

GEORGE GONÇALVES DE SOUZA

Perfil peptidômico do HIV no líquido cefalorraquidiano em pessoas vivendo com HIV e alterações neurocognitivas associadas ao vírus

SÃO PAULO
2023

GEORGE GONÇALVES DE SOUZA

Perfil peptidômico do HIV no líquido cefalorraquidiano em pessoas vivendo com HIV e alterações neurocognitivas associadas ao vírus

Versão Corrigida Conforme Resolução CoPGr6018/11

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário
Casseb

SÃO PAULO
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, George Gonçalves de
Perfil peptidômico do HIV no líquido
cefalorraquidiano em pessoas vivendo com HIV e
alterações neurocognitivas associadas ao vírus /
George Gonçalves de Souza. -- São Paulo, 2023.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb.

Descritores: 1.HIV 2.Transtornos
neurocognitivos 3.Peptídeos 4.Biomarcadores 5.HAND

USP/FM/DBD-462/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à lembrança de minha amada bisavó Otilia, responsável por minha primeira memória afetiva, e à memória de minha amiga Irene, que sempre acreditou em mim.

E aos pacientes vivendo com HIV, por confiarem e colaborarem com nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio incansável e sacrifícios inestimáveis. Cada gesto de carinho e orientação deles moldou quem sou, e sou eternamente grato por tudo o que fizeram e continuam a fazer por mim.

Aos meus avós, em especial a minha avó Dirce Rosa, por tanto amor, afeto e amizade.

Aos meus irmãos, pelo amor que sinto por eles; ao meu grande amor, minha sobrinha Lara Luiza e agora meu outro neném Aurora.

Aos meus amados afilhados e minhas tias, mulheres guerreiras.

Aos meus amigos: Taina, Meriane, Elayne, Samara, Luciana Santos, Jéssica Farias, Valéria, Beatriz Barros, Marcos Cerqueira, Rute Cerqueira, Fabiano Rogatto, Bárbara, Daniel Sagrillo, Mateus Thomazella, Lucas Guimarães, Luana Conrado, Thayná Alvim, Bernardina e Sara por estarem presentes nos momentos significativos da minha vida e dando sentido a tudo.

Ao meu orientador Prof. Jorge Simão do Rosário Casseb, por abrir as portas do Laboratório do LIM 56 - FMUSP.

Ao Dr Gil Benard e Dr Dewton Vasconcelos, pelos ensinamentos e conselhos.

À toda equipe do ADEE 3002.

À Dra Gabriela Prandi Caetano, pela presteza e ensinamentos.

À Carolina Gualqui pela amizade e pelas avaliações neuropsicológicas.

À Juliana Ruiz pela amizade e orientação.

Agradeço em especial aos amigos do LIM 56: Bruna Tiyo, Sandy, Marta, Laís, Gabriela Prates, Yasmin.

Aos amigos do LIM 56: Lorena, Beatriz Fagundes, Thalyta, Sílvia, Melina, Naiura, Tereza e os agregados.

Aos funcionários do LIM 56.

À toda equipe do Setor de Líquor - HCFMUSP: Dr Hélio, Dra Izabel, Elenir, Adriano.

À toda equipe do Laboratório de Farmacologia dos Peptídeos Intracelulares - ICB - I: Prof Dr. Emer Ferro, Dra. Rosangela Eichler, Bruna Caprioli e Felipe Martucci.

Ao programa de Pós-Graduação da Dermatologia da FMUSP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

EPÍGRAFE

Queimei os olhos para ver o sol

Tão importante

Queria ver o sol

Queria ver o sol

Aquela estrela perto daqui

Ignorei os conselhos do meu velho

Me dizendo

- Menina, o mistério

Só se mira de soslaio

A paixão queima

A paixão queima

O poder

Queima

Forca, Luiza Lian

SUMÁRIO

RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Estrutura do HIV e variabilidade genética	16
1.2. HIV e o Sistema Nervoso Central	17
1.3. Evolução temporal do conhecimento da HAND	20
1.4. Alterações cognitivas associadas ao HIV	23
1.5. Diagnóstico Neurológico da HAND	25
1.6. Intervenções Farmacológicas	26
1.7. Biomarcadores e HAND	27
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	29
3. CASUÍSTICA	29
3.1. Seleção dos Participantes do Estudo	30
3.2. Aspectos Éticos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Coleta de dados dos Participantes	31
4.2. Coleta de Amostras de Líquor	32
4.3. Coleta de Amostras de Sangue	32
4.4. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	32
4.5. Peptidoma	33
4.6. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A : COMPROVANTE ENVIO DO PROJETO	56
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- ADEE 3002 – Ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Secundárias ao HIV
- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ANI – Alteração Neurocognitiva Assintomática, do inglês “*Asymptomatic neurocognitive impairment*”
- AVC - Acidente Vascular Cerebral
- AZT – Zidovudina
- BHE - Barreira hematoencefálica
- CD - Cluster de diferenciação, do inglês “*Cluster of differentiation*”
- CPE – Eficácia de Penetração no Sistema Nervoso Central, do inglês “*CNS penetration effectiveness*”
- CXCL10 - Do inglês, “*C-X-C motif chemokine ligand 10*”
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”
- DP – Desvio Padrão
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERNS – Espécies Reativas de Nitrogênio
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- FDA – Do inglês, “*Food and Drug Administration*”
- GRID – Doença da Imunodeficiência Relacionada aos Gays, do inglês “*Gay-related immunodeficiency disease*”
- HAART – Terapia Antirretroviral Altamente Ativa, do inglês “*Highly active antiretroviral therapy*”
- HAD – Demência associada ao HIV, do inglês “*HIV-associated dementia*”
- HAND – Alterações Cognitivas associadas ao HIV, do inglês “*HIV-Associated Neurocognitive Disorder*”
- HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- HCl – Ácido clorídrico
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*”
- HTLV – Vírus T-linfotrófico Humano, do inglês “*Human T-lymphotropic virus*”

IL-8 - Interleucina 8

LAV- Vírus associado à linfadenopatia, do inglês "*Lymphadenopathy-associated virus*"

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LDL - Lipoproteína de baixa densidade, do inglês "*Low density protein*"

LIM-56 – Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências 56

LT CD4+ – Linfócito T CD4+

MND – Comprometimento Neurocognitivo Leve a moderado, do inglês "*Mild Neurocognitive Disorder*"

NCBI – Do inglês, "*National Center for Biotechnology Information*"

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico, do inglês "*Peripheral Blood Mononuclear Cells*"

pH - Potencial hidrogeniônico

PVHA – Pessoas que vivem com HIV ou aids.

RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês "*Ribonucleic Acid*"

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

TARV – Terapia antirretroviral

Tat - Do inglês, "*Trans-Activator of Transcription*"

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF - Fator de necrose tumoral, do inglês "*Tumor necrosis factor*"

3TC – Lamivudine

Xg - Força g

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

β – Beta

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

Da – Dalton

g – Força g

KDa – Kilodalton

mL – Mililitros

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

μL – Microlitro

μg – Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática da estrutura do HIV.....	18
Figura 2. Entrada do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)-1 no sistema nervoso central e seus efeitos nas células que levam ao dano e morte de neurônios.....	20
Figura 3. Classificação das categorias de HAND de acordo com o critério de Frascati.....	27
Figura 4. Extração de Peptídeos do LCR (Líquido Cefalorraquidiano).....	37
Figura 5. Linha do tempo de execução do projeto temático até o presente momento do estudo.....	39
Figura 6. Fluxograma de elegibilidade, inclusão e exclusão de pacientes representativos da coorte do ambulatório ADEE3002 que foram avaliados para o presente estudo.....	40
Figura 7. Distribuição dos indivíduos selecionados de acordo com a classificação da HAND.....	41
Figura 8. Principais alterações metabólicas do LCR de PVHA de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).....	46
Figura 9. Frequência de indivíduos em casa grupos de estudo classificados de acordo com os critérios de Frascati onde os peptídeos foram encontrados durante a realização da técnica.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aspectos sociodemográficos de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação cognitiva.....	41
Tabela 2. Características laboratoriais de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).....	43
Tabela 3. Dados metabólicos do sangue de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).....	44
Tabela 4. Dados metabólicos do LCR de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).....	45
Tabela 5. Peptídeos intracelulares identificados de forma semiquantitativa no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pessoas vivendo com HIV e alterações cognitivas associadas ao HIV - HAND.....	48

RESUMO

Souza GG. Perfil peptidômico do HIV no líquido cefalorraquidiano em pessoas vivendo com HIV e alterações neurocognitivas associadas ao vírus [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: O Distúrbio Neurocognitivo Associado ao HIV (HAND) é caracterizado pelo comprometimento progressivo das funções neurológicas, a despeito do controle virológico e restauração do sistema imune. A ausência de biomarcadores para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes torna essencial o estudo de novas moléculas que cumpram esse papel de fundamental importância. **Objetivo:** Investigar o perfil peptidômico do HIV no líquido cefalorraquidiano de pessoas vivendo com HIV ou aids (PVHA) que apresentam alterações neurocognitivas a fim de identificar possíveis padrões peptídicos específicos para o entendimento da fisiopatologia e desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento dessas alterações mesmo no cenário de controle viral e/ou da recuperação imune pós-terapia antirretroviral combinada (ARTc). **Metodologia:** Foi realizado um estudo transversal com componente descritivo e analítico. A amostra foi composta por 24 pessoas vivendo com HIV. Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados através dos resultados de exames disponíveis no HCMED e a classificação da HAND foi baseada nos critérios de Frascati. Foi feita a peptidômica baseada em espectrometria de massa para investigar as 24 amostras de líquido cefalorraquidiano coletadas. **Resultados:** Entre as PVHA 41,7% (n=10) não apresentaram alteração cognitiva, 58,3% (n=14) apresentaram HAND. A média de idade dos participantes foi de 46,8 anos, sendo a maioria mulheres, com escolaridade média de 11,1 anos. Não houve diferença estatística na contagem de linfócitos T CD4+; no nadir das células T CD4+ ou nos demais parâmetros clínicos analisados. Sinais de neuroinflamação foram observados nos casos de HAND, com elevação de globulinas no LCR. Na peptidômica, foram identificadas 11 sequências de peptídeos intracelulares no líquido cefalorraquidiano. **Discussão e conclusão:** No contexto da análise dos peptídeos intracelulares em PVHA, foi observado um aumento significativo em certas sequências e uma diminuição significativa em outras, em indivíduos com HAND em comparação com os grupos de PVHA sem alteração. Esses achados indicam que esses peptídeos podem ter relevância tanto no diagnóstico, quanto no prognóstico das vias de sinalização de suas funções, proporcionando uma potencial contribuição para a compreensão dos mecanismos patológicos envolvidos na HAND.

Palavras chaves: HIV. Transtornos neurocognitivos. Peptídeos. Biomarcadores. HAND.

