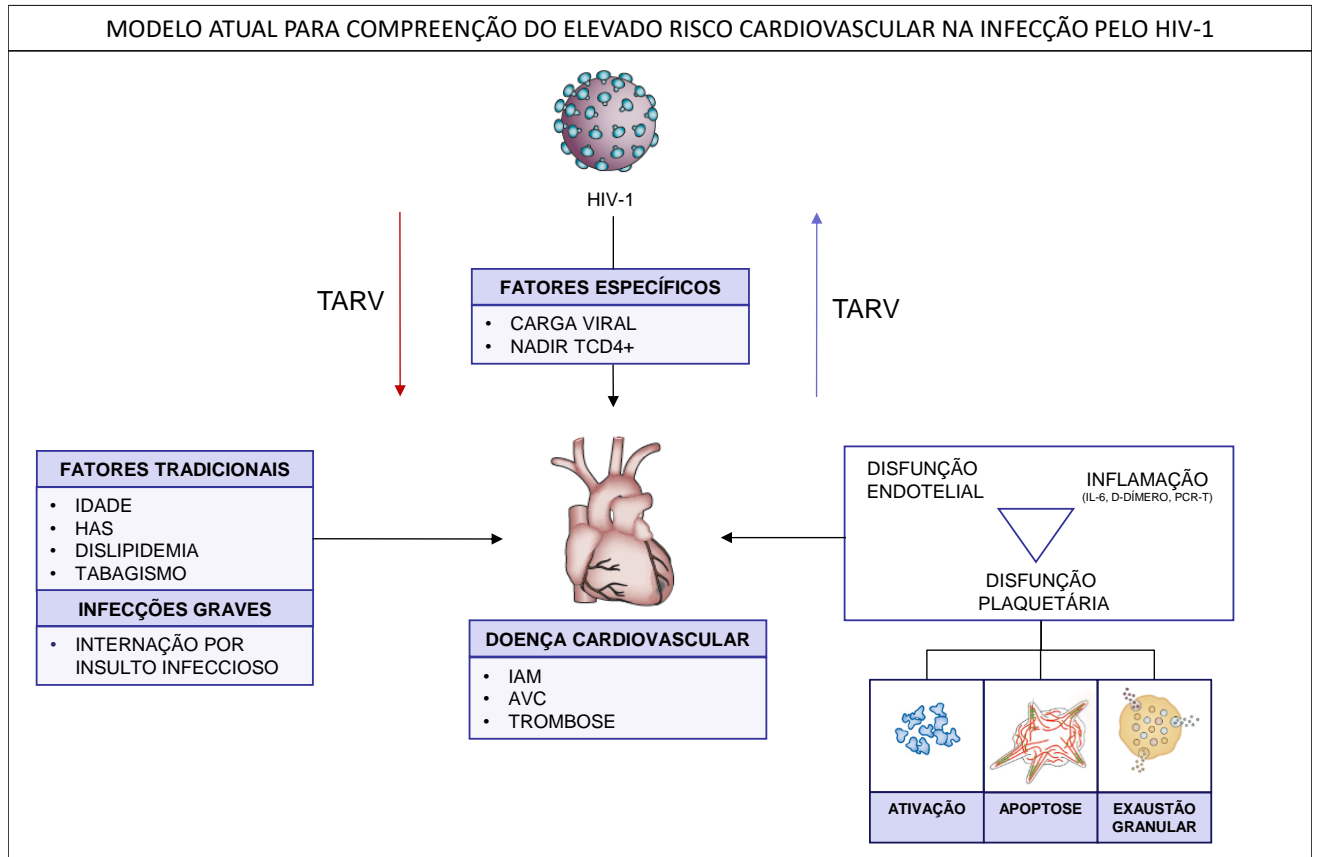


Figura 6: Modelo atual para compreensão do elevado risco cardiovascular na infecção pelo HIV-1. *HAS*, hipertensão arterial; *IAM*, infarto agudo do miocárdio; *AVC*, acidente vascular cerebral.

6.5 LIMITAÇÕES

Existem limitações para o estudo atual que merecem menção. Primeiro, seu desenho observacional limitou nossa capacidade de controle para variáveis de confundimento ainda não identificadas. Segundo, apenas capturamos hospitalizações no hospital do INI/FIOCRUZ, o que pode subestimar a presença de infecções graves e a incidência de DCV nesta coorte. Terceiro, por se tratar de dados de uma única coorte, localizada na cidade do Rio de Janeiro, nossos resultados não necessariamente refletem o perfil de indivíduos infectados pelo HIV-1 de outras regiões do Brasil. Quarto, nosso estudo restringiu-se a coleta de apenas uma amostra clínica por paciente. Investigar a função plaquetária ao longo do tempo é estratégia central para compreender a influência da TARV e da replicação viral nos nossos achados.