ABSTRACT

Souza GG. HIV peptidomic profile in cerebrospinal fluid in people living with HIV and neurocognitive disorders associated with the virus [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Introduction: HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND) is characterized by progressive impairment of neurological function, despite virological control and restoration of the immune system. The absence of biomarkers for the diagnosis and monitoring of patients makes it essential to study new molecules that fulfill this fundamentally important role. **Objective:** To investigate the HIV peptide profile in the cerebrospinal fluid of people living with HIV (PLWH) who present neurocognitive disorders to identify possible specific peptide patterns for understanding the pathophysiology and developing biomarkers for the diagnosis and monitoring of these changes. **Methodology:** A cross-sectional study was conducted using descriptive and analytical components. The sample consisted of 24 people living with HIV. Clinical and laboratory data were collected using the test results available at the HCMED, and the HAND classification was based on the Frascati criteria. Mass spectrometry-based peptidomics were used to investigate the 24 cerebrospinal fluid samples collected. **Results:** Among PLWHA, 41.7% (n=10) did not present cognitive changes and 58.3% (n=14) presented with HAND. The average age of the participants was 46.8 years, the majority were women, with an average education of 11.1 years. There was no statistical difference in the CD4+ T lymphocyte count in the nadir of CD4+ T cells or other clinical parameters analyzed. Signs of neuroinflammation have been observed in cases of HAND, with an increase in CSF globulins. In peptidomics, 11 intracellular peptide sequences have been identified in cerebrospinal fluid. **Discussion and conclusion:** In the context of the analysis of intracellular peptides in PLWHA, a significant increase in certain sequences and a significant decrease in others were observed in individuals with HAND compared with groups of PLWHA without alterations. These findings indicate that these peptides may be relevant in both the diagnosis and prognosis of the signaling pathways involved in their functions, providing a potential contribution to the understanding of the pathological mechanisms involved in HAND.

Keywords: HIV. Neurocognitive disorders. Peptides. Biomarkers. HAND.

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um desafio para a saúde pública em todo o mundo, afetando mais de 39 milhões de pessoas, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS). No ano de 2022, foram registrados 1,3 milhão de novos casos de HIV e 630 mil óbitos relacionados a essa doença¹. No Brasil, entre 2007 e junho de 2022, foram reportados 434.803 casos de infecção pelo HIV, com a região Sudeste apresentando a maior prevalência, contabilizando 183.901 casos (42,3%)². A principal característica desta doença é o comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, levando a um quadro de imunossupressão, o que caracteriza a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids)³.

Os primeiros casos de aids foram registrados em 1981 nos Estados Unidos, afetando principalmente adultos do sexo masculino que mantinham relações sexuais com outros homens. Esses indivíduos apresentaram sintomas graves, como sarcoma de Kaposi e pneumonia causada pelo *Pneumocystis jirovecii*, levando-os a óbito. Uma característica comum a todos foi uma significativa queda na contagem de células T CD4+⁴. Esses sinais e sintomas incomuns em adultos jovens sugeriam a presença de uma alteração imunológica nesses indivíduos. Com base nos padrões epidemiológicos e na predominância de casos em pacientes homossexuais, concluiu-se que a transmissão ocorria principalmente por contato sexual. Diante disso, a doença recebeu a denominação de GRID (Gay-Related Immunodeficiency Disease) - Doença da Imunodeficiência Relacionada aos Gays⁴.

Em 1982, os mesmos sinais e sintomas foram detectados em usuários de drogas injetáveis, trabalhadores do sexo e receptores de transfusões sanguíneas e hemoderivados. Como resultado, a doença foi posteriormente renomeada como aids⁵.

Em 1993, o HIV foi descoberto quase simultaneamente por dois grupos: o primeiro do professor Luc Montagnier no Instituto Pasteur, em Paris, onde trabalhava⁶ a professora Françoise Barré-Sinoussi, e então denominado "*lymphadenopathy-associated virus*" (LAV); e o segundo do professor Jay Levy na Universidade da Califórnia⁷, que o denominou de "*Aids-associated Retrovirus*" (ARV).

No mesmo período, o professor Robert Gallo⁸, conhecido por suas descobertas anteriores dos retrovírus HTLV-I e HTLV-II, também estava conduzindo pesquisas sobre o HIV. Embora Gallo tenha inicialmente utilizado uma amostra fornecida por Luc Montagnier, ele não conseguiu isolar o vírus. Posteriormente, ele afirmou ter isolado o HIV de uma amostra de paciente, designando-o como HTLV-III^{9,10}. Contudo, foi confirmado que essa amostra era, na verdade, a mesma recebida do Instituto Pasteur⁶.

Essas descobertas independentes e, subsequentes esforços de colaboração internacional foram fundamentais para a identificação do HIV como o agente causador da aids, representando um marco significativo na pesquisa científica sobre essa epidemia global.⁶ No ano seguinte, a relação do vírus com a aids foi definitivamente estabelecida, assim foi descoberto que o vírus pertencia à família dos lentivírus através da caracterização molecular do seu material genético¹⁰.

Até o início dos anos 90, mesmo após a aprovação de zidovudina (AZT) como tratamento pela *Food and Drug Administration* (FDA) a aids se tornou a principal causa de morte entre jovens adultos, o que levou muitas pessoas a descreditarem em um possível tratamento e encararem o diagnóstico como uma sentença de morte. Com o passar dos anos, o aumento do conhecimento acerca da biologia e da patogênese do HIV, proporcionou grandes mudanças no combate ao vírus. Uma dessas mudanças, foi o desenvolvimento de novas terapias antirretrovirais que atuam em diversas estruturas do vírus e que, usadas conjuntamente são capazes de reduzir a carga viral a níveis indetectáveis no sangue e induzir a um ganho robusto de células CD4+.

1.1. Estrutura do HIV e variabilidade genética

O HIV é um membro do gênero lentivírus, e assim como os demais, é composto por um genoma com duas cópias de RNA de fita simples, envolvidos por uma camada proteica (ou nucleocapsídeo); um capsídeo; um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica; além de várias proteínas estruturais e enzimas virais¹¹ (Figura 1).

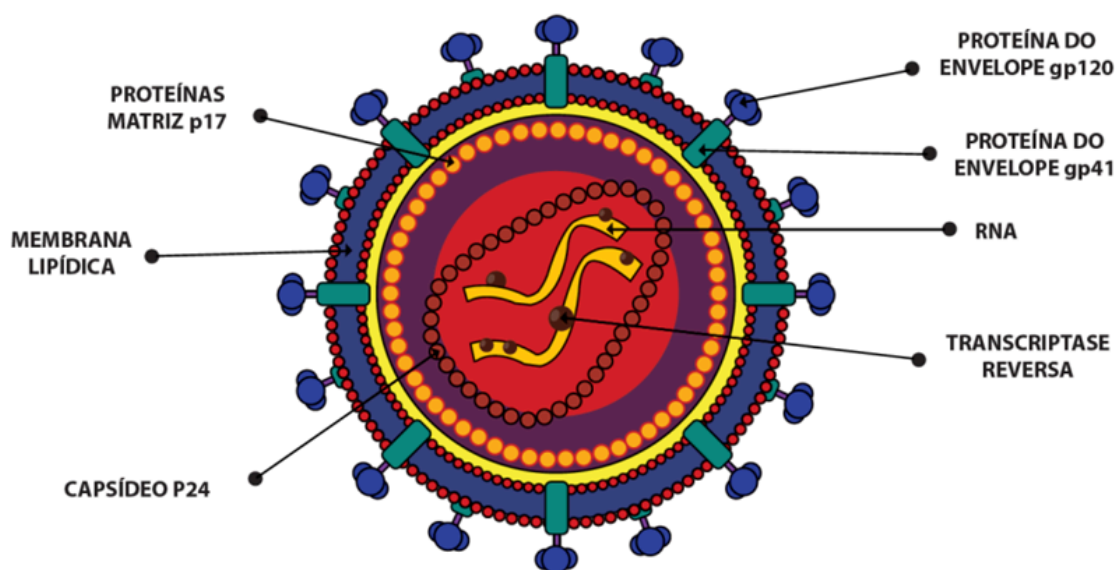


Figura 1. Ilustração esquemática da estrutura do HIV-1, representando seus principais componentes (Ministério da Saúde, 2013).

1.2. HIV e o Sistema Nervoso Central

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta diferentes tecidos do corpo logo após a entrada no organismo, incluindo o sistema nervoso central (SNC), estabelecendo reservatórios virais que persistem mesmo com o uso da terapia antirretroviral (TARV)¹². As manifestações neurológicas em indivíduos com HIV têm sido descritas desde a descoberta do início da epidemia de aids na década de 80. Na época, tais complicações costumavam ser atribuídas a infecções oportunistas, como a toxoplasmose. Somente em 1987, que a encefalite subaguda inespecífica encontrada nesses pacientes foi reconhecida como uma manifestação do próprio HIV¹³. Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados para entender o processo pelo qual o HIV invade a barreira hematoencefálica (BHE) e se estabelece no sistema nervoso central¹⁴.

A patogênese das alterações cognitivas associadas ao HIV (HAND) não estão totalmente estabelecidas. Sugere-se que abrange a interação entre vírus e hospedeiro. Os efeitos do envelhecimento, a persistência da replicação do HIV em macrófagos cerebrais, a evolução de cepas de HIV do SNC - altamente neurovirulentas -, e até mesmo a toxicidade de longo prazo da TARV no

sistema nervoso central podem estar associados a distúrbios funcionais nos neurônios^{15,16}.

Ao longo dos anos, diferentes mecanismos de neuroinfecção foram descritos, entre eles a entrada mediada por células e a migração livre do vírus pela membrana hematoencefálica¹⁴. Dentre todas as hipóteses, a mais aceita é a do “cavalo de troia”, na qual as células T CD4+ infectadas, juntamente com outros tipos celulares como as células T CD8+ e monócitos circulantes ativados invadem o SNC. Essas células produzem citocinas e moléculas sinalizadoras que contribuem com o processo inflamatório local e ajudam a estabelecer a infecção na micróglia e em alguns astrócitos, que podem iniciar a patogênese da HAND^{17,18}. Resultando em envelhecimento neuronal e, conseqüentemente, comprometimento cognitivo^{19,20}.

A interação entre as células “invasoras” infectadas e as células residentes estabelece um ambiente inflamatório independente que evolui com o curso da doença²¹. Dessa forma, a replicação local do HIV nessas células, gera uma infecção geneticamente independente do que ocorre fora do SNC, dando início a um processo de compartimentalização que estabelece um segundo reservatório viral²². Esse novo reservatório pode se tornar inacessível, em diferentes níveis, a certos componentes medicamentosos da TARV, o que pode reduzir os efeitos antivirais locais e, em casos raros, contribuir para o desenvolvimento de escape neurossintomático do LCR, apesar da supressão viral sistêmica²¹.

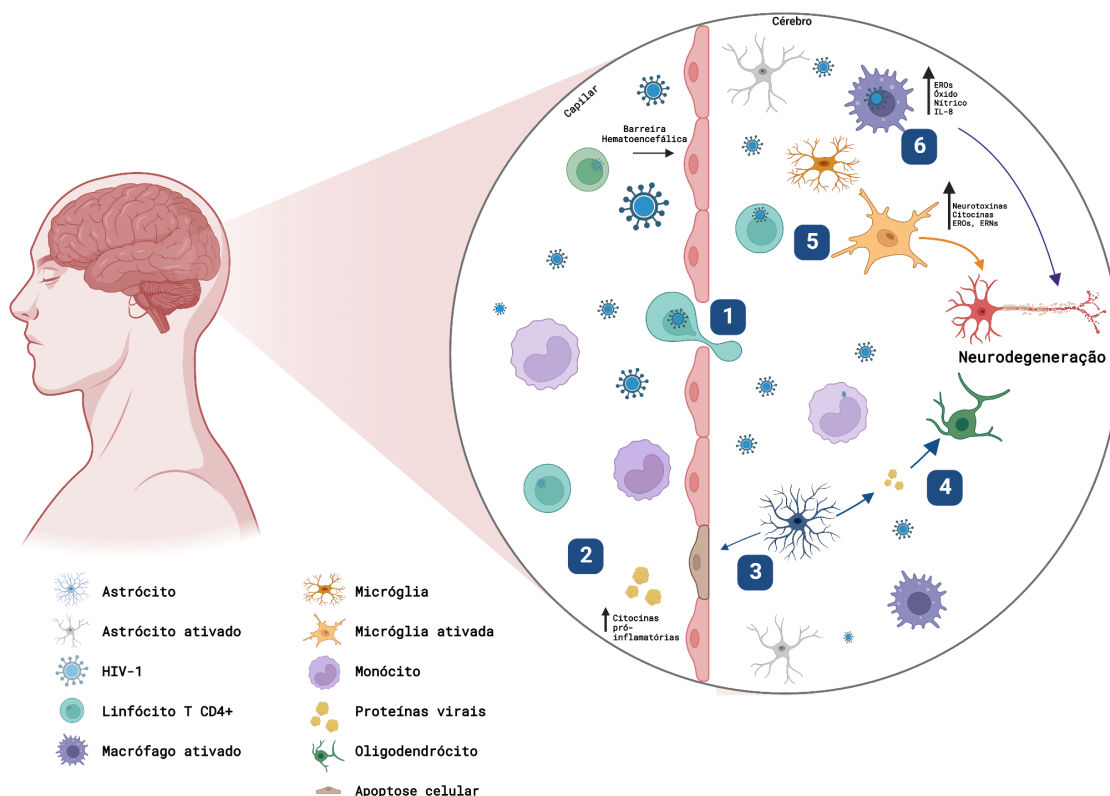


Figura 2. Entrada do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)-1 no sistema nervoso central e seus efeitos nas células que levam ao dano e morte de neurônios. (1) O HIV-1 pode entrar através de monócitos ou células T infectadas que migram da corrente sanguínea para o sistema nervoso central (SNC) (teoria do cavalo de Troia). (2) O aumento de citocinas pró-inflamatórias e proteínas virais pode alterar a permeabilidade das células epiteliais da barreira hematoencefálica, facilitando a entrada do vírus. Além disso, pode usar células epiteliais infectadas e atravessar para o outro lado através de transcitose. (3) Astrócitos reativos podem induzir a apoptose das células epiteliais, contribuindo para a modificação da permeabilidade da barreira hematoencefálica através da liberação de proteínas virais como Tat. (4) A proteína viral Tat tem um efeito direto sobre oligodendrócitos e neurônios, causando maior dano e morte neuronal. A ativação crônica de (5) microglia ativada e (6) macrófagos gera um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, neurotoxinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (criado com BioRender.com).

O estágio da infecção do HIV influencia diretamente em seu efeito no SNC, sendo medido pela contagem de CD4 no sangue. Na fase inicial (contagem de CD4 > 500 células/ μ L), as complicações neurológicas são causadas pela própria infecção viral ou pela ação de múltiplos processos biológicos mediados pelo sistema imunológico²³. No estágio intermediário (contagem de CD4 201-500 células/ μ L), os efeitos são resultado das ações

indiretas do sistema imunológico e dos efeitos metabólicos dos antirretrovirais²³. Por fim, na fase avançada (contagem de CD4 \leq 200 células/ μ L), as complicações neurológicas são resultado dos fatores mencionados anteriormente, juntamente com a ação de infecções oportunistas e/ou neoplasias²³.

Os déficits cognitivos associados ao HIV causam um grande impacto na qualidade de vida, na capacidade de realizar atividades diárias, na adesão ao tratamento, no desempenho profissional e na expectativa de vida²⁴.

1.3. Evolução temporal do conhecimento da HAND

A epidemiologia das doenças neurológicas associadas ao HIV passou por mudanças significativas com a introdução de novas terapias antirretrovirais. Durante os últimos 30 anos, houve alterações nos padrões de tratamento para o HIV, influenciando diretamente a epidemiologia dessa doença²⁵.

Na década de 1990, a monoterapia e a ausência de tratamento eram predominantes, mas, a partir de 1996, a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) tornou-se o tratamento padrão²⁶. Essa transição na terapia coincidiu com uma redução significativa, cerca de 50%, na incidência da demência associada ao HIV em comparação com a década de 1990. Além disso, houve uma mudança nas contagens de CD4, com menos casos de demência associada ao HIV ocorrendo em pacientes com contagens de CD4 abaixo de 200 após a introdução da HAART.

Essas descobertas são consistentes com outros estudos, incluindo aqueles realizados na Europa²⁷ e na Austrália²⁸, que também observaram uma diminuição na incidência da demência associada ao HIV e uma melhoria nas contagens de CD4 em pacientes diagnosticados com essa condição. No entanto, a demência associada ao HIV constituía uma proporção maior de doenças definidoras de aids, em comparação com outras condições.

A prevalência da demência associada ao HIV permaneceu relativamente estável em algumas clínicas, mas houve uma pequena tendência ao aumento em outras²⁹. Portanto, eram necessários mais estudos para avaliar as mudanças na prevalência da demência associada ao HIV na era da HAART.

Fatores de risco para o desenvolvimento de demência associada ao HIV na era pré-HAART incluíam carga viral de HIV alta no plasma antes do início da terapia antirretroviral³⁰, idade avançada, contagem baixa de linfócitos CD4, marcadores de doença sistêmica como anemia³¹ e características clínicas como depressão³² (que pode ser um sintoma de demência associada ao HIV) e a presença de retardo psicomotor nos testes neuropsicológicos³³.

A neuropatia periférica sensorial associada ao HIV e a neuropatia tóxica induzida por drogas antirretrovirais também tiveram mudanças na sua epidemiologia. As neuropatias periféricas representam as manifestações neurológicas mais prevalentes em pessoas vivendo com HIV ou aids (PVHA). Atualmente, a forma mais comum é a neuropatia sensorial simétrica distal, a qual é uma das poucas condições diretamente associadas à infecção pelo HIV ou ao seu tratamento³⁴. Enquanto que a neuropatia tóxica refere-se a danos nos nervos periféricos causados pelo uso de medicamentos antirretrovirais, que são utilizados no tratamento da infecção pelo HIV.

A incidência da polineuropatia sensorial distal associada ao HIV diminuiu, mas a incidência da neuropatia tóxica induzida por drogas antirretrovirais aumentou. No entanto, a prevalência de neuropatia pode estar aumentando à medida que os pacientes vivem mais tempo devido à HAART²⁶.

As taxas de incidência de doenças neurológicas associadas ao HIV e processos oportunistas do sistema nervoso central diminuíram significativamente no mundo com a introdução da HAART. Em contraste, a incidência de neuropatia tóxica aumentou, embora a neuropatia periférica sensorial tenha apresentado mudanças mistas. A demência associada ao HIV e a neuropatia sensorial, no entanto, continuam a ser grandes problemas de saúde pública³⁵.

Em 1991, nomenclaturas e definições de casos de pesquisa para orientar o diagnóstico das manifestações neurológicas da infecção pelo HIV foram estabelecidas pelo Grupo de Trabalho para a aids da Academia Americana de Neurologia. Com o surgimento de novas terapias e protocolos mais entendimento da infecção do HIV, o Instituto Nacional de Saúde Mental e o Instituto Nacional de Doenças Neurológicas e AVC designaram um grupo de trabalho para revisar criticamente a adequação e utilidade desses critérios de definição e identificação de áreas que necessitavam de atualização³⁶.

O relatório elaborado analisa a experiência coletiva com as perturbações neurocognitivas associadas ao HIV (HAND), especialmente desde o advento da HAART, e seus critérios de definição. No relatório também é discutido o impacto das comorbidades e sugerida a inclusão do termo comprometimento neurocognitivo assintomático para categorizar indivíduos com comprometimento subclínico. Além disso, foi proposto um algoritmo para auxiliar na padronização da classificação diagnóstica de HAND³⁶.

De acordo com o algoritmo proposto, as três condições que compreendem HAND – ANI, MND e HAD – podem ser classificadas usando uma variedade de métodos clínicos e laboratoriais específicos, dependendo dos recursos disponíveis no ambiente onde os pacientes estão sendo avaliados³⁶.

No entanto, foi estabelecido a necessidade de seguir os procedimentos padronizados sempre que possível, tanto para coletar as informações necessárias quanto para interpretar essas informações para fazer três tipos de determinação: 1) a presença e gravidade do comprometimento neurocognitivo, 2) a presença e gravidade do declínio funcional, e 3) o grau em que o comprometimento cognitivo ou o declínio funcional provavelmente foram influenciados por condições comórbidas ou fatores de confusão incluindo condições oportunistas do SNC relacionadas ao HIV ou problemas de desenvolvimento, psiquiátricos ou neuromédicos não relacionados³⁶.

Em 2023, outro grupo diversificado de especialistas discute as limitações dos critérios atuais para classificar a deficiência cognitiva em pessoas vivendo com HIV, que muitas vezes superestimam o impacto da doença, levando à ambiguidade sobre seus mecanismos³⁷.

Os critérios de 2007, conhecidos como critérios de Frascati, podem erroneamente diagnosticar mais de 20% dos indivíduos cognitivamente saudáveis como deficientes cognitivos, baseando-se apenas em testes cognitivos que podem não ser apropriados para diversas origens educacionais e socioeconômicas. Essa imprecisão na avaliação do comprometimento cognitivo pode limitar a pesquisa e os ensaios de tratamento. Além disso, a superestimação da deficiência cognitiva pode gerar medo e agravar o estigma e a discriminação contra pessoas vivendo com HIV.

Para elucidar esse problema, foi estabelecido pelo Grupo de Trabalho Internacional sobre Cognição do HIV³⁷, que propôs seis recomendações para uma nova abordagem no diagnóstico e classificação do comprometimento cognitivo em pessoas com HIV. Estas recomendações incluem separar lesões cerebrais associadas ao HIV de outras causas, abandonar a abordagem quantitativa em favor de uma ênfase no contexto clínico e oferecer um quadro de classificação mais claro para orientar a gestão clínica e pesquisas futuras sobre o tema.

1.4. Alterações cognitivas associadas ao HIV

As alterações cognitivas associadas ao HIV são denominadas pelo termo HAND (do inglês, *HIV Associated Neurocognitive Disorder*). Estas alterações se caracterizam por comprometimento de evolução progressiva, de forma variável, de poucos meses a anos, das esferas cognitiva, comportamental e motora, características das demências subcorticais^{18,31,38}. Nas fases iniciais da HAND, os sintomas são leves, incluindo déficit de memória, diminuição na velocidade do processamento mental, perda da capacidade de concentração, apatia, perda de interesse no trabalho e nas atividades de lazer. Nos quadros leves e moderados, os sintomas/sinais são discretos e podem permanecer estáveis ou muito lentamente progressivos durante anos¹⁸. Com a evolução da doença, os déficits tornam-se mais graves e há maior comprometimento para realização das tarefas da vida diária. Distúrbios da marcha, tremor e perda da habilidade motora fina são comuns, geralmente acompanhados de sintomas psiquiátricos^{31,38}.

Segundo os critérios de Frascati³⁶, a classificação das categorias de HAND depende basicamente de duas variáveis: avaliação neuropsicológica e avaliação do impacto da doença nas atividades da vida diária (por exemplo, trabalho e vida social), observadas em três diferentes formas clínicas (Figura 3): alteração neurocognitiva assintomática (ANI, do inglês *asymptomatic neurocognitive impairment*), comprometimento neurocognitivo leve/moderado (MND, do inglês, *mild neurocognitive disorder*) e demência associada ao HIV (HAD, do inglês, *HIV-associated dementia*).