6.6 PERSPECTIVAS

Os estudos translacionais têm sido estimulados, tanto nacional quanto internacionalmente, devido à relevância de suas questões e a maior velocidade com que os achados fundamentais podem ser aplicados na clínica. Algumas questões abertas pelo presente estudo são motivos de novos protocolos, especialmente no que diz respeito à elucidação dos mecanismos envolvidos na disfunção plaquetária observada. Estudos futuros envolvendo o uso de antirretrovirais em indivíduos não infectados, como no cenário da PrEP (profilaxia pré-exposição para o HIV) podem render importante contribuição sobre o efeito crônico dos antirretrovirais na função plaquetária e no risco cardiovascular.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- A presença de infecções graves aumenta o risco de eventos cardiovasculares em indivíduos infectados pelo HIV-1. Esta relação estabelece-se de forma tempo-dependente, onde o risco de desenvolver doença cardiovascular é maior nos primeiros três meses após a alta hospitalar mas permanece por 1 ano. Uso da terapia antirretroviral e carga viral indetectável associam-se com redução no risco de desenvolver doenças cardiovasculares;
- Apesar do controle virológico atingido com a TARV, a plaqueta de pacientes infectados pelo HIV-1 exibe um fenótipo marcado por: (a) maior ativação plaquetária; (b) ativação da via intrínseca de apoptose e (c) exaustão dos grânulos- α , quando compara à plaqueta de indivíduos não infectados. Outras funções celulares como: (a) sinalização via receptores PAR-1 e PAR-4; (b) rearranjo do citoesqueleto e (c) síntese de TXB₂, encontram-se preservadas;
- Nossos achados contribuem para o entendimento do risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV-1 e identifica potenciais mecanismos envolvidos na gênese das complicações cardiovasculares.

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.

Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet Lond Engl*. 13 de novembro de 2010;376(9753):1670-81.

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.

Bandosz P, O'Flaherty M, Drygas W, Rutkowski M, Koziarek J, Wyrzykowski B, et al. Decline in mortality from coronary heart disease in Poland after socioeconomic transformation: modelling study. *BMJ*. 2012;344:d8136–d8136.

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

Baum PD, Sullam PM, Stoddart CA, McCune JM. Abacavir increases platelet reactivity via competitive inhibition of soluble guanylyl cyclase. *AIDS Lond Engl*. 28 de novembro de 2011;25(18):2243–8.

Baylin A, Hernandez-Diaz S, Siles X, Kabagambe EK, Campos H. Triggers of Nonfatal Myocardial Infarction in Costa Rica: Heavy Physical Exertion, Sexual Activity, and Infection. *Ann. Epidemiol*. 2007;17:112–8.

Bergmeier, W; Wagner, DD. Inflammation. In Michelson, AD. *Platelets*. 2 ed. San Diego: Elsevier, cap.39, p.713-726, 2007.

Berndt C, Mo B, Angermüller 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.

Boletim epidemiológico HIV/Aids 2017. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids das Hepatites Virais. [citado 21 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hivaid-2017>

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.

Brown TT, Glesby MJ. Management of the metabolic effects of HIV and HIV drugs. *Nat Rev Endocrinol*. 20 de setembro de 2011;8(1):11–21.

Brugts JJ, Yetgin T, Hoeks SE, Gotto AM, Shepherd J, Westendorp RGJ, et al. The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 30 de junho de 2009;338:b2376.

Butt AA, Chang C-C, Kuller L, Goetz MB, Leaf D, Rimland D, et al. Risk of heart failure with human immunodeficiency virus in the absence of prior diagnosis of coronary heart disease. *Arch. Intern. Med*. 2011;171:737–43.

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 adults. *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.

Corrales-Medina VF, Alvarez KN, Weissfeld LA, Angus DC, Chirinos JA, Chang C-CH, et al. Association Between Hospitalization for Pneumonia and Subsequent Risk of Cardiovascular Disease. *JAMA.* 2015;313:264.

Corrales-Medina VF, Serpa J, Rueda AM, Giordano TP, Bozkurt B, Madjid M, et al. Acute Bacterial Pneumonia is Associated With the Occurrence of Acute Coronary Syndromes: *Medicine (Baltimore).* 2009;88:154–9.