Para serem classificados como ANI, os pacientes devem apresentar

alterações de ≥ 2 domínios cognitivos com pelo menos um desvio padrão abaixo da média na avaliação neuropsicológica em testes estabelecidos e apropriados para idade e escolaridade. A avaliação deve incluir as funções: visual, linguagem, atenção, memória, abstração, função executiva, velocidade de processamento das informações e habilidades motoras. Não pode haver comprometimento funcional nas atividades de vida diária e critérios para *delirium* e demência, bem como, evidências de outras causas pré-existentes para o déficit³⁶.

Quanto ao diagnóstico de MND, deve haver alterações de ≥ 2 domínios cognitivos com pelo menos um desvio padrão abaixo da média na avaliação neuropsicológica em testes estabelecidos e apropriados para idade e escolaridade. A avaliação deve incluir as funções: visual, linguagem, atenção, memória, abstração, função executiva, velocidade de processamento das informações, habilidades motoras. A diferença desta classificação para a anterior é que existe comprometimento funcional leve a moderado nas atividades da vida diária. Também, não podem existir critérios para *delirium* e demência, bem como, evidências de outras causas pré-existentes para o déficit³⁶.

Já em relação aos pacientes HAD, há alterações graves de ≥ 2 domínios cognitivos, sendo que geralmente o distúrbio é encontrado em múltiplos domínios, especialmente no aprendizado de novas informações, lentidão no processamento de novas informações e déficit de atenção/concentração. O déficit cognitivo ocasiona comprometimento grave nas atividades da vida diária (trabalho, atividades de casa, de vida, e social). Também, não pode existir critérios para *delirium* ou evidência de outras causas pré-existentes para o déficit como: infecções no SNC, acidente vascular cerebral, doenças neurológicas pré-existentes, uso de drogas ilícitas³⁶.

Com a introdução da terapia antirretroviral combinada, a ocorrência de infecções oportunistas sofreu um importante e significativo declínio, que também resultou em diminuição do número e da duração das internações, bem como na mudança de suas causas, verificando-se uma relativa melhora na qualidade de vida das pessoas com HIV²⁴. Com a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), a incidência da demência associada ao HIV vem diminuindo, mas a prevalência aumenta devido à maior sobrevida dos

pacientes infectados e ao aparecimento de formas mais leves de dano cognitivo^{24,26,39}.



Figura 3. Classificação das categorias de HAND de acordo com o critério de Frascati. ANI: alteração neurocognitiva assintomática; MND: comprometimento neurocognitivo leve/moderado; HAD: demência associada ao HIV; DP: desvio padrão. (Adaptado de Antinori *et al.*, 2007).

1.5. Diagnóstico Neurológico da HAND

O diagnóstico da HAND apresenta uma difícil abordagem, especialmente na primeira fase da doença, o que pode impedir o tratamento precoce e a prevenção de formas mais graves. O HIV pode permanecer latente no SNC por muitos anos e a infecção subclínica associada a outras comorbidades como HTLV-1 e 2, Hepatite B e C, sífilis e/ou com diagnóstico de doenças neurológicas oportunistas em atividade (toxoplasmose cerebral, neurotuberculose, meningite criptocócica, leucoencefalopatia multifocal progressiva, entre outras); podem levar à ativação imune e inflamação de baixo grau. Esses efeitos imunológicos e a possibilidade de desenvolver alterações neurocognitivas devido à infecção pelo HIV não são descartados, apesar da supressão do RNA viral no sangue periférico e LCR⁴⁰.

Todos os indivíduos vivendo com HIV com a hipótese diagnóstica da HAND são submetidos a uma bateria de testes neuropsicológicos, que consistem na avaliação de múltiplos domínios cognitivos como: atenção, função executiva, memória verbal, linguagem, velocidade motora, entre outros. Através do Z score da pontuação de cada teste, é possível determinar quais domínios apresentam-se preservados e/ou comprometidos e, a partir desses

dados, determinar se o indivíduo apresenta ou não declínio cognitivo. Para a determinação do grau de comprometimento (assintomático, leve a moderado ou demência) foram utilizados os critérios de Frascati conforme citado acima.

1.6. Intervenções Farmacológicas

O principal objetivo da terapia antirretroviral é prevenir a morbidade e mortalidade associadas à infecção pelo HIV. O tratamento com a TARV é eficaz para atingir e manter uma carga viral do HIV-1 (RNA viral) no plasma abaixo dos limites de detecção. A supressão viral duradoura melhora a função imunológica e a qualidade de vida geral, reduz o risco de complicações definidoras de aids e não definidoras de aids, e permite que PVHA vivam uma vida quase igual às aquelas sem HIV-1⁴¹.

Para alcançar esses objetivos, várias classes de medicamentos antirretrovirais são utilizadas em conjunto. Estes medicamentos agem bloqueando a penetração do HIV em células humanas ou inibindo a atividade de enzimas necessárias para a replicação do HIV e sua integração ao DNA humano.

As TARV são classificadas com base em sua ação específica contra o HIV. Os inibidores da transcriptase reversa, por exemplo, impedem a conversão do RNA do HIV em DNA, sendo divididos em três tipos: nucleosídeo, nucleotídeo e não nucleosídeo. Os inibidores de protease evitam a ativação de proteínas específicas nos vírus recém-produzidos, resultando em HIV imaturo e defeituoso que não pode infectar novas células. Há também inibidores de entrada, que bloqueiam a entrada do HIV nas células humanas, sendo necessária a ligação a um receptor CD4 e outro receptor, como o CCR5. Inibidores de integração e inibidores de fixação também desempenham papéis vitais, impedindo a integração do DNA do HIV ao DNA humano e a ligação do HIV às células T do hospedeiro, respectivamente, impossibilitando assim sua entrada nas células do sistema imunológico ⁴¹.

Assim como a infecção sistêmica pelo HIV-1, a infecção do SNC é acompanhada por inflamação local que é reduzida diante de TARV eficaz⁴².

Sendo assim, o tratamento com fármacos com maior índice de penetração no SNC (CPE, CNS penetration effectiveness) poderia estar associado a uma maior chance de carga viral indetectável no SNC, bem como a um melhor funcionamento cognitivo⁴³. Este modelo foi proposto em 2008 e atualizado em 2010. Este índice tem como base nas propriedades químicas dos medicamentos que influenciam sua penetração pela barreira hematoencefálica, dados farmacocinéticos, e quando disponíveis dados farmacodinâmicos.

As evidências disponíveis sugerem que regimes de TARV com pontuações mais altas de eficácia na penetração do sistema nervoso central estão associados a níveis mais baixos de RNA do HIV no LCR e a melhorias no funcionamento neurocognitivo. Estes avanços farmacológicos são essenciais para o tratamento eficaz da infecção pelo HIV, melhorando significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

1.7. Biomarcadores e HAND

Uma vez que sintomas neurológicos precoces são difíceis de serem reconhecidos, especialmente aqueles que não foram especificamente avaliados, e que o diagnóstico precoce pode ajudar a identificar indivíduos em risco de progressão para quadros mais graves ⁴³, a identificação de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico, ou com potencial preditivo para antecipar a progressão da HAND na era da terapia antirretroviral pós-combinação, é um passo fundamental para melhorar o tratamento ofertado aos pacientes.

Ao longo dos anos, diversos biomarcadores foram propostos para cumprir com essa função. Como por exemplo, a carga viral do HIV e o DNA proviral do HIV em células mononucleares⁴⁴, os níveis de CD163 solúvel no plasma e de quimiocinas como CXCL10. Mas apesar de terem demonstrado resultados promissores, não foram apresentados dados suficientes para que fossem oficialmente estabelecidos.

Todas as proteínas virais, em teoria, desempenham um papel na caracterização da infecção, porém, algumas delas têm sido destacadas como particularmente cruciais na determinação da natureza da infecção no sistema nervoso central (SNC) e suas consequências. O gene env (envelope) influencia

o tropismo por células T ou macrófagos (tropismo T ou M), os quais predominam em diferentes estágios da infecção no SNC. De maneira similar, os genes acessórios, como o *tat*, podem desempenhar um papel na neurotoxicidade²¹.

Tendo em vista que o LCR, é um coletor natural de biomoléculas por estar em contato direto com o cérebro, alterações em sua composição podem ser um reflexo de perturbações nos processos fisiológicos do SNC. Dessa forma, poderia dar indícios de uma condição patológica como a HAND. Dentre esses vários produtos de metabolismo que podem ser encontrados no LCR, estão os peptídeos⁴⁵.

Os peptídeos podem atuar na regulação de diversos processos biológicos e também foram descritos como peças chave em várias condições patológicas. Como por exemplo, os peptídeos β amilóides encontrados em quantidades elevadas em pacientes com Alzheimer⁴⁶. A análise abrangente de peptídeos tendo como fonte amostras biológicas, é chamada de peptidoma. De maneira semelhante ao proteoma, metaboloma e transcriptoma, está relacionado diretamente com o estado fisiológico de indivíduos ao nível peptídico⁴⁷. Representando também, uma das mais importantes fontes de informações de processos fisiopatológicos. Através da utilização de espectrometria de massas, para a realização do peptidoma, é possível analisar até milhares de peptídeos simultaneamente com alta precisão, alta sensibilidade e alto rendimento. O que a torna uma ferramenta valiosa na busca de biomarcadores⁴⁶.

A partir disso, este projeto propõe o estudo do perfil de peptídeos encontrados no líquido de indivíduos com HIV, visando a possibilidade de serem utilizados como biomarcadores de progressão da HAND, como também para estudos de incidência. Além disso, a comparação dos resultados obtidos com os dados clínicos dos pacientes, oferece uma oportunidade única, possibilitando o desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção e tratamento da HAND²¹.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o perfil peptidômico do HIV no LCR em pessoas vivendo com HIV que apresentam alterações neurocognitivas a fim de identificar possíveis padrões peptídicos específicos que possam contribuir para o entendimento da fisiopatologia e desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento dessas alterações.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar análise peptidômica das amostras de LCR, utilizando a técnica de espectrometria de massa.
- Identificar e semi-quantificar peptídeos específicos do HIV presentes no LCR nos grupos: pessoas vivendo com HIV e com alterações neurocognitivas e pessoas vivendo com HIV sem alterações neurocognitivas.
- Correlacionar os resultados de peptidoma obtidos com os dados clínicos e demográficos dos participantes, visando estabelecer relações entre os achados e características específicas da doença.

3. CASUÍSTICA

O trabalho foi realizado com delineamento de um estudo transversal com componente descritivo e analítico. O recrutamento dos indivíduos e coleta de amostras de sangue e líquido foram provenientes dos pacientes do Ambulatório de Imunodeficiências Adquiridas (ADEE 3002) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) durante o período de setembro de 2021 a dezembro de 2022.

O processamento das amostras para armazenamento foi executado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56); A punção do LCR foi realizada no Laboratório de Líquido Cefalorraquidiano do HCFMUSP, pelo Dr. Hélio Gomes, médico responsável pela coleta. A preparação do LCR foi realizada no Laboratório de Farmacologia dos Peptídeos Intracelulares, Departamento Farmacologia Instituto de Ciências Biomédicas-1, sob supervisão do Dr. Emer Ferro, professor responsável pelo laboratório. As amostras foram analisadas na Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz.

3.1. Seleção dos Participantes do Estudo

A população de estudo faz parte da coorte do Ambulatório de Imunodeficiências Secundárias ADEE 3002 do HCFMUSP. O ADEE 3002 faz parte da Divisão de Dermatologia. A coorte é composta por aproximadamente 450 PVHA, com uma taxa de adesão ao tratamento antirretroviral superior a 95% e média de linfócitos T CD4+ de 700 cel/mm³. Destes, mais de 50% estão acima dos 50 anos de idade, 73% são homens e 27% são mulheres⁴⁸.

Os indivíduos geralmente são provenientes do Banco de Sangue do HCFMUSP e encaminhados para o ambulatório para acompanhamento. São realizadas duas consultas ao ano e coletadas amostras para exames de rotina, como contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+, carga viral do HIV, avaliação das funções hepática e renal, perfil lipídico, glicose, hormônios (tireoidianos e do metabolismo ósseo) e hemograma completo.

A população do estudo foi selecionada entre pacientes oriundos de um estudo em andamento (projeto temático) ***“Incidência, fatores de risco, mecanismos patogênicos e prevenção de distúrbios neurocognitivos (HAND) entre indivíduos infectados com HIV-1”*** executado no HCFMUSP, sob supervisão do Dr. Jorge Casseb.

Como critérios de inclusão foram utilizados para os indivíduos do grupo de PVHA: diagnóstico positivo de infecção pelo HIV, acompanhados no ADEE 3002 - HCFMUSP, com idade igual ou superior a dezoito anos e com escolaridade mínima de quatro anos.

Os critérios de exclusão do presente trabalho foram:

- Indivíduos coinfectados com HTLV-1 e 2;
- Hepatite B e C;
- Sífilis
- Com diagnóstico de doenças neurológicas oportunistas em atividade (toxoplasmose cerebral, neurotuberculose;
- Meningite criptocócica;
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva, entre outras);
- Condições previamente documentadas (traumáticas, metabólicas, vasculares ou degenerativas) que dificultem a avaliação dos sintomas e sinais neurológicos (demência senil ou vascular, neuropatia diabética, entre outras);
- Uso de substâncias psicoativas, incluindo aquelas legais e não legais;
- Incapacidade para compreender os conteúdos necessários para a avaliação neurológica e aplicação dos testes incluídos na bateria de avaliação;
- Ausência de consentimento para participar do estudo;
- Escolaridade inferior a quatro anos;
- Menores de dezoito anos;
- Gestantes;
- Carga viral detectável;
- CD4 <350.

3.2. Aspectos Éticos

Os indivíduos que aceitaram participar desta pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Todos os dados individuais foram mantidos sob sigilo. É importante ressaltar que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CAEE: 44791921.0.1001.0068).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de dados dos Participantes

Os dados demográficos foram coletados no momento da apresentação da pesquisa e assinatura do TCLE (5.873.487). Os dados clínicos e laboratoriais de interesse foram coletados através dos resultados de exames disponíveis no HCMED, mediante autorização dos indivíduos.

4.2. Coleta de Amostras de Líquor

A punção liquórica foi realizada no laboratório de Líquor vinculado à Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em acordo com todas as práticas internacionalmente aceitas. Todas as amostras de LCR foram submetidas a exame quimiocitológico no Laboratório Central do HCFMUSP.

Além da amostra para análise de rotina, foram coletados seis mililitros (6 mL) de amostra em tubo de polipropileno. Dentro de até duas horas após a coleta, realizou-se o processamento do LCR. Para isso, os tubos foram centrifugados a 100 xg durante 5 minutos em centrífuga ajustada a temperatura de 4°C. Após a centrifugação, foram alíquotados 3 mL do LCR em um tubo de fundo cônico de 15mL, e mais 3 alíquotas de 1mL em tubos eppendorf de 1,5mL. Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C. Essas etapas garantem a adequada manipulação e preservação das amostras para análises futuras.

4.3. Coleta de Amostras de Sangue

As amostras de sangue periférico foram coletadas por meio de punção venosa em três tubos, um de EDTA (4 mL) e dois de heparina (9 mL).

4.4. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Foram coletados 20 mL de sangue, em tubo heparinizado de cada paciente. As amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) utilizando gradiente de densidade *FicollPaque Plus* (GE Healthcare Life Sciences, United Kingdom).

As células foram contadas, avaliadas quanto a viabilidade e congeladas em Soro Fetal Bovino (SFB) (*Gibco, Estados Unidos*) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma Aldrich, Alemanha*), e armazenadas em nitrogênio líquido até a realização dos experimentos.

O tubo de EDTA foi centrifugado a 500 xg por 10 minutos e os respectivos plasma e buffy coat foram armazenados em alíquotas de 1 mL cada em freezer -80°C.

4.5. Peptidoma

Para realizar a análise peptidômica, tubos contendo 3 mL de LCR armazenados em freezer -20°C foram colocados em banho maria a 80°C durante 20 min, essa etapa garante a desnaturação das proteínas e, portanto, a inativação de todas as enzimas, e evita a degradação dos peptídeos das amostras durante o processamento posterior. Com a degradação enzimática inativada, as amostras foram resfriadas por 30 min em gelo e, em seguida, acidificadas com HCl para uma concentração final de 10 mM.

As amostras foram centrifugadas a 3.000 xg, e o sobrenadante submetido a filtração de exclusão molecular em membranas de 10 KDa (Amicon, Merck Millipore), previamente lavadas em água ultrapura, que eliminam proteínas com massa molecular relativa acima de 10 KDa. O material filtrado, contendo peptídeos, foi purificado em colunas de cromatografia C18, OASIS (Waters, Inc.).

Para tal, as colunas OASIS foram previamente lavadas com 1 mL de acetonitrila, em seguida com 1 mL de acetonitrila 5% contendo 0,1% de ácido fórmico, sendo todas as soluções deixadas fluir pela gravidade. Após isso, as amostras foram aplicadas nessas colunas que, em seguida, foram lavadas com 1 mL de acetonitrila 5% contendo 0,1% de ácido fórmico, e a eluição dos peptídeos foi realizada com 1,8 mL de acetonitrila 100%, contendo 0,15% de ácido fórmico (Figura 4). As amostras foram semi-secas em “speed-vac” (Eppendorf) por aproximadamente 2hs, 30 °C.

Os precipitados resultantes da secagem por evaporação foram ressuspensos com 60 µL de água ultrapura, e os peptídeos quantificados por absorbância a 214nm. As reações de marcação isotópica das amostras,

baseada na dimetilação de grupamentos amina, foram realizadas para conferir aos peptídeos de cada grupo experimental um ganho de massa de 28, 30, 32 ou 36 Da, conforme previamente planejado.

Para o ensaio de marcação isotópica, 10 µg de peptídeos foram reconstituídos com 100 mM de tampão bicarbonato de trimetilamônio (TEAB, Sigma) e o pH ajustado entre 5-6, utilizando fitas de pH. Foi adicionado formaldeído regular, formaldeído deuterado ou formaldeído com ^{13}C , para uma concentração final de 0,04%. Em seguida, foi adicionado cianoborohidreto de sódio regular ou deuterado 1 para uma concentração final de 24 mM.

As amostras foram incubadas por 18 horas com temperatura 22°C, e as reações interrompidas com a adição de bicarbonato de amônio, na concentração final de 0,16%. Após 5 min em gelo as amostras foram acidificadas com ácido fórmico 0,4% e, em seguida, as amostras com diferentes marcadores agrupadas em um único tubo (contendo uma amostra de cada grupo experimental)^{49,50}.

Essas amostras de peptídeos foram então purificadas em colunas OASIS, e os peptídeos obtidos foram analisados no sistema Orbitrap Fusion Lumos e foram conduzidas no Espaço Tecnológico na unidade de Espectrometria de Massas – código RPT02H – localizada no Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná.

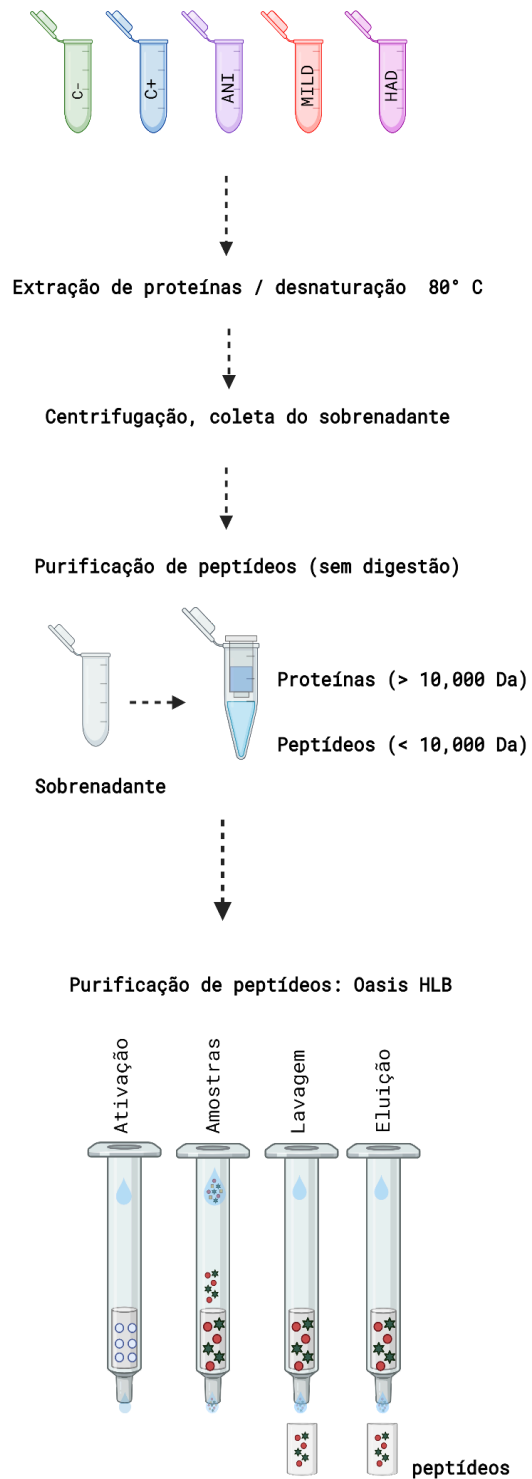


Figura 4. Extração de Peptídeos do LCR (Líquido Ceforraquidiano). **Legenda:** **C-** Controle HIV Negativo, **C+** Controle HIV Positivo - Sem alteração, **ANI** Alteração Neurocognitiva Assintomática, **MILD** - Comprometimento Neurocognitivo Leve/Moderado **HAD** - Demência Associada ao HIV.

4.6. Análise estatística

Os dados foram coletados dos registros médicos, incluídos no HCMED (HC/FMUSP). A análise foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism® v.9. Para determinar a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados, aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em casos de dados paramétricos, realizou-se o teste T independente com ou sem a correção de Welch para comparar os grupos normal e HAND. Para dados não paramétricos, empregou-se o teste de Mann-Whitney. O teste exato de Fisher foi executado para avaliar a presença de diferenças significativas nos dados que envolviam frequências. O nível de significância estatística foi estabelecido com $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

O projeto temático ***"Incidência, fatores de risco, mecanismos patogênicos e prevenção de distúrbios neurocognitivos (HAND) entre indivíduos infectados com HIV-1"*** teve início em 2018. Desde 2016, nosso grupo tem realizado a aplicação de testes neuropsicológicos. Em 2019, iniciamos a aplicação dos testes neuropsicológicos no estudo ADEE3002. No mesmo ano, um outro subprojeto contemplou o estudo de Ressonância Magnética ("Avaliação do volume cerebral e a possibilidade de HAND"). Dando sequência, em 2021, foi feita a triagem dos pacientes que realizaram os testes neuropsicológicos entre 2019 e 2021, abordando um total de 54 indivíduos. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão do projeto, excluimos 30 pacientes e incluimos 24 PVHA na amostra. Prosseguindo, em 2021, coletamos o LCR dos 24 PVHA. Em 2022, realizamos a análise peptidômica para obter mais informações sobre os distúrbios neurocognitivos em indivíduos infectados com HIV-1. O cronograma do projeto temático está representado na linha do tempo na Figura 5.