Corrales-Medina VF, Madjid M, Musher DM. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 2010; 10:83–92.

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, Leloirier J, Tremblay CL. Association Between HIV Infection, Antiretroviral Therapy, and Risk of Acute Myocardial Infarction: A Cohort and

Nested Case–Control Study Using Que'bec's PublicHealth 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.

Freiberg MS, Chang C-CH, Kuller LH, Skanderson M, Lowy E, Kraemer KL, et al. HIV Infection and the Risk of Acute Myocardial Infarction. *JAMA Intern. Med.* 2013;173:614.

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.

Funderburg NT, Jiang Y, Debanne SM, Labbato D, Juchnowski S, Ferrari B, et al. Rosuvastatin reduces vascular inflammation and T-cell and monocyte activation in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1o de abril de 2015;68(4):396–404.

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

Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med.* 6 de janeiro de 2005;352(1):48–62.

Grinsztejn B, Veloso VG, Friedman RK, Moreira RI, Luz PM, Campos DP, et al. Early mortality and cause of deaths in patients using HAART in Brazil and the United States. *AIDS Lond. Engl.* 2009;23:2107–14.

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.

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.

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.

Kleinbaum DG, Klein M. *Survival Analysis: A Self-Learning Text*, Third Edition. 3rd ed. 2012 edition. New York, NY: Springer; 2011. 700 p.

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/mm³ 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.

Lo J, Looby SED, Wei J, Adler GK, Grinspoon SK. Increased aldosterone among HIV-infected women with visceral fat accumulation. *AIDS Lond Engl.* 13 de novembro de 2009;23(17):2366–70.

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.

Ludwig A, Lucero-Obusan C, Schirmer P, Winston C, Holodniy M. Acute cardiac injury events ≤ 30 days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010–2012. *BMC Cardiovasc. Disord.* [Internet]. 2015 [cited 2016 Mar 29];15. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2261/15/109>

Maggi P, Di Biagio A, Rusconi S, Cicalini S, D'Abbraccio M, d'Ettorre G, et al. Cardiovascular risk and dyslipidemia among persons living with HIV: a review. *BMC Infect Dis* [Internet]. dezembro de 2017 [citado 6 de janeiro de 2018];17(1). Disponível em: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2626-z>

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 Pselectin 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.

- Moreira RI, Luz PM, Struchiner CJ, Morgado M, Veloso VG, Keruly JC, Grinsztejn B, Moore RD. Immune status at presentation for HIV clinical care in Rio de Janeiro and Baltimore. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 Aug;57 Suppl 3:S171-8.
- 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.
- O'Brien M, Montenont E, Hu L, Nardi MA, Valdes V, Merolla M, et al. Aspirin attenuates platelet activation and immune activation in HIV-1-infected subjects on antiretroviral therapy: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;63(3):280-8.
- 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. *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.
- Peters CG, Michelson AD, Flaumenhaft R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of α -granules expressing VAMP-7. *Blood*. 5 de julho de 2012;120(1):199-206.

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.

Quercia R, Roberts J, Martin-Carpenter L, Zala C. Comparative changes of lipid levels in treatment-naive, HIV-1-infected adults treated with dolutegravir vs. efavirenz, raltegravir, and ritonavir-boosted darunavir-based regimens over 48 weeks. *Clin Drug Investig*. março de 2015;35(3):211–9.

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.

Ramirez J, Aliberti S, Mirsaeidi M, Peyrani P, Filardo G, Amir A, et al. Acute Myocardial Infarction in Hospitalized Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Clin. Infect. Dis*. 2008;47:182–7.

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

Ribeiro SR, Luz PM, Campos DP, Moreira RI, Coelho L, Japiassu A, et al. Incidence and determinants of severe morbidity among HIV-infected patients from Rio de Janeiro, Brazil, 2000-2010. *Antivir. Ther*. 2014;19:387–97.

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.

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.

Robbins & Cotran. *Pathologic Basis of Disease*, 9e. 9 edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2014. 1408 p.

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.

Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, Hua M, Qiao J, White MJ, et al. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopeny that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood.* 2011;118(6):1663-74.

Schmidt M, Jacobsen JB, Lash TL, Botker HE, Sorensen HT. 25 year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: a Danish nationwide cohort study. *BMJ.* 2012;344:e356–e356.

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.

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.