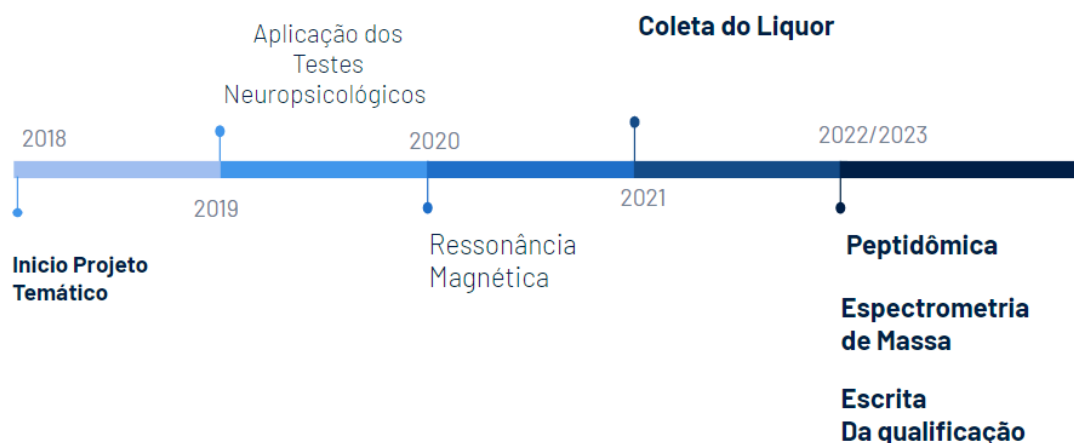


Figura 5. Linha do tempo de execução do projeto temático até o presente momento do estudo.

Para a realização da seleção inicial de amostras foram abordados 54 indivíduos, de 450 em seguimento ativo. Considerando os critérios de inclusão e exclusão do presente projeto, 30 pacientes foram excluídos, e 24 pacientes PVHA foram incluídos. O fluxograma de recrutamento dos indivíduos e suas respectivas inclusões e exclusões estão apresentados na Figura 6.

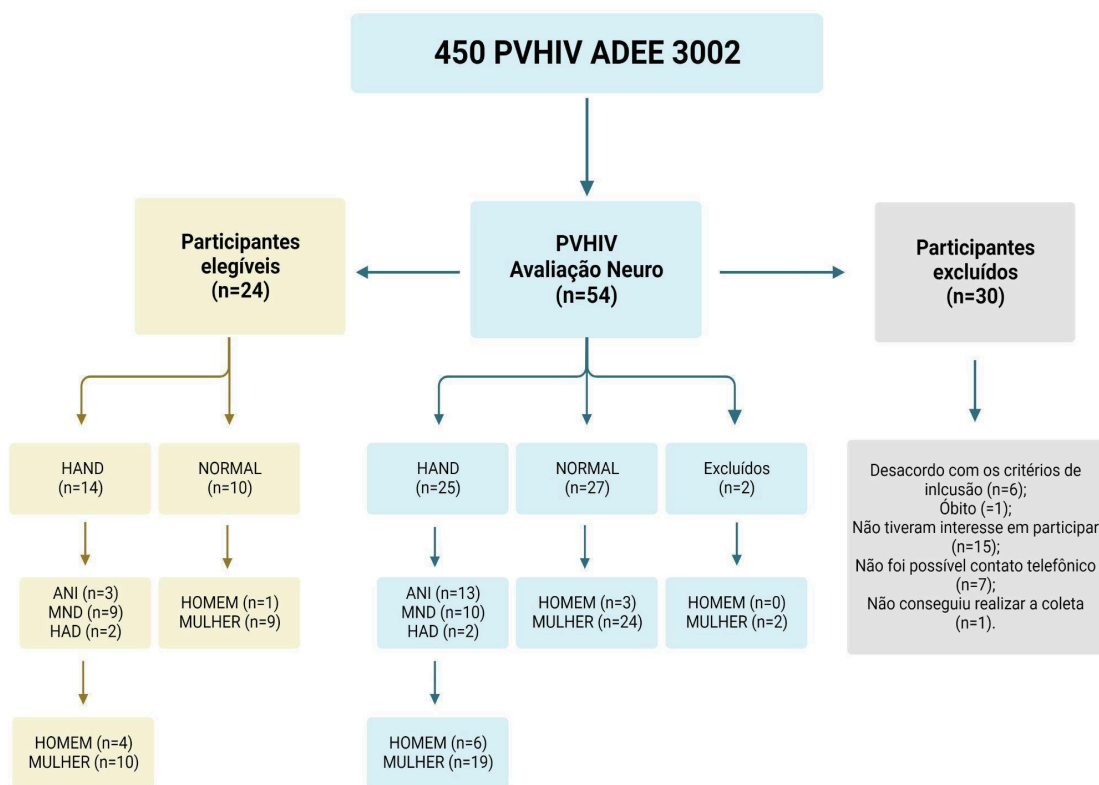


Figura 6. Fluxograma de elegibilidade, inclusão e exclusão de pacientes representativos da coorte do ambulatório ADEE3002 que foram avaliados para o presente estudo.

Após aplicação do protocolo neuropsicológico e seleção da amostragem do estudo, foi possível observar que 10 (41,7%) dos participantes não apresentaram comprometimento cognitivo. Entre as 24 pessoas avaliadas, 14 (58,3%) apresentaram comprometimento associado à infecção pelo HIV. Tendo como base os critérios de classificação de HAND, foram encontrados 3 (12,5%) participantes com a forma ANI, 9 (37,5%) com a forma MND e 2 (8,3%) com a forma HAD (fig. 7).

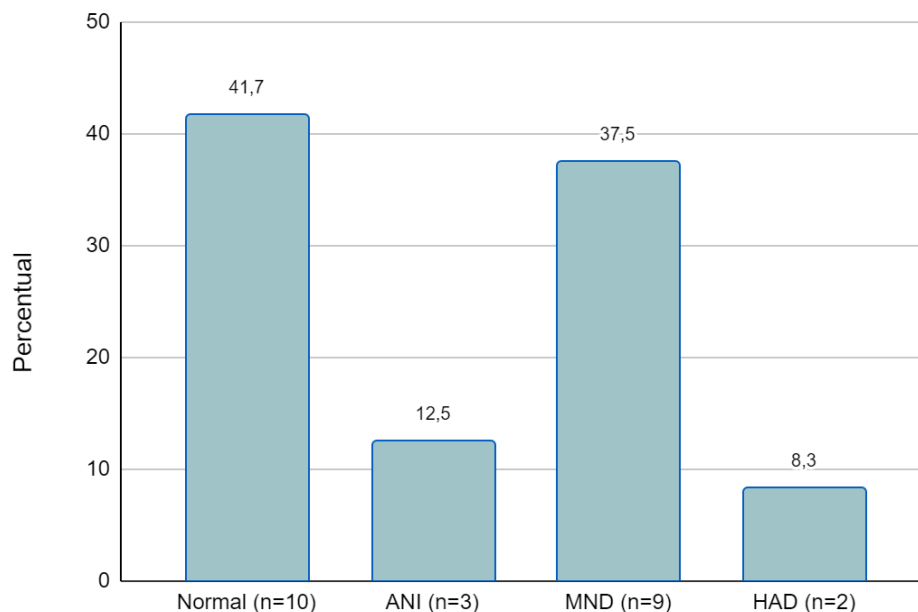


Figura 7. Distribuição dos indivíduos selecionados de acordo com a classificação da HAND. Normal: indivíduos vivendo com HIV sem transtorno neurocognitivo; ANI: alteração neurocognitiva assintomática; MND: comprometimento neurocognitivo leve/moderado e HAD: demência associada ao HIV.

A média de idade dos participantes foi de 46,8 anos (DP= 9,8), 79,2% dos participantes foram mulheres e 20,8 % homens. A escolaridade média da população do estudo foi de 11,1 anos (DP= 3,7) (Tabela 1).

Tabela 1. Aspectos sociodemográficos de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação cognitiva.

Variável	Categoria	Total 24 (100%)	Normal 10 (41,7%)	HAND 14 (58,3%)	Valor P	OR
Idade (anos) média ± DP		46,8 (9,8)	44,4 (8,6)	48,4 (10,5)	0,3 [@]	
Sexo (biológico) (n, %)	feminino	19 (79,2%)	9 (37,5%)	10 (41,7%)	0,4 [#]	3,6
	masculino	5 (20,8%)	1 (4,2%)	4 (16,7%)		
Escolaridade (anos) média ± DP		11,1 (3,7)	11,7 (3,5)	10,7 (3,9)	0,4 [@]	

[@]Teste T Independente, [#]Teste exato de Fisher, DP Desvio Padrão, OR, Odds Ratio. HAND: Transtorno Neurocognitivo Associado ao HIV.

Referente aos dados clínicos apresentados na Tabela 2, a contagem de linfócitos T CD4+ apresentou uma tendência à diferença estatística ($p=0,08$) entre os grupos, sendo possivelmente devido a uma ligeira diminuição dessas células no grupo HAND (688 cels/mm³, DP = 286) em comparação com o grupo normal (1011 cels/mm³, DP = 474), porém, essa diferença não foi significativa.

Outra tendência visualizada foi o nadir das células T CD4+ ($p=0,09$) (tabela 2). Uma possível explicação para a tendência estatística são valores menores no grupo HAND (254 cels/mm³, DP = 204) em comparação com o grupo normal (405 cels/mm³, DP = 290), porém novamente sem significância estatística.

Além disso, não foram encontradas diferenças na contagem média de células T CD8+ e nem nos demais parâmetros clínicos analisados como: tempo de tratamento, regime antirretroviral, glicose, colesterol e comorbidades (diabetes, hipercolesterolemia e hipertensão), entre as categorias de classificação neurocognitiva (tabela 3).

Tabela 2. Características laboratoriais de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).

Variável	Categoria	HIV Total 24 (100%)	Normal 10 (41,7%)	HAND 14 (58,3%)	Valor P	OR
Células T CD4+ (cels/mm ³) média ± DP	-	822 (401)	1011 (474)	688 (286)	0,08	
Nadir T CD4 (cels/mm ³)	Nadir CD4 (cels/mm ³) média ± DP	317 (249)	405 (290)	254 (204)	0,1	
	< 350 cels/mm ³ (n, %)	17 (70,8%)	5 (20,8%)	12 (50%)	0,09	0,2
	> 350 cels/mm ³ (n, %)	7(29,2%)	5 (20,8%)	2 (8,3%)		
Células T CD8+ (cels/mm ³) média ± DP	-	872 (335)	911 (327)	844 (349)	0,6	
CPE (n, %)	≤6	1 (4,2%)	0 (0%)	1 (4,2%)		
	>6	23 (95,8%)	10 (41,7%)	13 (54,2%)		
Uso de TARV (n, %)	-	24 (100%)	10 (41,7%)	14 (58,3%)		
Tempo de Tratamento (anos) média ± DP	-	12,54 (4,1)	11,4 (4,6)	13 (3,6)	0,4	
Regime Antirretroviral	Efavirenz no regime	6 (25%)	2 (8,3%)	4 (16,7%)	>0,9	0,6
	Uso de DTG / 3TC / TDF / DRV / RTV/ 3TC / TDF	18 (75%)	8 (33,3%)	10 (41,7%)		

Teste T Independente, Teste exato de Fisher, DP Desvio Padrão, OR, Odds Ratio. HAND: Transtorno Neurocognitivo Associado ao HIV. *todas as PVHA estão com CV indetectável no plasma.

Tabela 3. Dados metabólicos do sangue de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).

Variável	Categoria	HIV Total 24 (100%)	Normal 10 (41,7%)	HAND 14 (58,3%)	Valor P	OR
Glicose (mg/dL) média ± DP	-	93 (11,6)	91 (11,3)	94,4 (12)	0,5	
Diabetes Mellitus	sim	2 (8,3%)	1 (4,2%)	1 (4,2%)	>0,9	1,4
	não	22 (91,7%)	9 (37,5%)	13 (54,2%)		
Colesterol Total (mg/dL) média ± DP	-	169 (26)	170,4 (28)	168 (25)	0,2	
Hipercolesterol emia	sim	3 (12,5%)	2 (8,3%)	1 (4,2%)	0,6	3,3
	não	21 (87,5%)	8 (33,3%)	13 (54,2%)		
LDL (mg/dL) média ± DP	-	101,6 (21)	102,5 (24)	100,9 (18)	0,2	
Hipertensão	sim	7 (29,2%)	2 (8,3%)	5 (20,8%)	0,7	0,5
	não	17 (70,8%)	8 (33,3%)	9 (37,5%)		

Teste T Independente, Teste exato de Fisher, DP Desvio Padrão, OR, Odds Ratio. HAND: Transtorno Neurocognitivo Associado ao HIV. Valores de referência para colesterol total: Desejável: abaixo de 170 mg/dL. Valores de referência para LDL: Desejável: Entre 100 e 129 mg/dL, Limítrofe: Entre 130 e 159 mg/dL, Alto: Entre 160 e 189 mg/dL, Muito alto: Maior ou igual a 190 mg/dL.

Após a análise dos dados clínicos e demográficos, passamos aos dados metabólicos do LCR que foram realizados na rotina do laboratório - divisão do laboratório central do HCFMUSP e obtidos no HCMED. Foram analisadas as concentrações de proteínas e células no LCR de 24 pacientes com diferentes condições relacionadas ao HIV (tabela 3).

Ao analisar as proteínas no LCR, não encontramos diferenças significativas nas Proteínas Totais (mg/dL) entre os grupos ($p=0,578$). Entretanto, foi observado uma tendência para níveis mais baixos de Albumina (%) em pacientes com HAND ($p=0,071$).

Tabela 4. Dados metabólicos do LCR de pessoas vivendo com HIV de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).

Variável	HIV Total 24 (100%)	Normal 10 (41,7%)	HAND 14 (58,3%)	Valor P
Proteínas Totais (mg/dL) média ± DP	29,8 (7,4)	28,7 (9,0)	30,6 (6,2)	0,578
Pré-albumina (%) média ± DP	5,8 (2,0)	6,6 (1,8)	5,2 (2,0)	0,385
Albumina (%) média ± DP	46,4 (11,5)	50,8 (6,1)	43,3 (13,5)	0,071
Alfa-1 (%) média ± DP	4,2 (1,5)	4,3 (1,5)	4,1 (1,6)	0,666
Alfa-2 (%) média ± DP	6,1 (2,0)	6,6 (1,9)	5,8 (2,1)	0,382
Beta + tau (%) média ± DP	20,6 (5,6)	21,6 (3,4)	19,9 (6,9)	0,931
Gama (%) média ± DP	12,7 (5,6)	10,0 (2,2)	14,6 (6,6)	0,028
Glicose (mg/dL) média ± DP	62,3 (6,9)	62,6 (7,4)	62,1 (6,8)	0,879
Células Totais (cels/mm ³) média ± DP	2,8 (1,6)	1,9 (1,0)	3,4 (1,8)	0,029
Linfócitos (%) média ± DP	63,8 (20,8)	72,9 (12,6)	57,4 (23,3)	0,048
Monócitos (%) média ± DP	23,7 (13,4)	22,5 (9,3)	24,5 (16,0)	0,703
Neutrófilos (%) média ± DP	7,2 (13,9)	3,7 (9,6)	9,6 (16,1)	0,108
Basófilos (%) média ± DP	0,1 (0,3)	0,2 (0,4)	0,1 (0,3)	0,550
Plasmócitos (%) média ± DP	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	>0,999
Eosinófilos (%) média ± DP	0,2 (0,5)	0,1 (0,3)	0,3 (0,6)	0,529
Macrófagos (%) média ± DP	0,8 (1,1)	0,5 (1,0)	0,9 (1,1)	0,239
Hemácias (cels/mm ³) média ± DP	370 (1178)	124 (358)	546 (1512)	0,235

Teste T Independente ou Teste T de Welch, Teste de Mann-Whitney, DP Desvio Padrão. HAND: Transtorno Neurocognitivo Associado ao HIV.

Em relação à fração Gama (%), houve uma diferença significativa ($p=0,028$), com valores mais elevados nos casos de HAND. Por outro lado, o

percentual de Linfócitos (%) mostraram uma diferença significativa ($p=0,048$) com níveis mais baixos nesse grupo (Fig. 8).

Em relação às células no LCR, foi identificada uma diferença significativa nas Células Totais (cels/mm³) ($p=0,029$), com pacientes com HAND exibindo níveis mais elevados em comparação com o grupo sem alteração (Fig. 8). Esta elevação sugere uma resposta imune-inflamatória intensificada no SNC, que poderia resultar em dano neurológico.

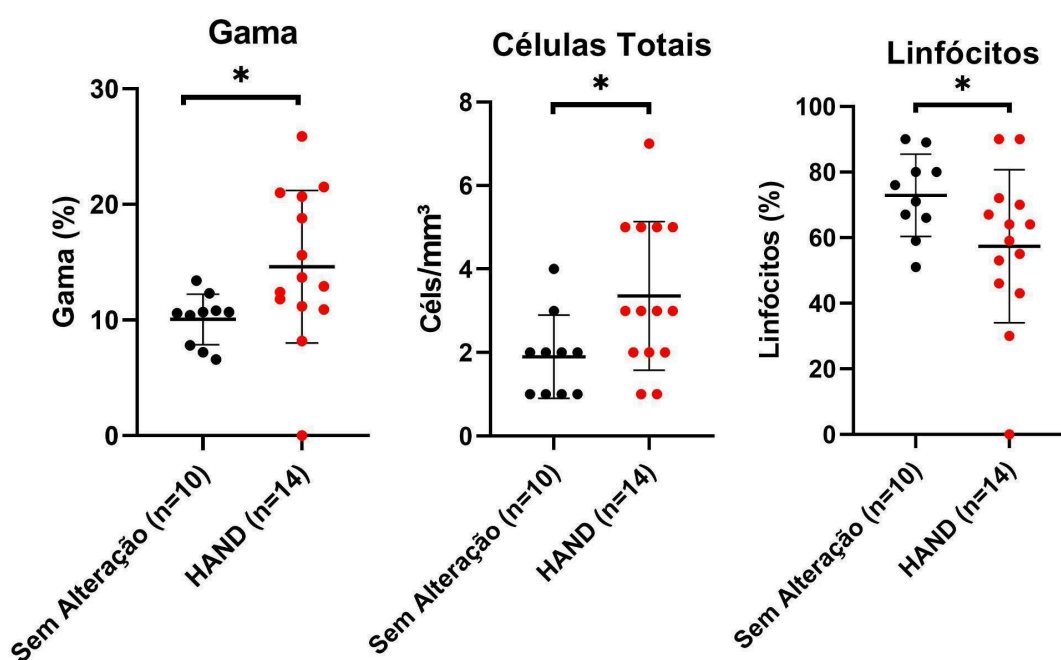


Figura 8. Principais alterações metabólicas do LCR de PVHA de acordo com a classificação Neurocognitiva (Escala de Frascati).

Os resultados indicam que pacientes com HAND exibem não apenas alterações nas concentrações de Albumina e Proteína Gama no LCR, mas também uma elevação significativa nas Células Totais e diminuição dos linfócitos, sugerindo uma complexidade adicional nas complicações neurológicas relacionadas ao HIV. Outros trabalhos já descreveram ativação de monócitos e marcadores neuro inflamatórios como Interferon gama, IL-8 e TNF associados a distúrbios neurocognitivos em PVHA⁵¹, e pacientes com demência.

Após a análise dos dados metabólicos do LCR, passamos aos dados do peptidoma do HIV no LCR. A Tabela 4 mostra as sequências de aminoácidos

dos 11 peptídeos identificados, suas proteínas precursoras, com respectiva localização subcelular predominante. Para a comparação da marcação isotópica das amostras foi realizado um pool em um único tubo contendo: amostras de pacientes com HAND, dos controles positivos e negativos. Este tubo contendo o *pool* foi analisado por espectrometria de massa para identificar proteínas ou peptídeos.

Os arquivos de dados brutos foram convertidos para o formato de lista de picos (mgf) pelo Mascot Distiller versão 2.7.1 (Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido) e analisados pelo mecanismo de busca MASCOT versão 2.6.2 (Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido), onde as sequências dos peptídeos foram comparadas com bancos de sequências de proteínas, como o UniProt e o National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Utilizando o software Mascot Distiller⁵²⁻⁵⁴, foram identificados 1346 peptídeos distintos em nosso estudo. Dentre esses, constatou-se que 11 peptídeos foram detectados em mais de duas repetições, em um total de oito corridas realizadas. Esses peptídeos foram considerados de maior relevância dentro do escopo da presente pesquisa.

A análise peptidômica identificou a frequência de peptídeos intracelulares de interesse em cada um dos grupos analisados (Figura 9), bem como o aumento ou redução desses peptídeos em indivíduos com MND quando comparados com os grupos de PVHA sem alteração e indivíduos com ANI (Tabela 5). Esses resultados preliminares sugerem que esses peptídeos podem estar envolvidos nas vias de sinalização intracelular associadas à progressão das alterações neurocognitivas no contexto do HIV. Estudos futuros devem aprofundar nossa compreensão do papel dos peptídeos aumentados nessas alterações, bem como buscar possíveis estratégias terapêuticas para modular sua atividade.

Tabela 5. Peptídeos intracelulares identificados de forma semiquantitativa no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pessoas vivendo com HIV e alterações cognitivas associadas ao HIV - HAND.