Shi G, Morrell CN. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thromb Res.* 2011;127(5):387-90.

Sico JJ, Chang C-CH, So-Armah K, Justice AC, Hylek E, Skanderson M, et al. HIV status and the risk of ischemic stroke among men. *Neurology.* 2015;84:1933–40.

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.

Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:2611–2618.

Smolina K, Wright FL, Rayner M, Goldacre MJ. Determinants of the decline in mortality from acute myocardial infarction in England between 2002 and 2010: linked national database study. *BMJ.* 2012;344:d8059–d8059.

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.

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.

Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 24 de junho de 2014;129(25 Suppl 2):S1-45.

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.

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.

Timeline of HIV and TB. Disponível em:

http://www.unaids.org/en/resources/infographics/20110607_TimelineHIVandTB

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.

Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab.* julho de 2007;92(7):2506–12.

Tseng ZH, Secemsky EA, Dowdy D, Vittinghoff E, Moyers B, Wong JK, et al. Sudden cardiac death in patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012;59:1891–6.

Tunjungputri RN, Van Der Ven AJ, Schonsberg A, Mathan TS, Koopmans P, Roest M, et al. Reduced platelet hyperreactivity and platelet-monocyte aggregation in HIV-infected individuals receiving a raltegravir-based regimen: *AIDS.* setembro de 2014;28(14):2091–6.

UNAIDS DATA 2017. Disponível em: http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book. Acesso em: 18 nov. 2017.

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.

von 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.

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.

Warsaw 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.

WHO | The top 10 causes of death [Internet]. WHO. [cited 2016 Aug 24]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

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.

Zetterberg E, Neuhaus J, Baker JV, Somboonwit C, Llibre JM, Palfreeman A, et al. Platelet count kinetics following interruption of antiretroviral treatment. *AIDS Lond Engl*. 2 de janeiro de 2013;27(1):59–68.

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 IN/FIOCRUZ



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 066/2011

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: Emersom Ciclini Mesquita.
Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.
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/SIDA em acompanhamento ambulatorial ou internados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ) e 50 ml de sangue de pacientes não infectados. Serão incluídos indivíduos com sorologia positiva para HIV em diferentes estágios clínicos da 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 sépticos; 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:

Sandra Camille Bozza

Dr. Sandra Camille Bozza
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
IPEC - FIOCRUZ

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°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: _____

ANEXO 4. CARTA DE SUBMISSÃO ARTIGO-1**INFE-D-18-00017 - Submission Confirmation**

Infection (INFE) <em@editorialmanager.com>

ter 09/01/2018 19:32

Para: Emersom Cicilini Mesquita <emersomcm@hotmail.com>;

Dear Dr. Mesquita,

Thank you for submitting your manuscript, Severe infections increases cardiovascular risk among HIV-infected individuals, to Infection.

The submission id is: INFE-D-18-00017

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's Editorial Manager site.

Your username is: emersomcm@hotmail.com

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at

<http://infe.edmgr.com/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Infection

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

ANEXO 5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

1: Pecego AC, Amancio RT, Ribeiro C, **Mesquita EC**, Medeiros DM, Cerbino J, Grinsztejn B, Bozza FA, Japiassu AM. Six-month survival of critically ill patients with HIV-related disease and tuberculosis: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2016 Jun 10;16:270.

2: Cerbino-Neto J, **Mesquita EC**, Souza TM, Parreira V, Wittlin BB, Durovni B, Lemos MC, Vizzoni A, Bispo de Filippis AM, Sampaio SA, Gonçalves Bde S, Bozza FA. Clinical Manifestations of Zika Virus Infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016 Jul;22(7):1318-20.

3: **Mesquita EC**, Rouanet C, Lucas GL, de Lemos Ados S, Lima MA. Acute bilateral vestibulocochlear neuritis following cultured cell vaccine administration for rabies post-exposure prophylaxis. *J Neurol Sci.* 2016 May 15;364:198-9.

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

5: Sampaio FM, Valviesse VR, Lyra-da-Silva JO, **Mesquita EC**, Brandão LG, do Valle AC. Pain and hyperpigmentation of the toes: a quiz. Hyperpigmentation of the toes caused by millipedes. *Acta Derm Venereol.* 2014 Mar;94(2):253-4.

6: Fernando A. Bozza and **Emerson C. Mesquita**. Diagnosis and management of viral haemorrhagic fevers in the ICU. in *Oxford Textbook of Critical Care* (Oxford University Press, 2016).