Nome da Proteína Precursora	Sequência de Peptídeo	Localização Subcelular no Vírus	Localização Subcelular no Hospedeiro	ANI/C+	MND/C+	HAD/C+	NI em que foi identificado
Proteína Gag	AGAGSNSK	C, N, V	C, N				7/24
Proteína Pol	DEQLCLDFV	M	-				10/24
Poliproteína Gag	FSALSEGATPGDL	CP, N, V, C	C, N				9/24
Glicoproteína do envelope	GRALYATGT	E, V	-				8/24
Glicoproteína do envelope	IGGGRTLHTTRAITG	E, V	-				9/24
Proteína Pol	QYDQVPIEICGHKAIGIVL	-	-				7/24
Glicoproteína do envelope	RAGCNLNGT	E, V	-				7/24
Poliproteína Gag	RPGSGSK	CP, N, V, C	C, N				7/24
Proteína Gag	TETLLIQNAN	N, V, C	N, C				9/24
Proteína Pol	TKLGCNLN	C	-				10/24
Protease	WEMENDGKIS	C	-				7/24

As linhas da tabela representam a sequência de peptídeo identificado semi-quantitativamente pelo Mascot após análises de dados LC-MS/MS. A escala de cores indica a variação em relação à média, sendo que valores em vermelho indicam aumento (>2.0), valores em verde indicam diminuição (<0.5) e peptídeos sem rótulo estão na faixa de concentração relativa entre 0.5 e 2.0. Foram realizadas 8 corridas em duplicatas biológicas (n = 4) em duplicatas (replicatas técnicas, marcação direta e reversa) com cada amostra marcada com um isótopo diferente. As células em branco representam grupos com baixo número amostral, não sendo possível realizar análise. (C) Citoplasma; (N) núcleo; (V) virion; (M) Membrana; (CP) Capsídeo; (E) Envelope viral. (NI) Número de indivíduos em que foi identificado.

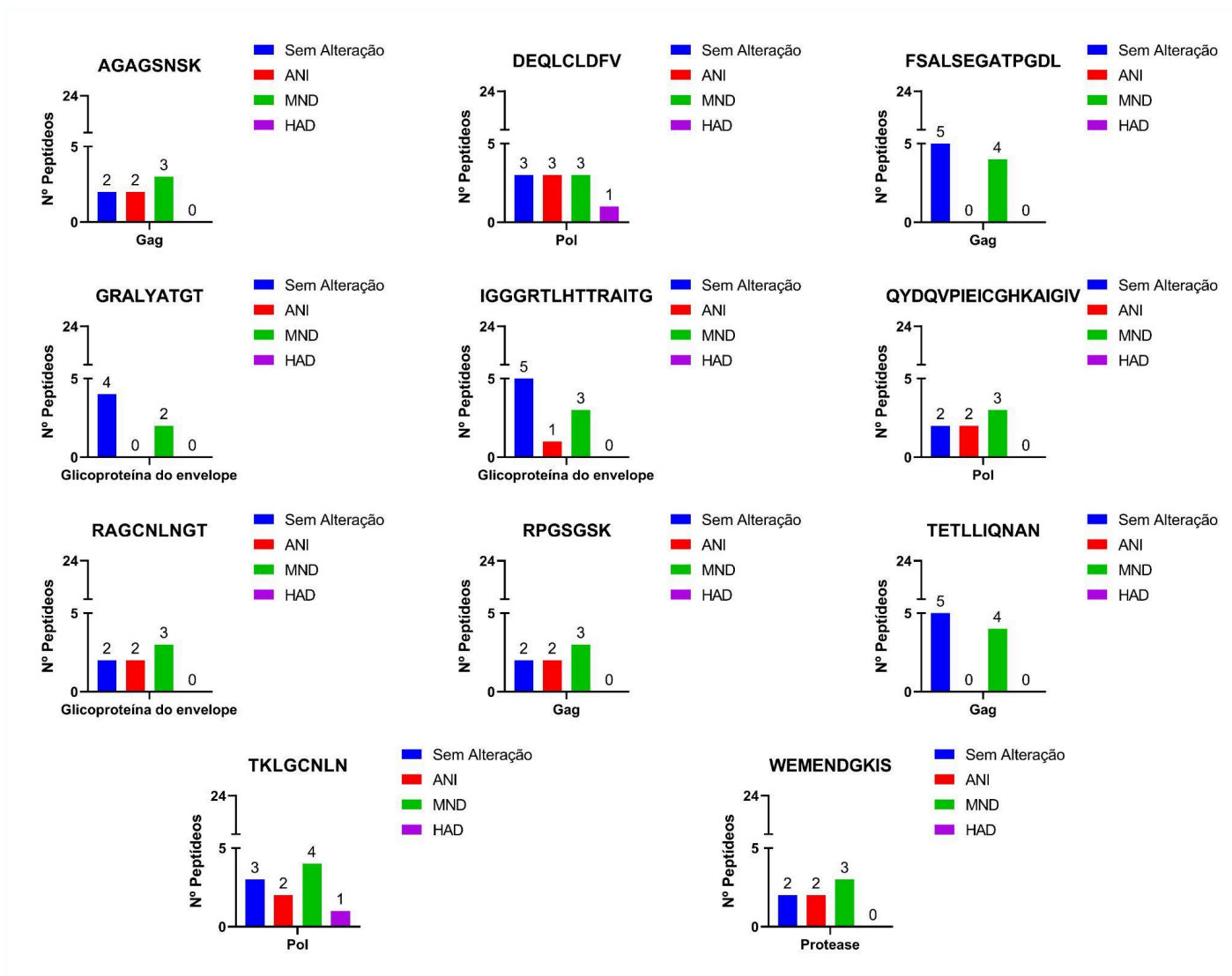


Figura 9. Frequência de indivíduos em cada grupos de estudo classificados de acordo com os critérios de Frascati onde os peptídeos foram encontrados durante a realização da técnica.

6. DISCUSSÃO

Desde 2016, nossa coorte tem se dedicado ao estudo da incidência e prevalência do comprometimento neurocognitivo associado ao HIV (HAND). Neste estudo específico, identificamos uma prevalência de 58,3% de HAND entre os participantes. Além disso, os valores de TCD4, NADIR e a presença de comorbidades estão em concordância com achados previamente descritos em outros estudos.

Nossos resultados reafirmam os achados previamente descritos na literatura, que relatam uma variação de prevalência entre 20% e 50% de HAND, levando em consideração fatores como o país de origem, características da população investigada e os instrumentos de avaliação utilizados⁵⁵. Portanto, os valores obtidos nesta coorte, consistentes com estudos anteriores, reforçam a relevância e a continuidade das investigações sobre a incidência e prevalência da HAND, bem como a relação entre os valores de TCD4, NADIR, comorbidades e a ocorrência do comprometimento neurocognitivo associado ao HIV.

Desde o início da epidemia de HIV/aids, a HAND tem sido comumente observada³⁶. As causas das altas taxas contínuas de HAND são incertas, mas várias possibilidades foram sugeridas: lesão cerebral irreversível prévia à terapia antirretroviral combinada; supressão viral incompleta no SNC devido à penetração inadequada de algumas drogas antirretrovirais; cepas virais resistentes a medicamentos; exposição a inflamações crônicas e proteínas virais neurotóxicas; neurotoxicidade de medicamentos antirretrovirais; além de condições como anormalidades metabólicas, patologia vascular e deposição de β -amilóide no cérebro, que podem afetar a cognição a longo prazo⁵⁶.

De acordo com os critérios de exclusão, todos os indivíduos apresentaram carga viral plasmática indetectável (<40 cópias/mL). Dos 24 indivíduos do estudo, a carga viral do LCR foi avaliada em 12 pacientes (Adolfo Lutz), todos com resultado indetectável. Estamos em discussão sobre a necessidade de realizar a carga viral nos demais LCR coletados, devido à dificuldade de acesso a esse material, buscando dar continuidade ao estudo, porém questiona-se se o uso da mesma metodologia e equipamento para

sangue e LCR seria viável, ou se uma re-padronização da detecção da carga viral para LCR seria mais fidedigna.

Apesar dos pacientes demonstrarem boa adesão ao tratamento, carga viral indetectável, contagem adequada de CD4 e controle efetivo de comorbidades, uma elevada prevalência de HAND foi identificada. Esses resultados destacam a necessidade de investigar mais a fundo os fatores que contribuem para o desenvolvimento da HAND na era da HAART. Um foco direcionado à prevenção da HAND a fim de identificar possíveis estratégias de intervenção mais eficazes para controle e eficácia de tratamento.

A espectrometria de massa por spray de elétrons e a marcação isotópica foram combinadas para identificar e semi quantificar os peptídeos intracelulares do LCR. Devido ao fato de o LCR estar em contato direto com o cérebro, ele serve como um coletor natural de biomoléculas. Alterações na composição do LCR podem ser indicativas de perturbações nos processos fisiológicos do sistema nervoso central.

As proteínas regulam a função celular e as vias de sinalização, que muitas vezes são desreguladas em doenças humanas^{57,57}. A peptidômica é uma abordagem utilizada para identificar e caracterizar peptídeos presentes em amostras biológicas, sem a necessidade de digerir as proteínas. Ao invés disso, essa técnica busca identificar os peptídeos que já estão naturalmente presentes nos materiais analisados⁵²⁻⁵⁴.

De acordo com o estudo de Ferro et al⁵⁸, que investigou o perfil peptidômico do líquido cefalorraquidiano de pacientes com aneurismas saculares intracranianos, mudanças significativas nos níveis de peptídeos derivados de proteínas intracelulares também foram relatadas em distúrbios humanos, sugerindo que a peptidômica, de forma semelhante à proteômica, pode ser uma ferramenta valiosa para identificar biomarcadores. A peptidômica pode fornecer informações adicionais sobre as atividades proteolíticas que ocorrem em um contexto fisiopatológico e uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares das doenças.

O estudo de Bora A,⁵⁹ teve a mesma dificuldade que a nossa quanto ao baixo número amostral de casos de HAD. Eles utilizaram a proteômica para identificar biomarcadores da HAND, onde foram analisadas proteínas em amostras de LCR de indivíduos saudáveis, pacientes HIV+ com HAND e

pacientes HIV+ sem HAND. As proteínas identificadas representam candidatas promissoras, porém requerem validação em uma coorte maior e estudos longitudinais. Além disso, as interações entre essas proteínas e as proteínas do HIV, bem como suas conexões com outras doenças neurológicas, revelam a complexidade do HAND e apontam para novas perspectivas de pesquisa futura.

Sendo assim, esses estudos corroboram com a hipótese que existem peptídeos virais no SNC de PVHA que podem estar associados a HAND. Portanto, essas alterações podem facilitar o entendimento dos mecanismos e condições patológicas, como a HAND.

Durante a realização desta pesquisa, enfrentamos uma série de dificuldades decorrentes da pandemia de SARS-CoV-2. As restrições impostas pela pandemia resultaram em interrupções nos testes neuropsicológicos conduzidos pela equipe de psicologia, o que impactou no cronograma do estudo. Nesse sentido, houve uma diminuição no número de participantes disponíveis devido aos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos pelo algoritmo do estudo. Também enfrentamos a recusa de alguns pacientes em realizar a coleta de líquido, devido ao desconforto ou medo associado ao procedimento. Além disso, a utilização de um equipamento externo ao laboratório apresentou problemas, exigindo mais tempo tanto para a execução quanto para a análise dos dados. Apesar dessas dificuldades, foram adotadas medidas para minimizar os impactos e assegurar a qualidade da pesquisa.

7. CONCLUSÃO

Nossa coorte de PVHA estava sob uso de TARV e 100% deles apresentaram carga viral plasmática indetectável, sendo que 12 deles também apresentaram com líquórica indetectável. A realização de carga viral no líquido das outras 12 amostras foi inviabilizada. Não houve correlação direta das TARV's que possuíam CPE maior ou menor não com a presença ou ausência de HAND.

Em relação aos dados laboratoriais de rotina das PVHA não houve diferença significativa entre o grupo com ou sem HAND em nenhum dos parâmetros avaliados. No entanto, o exame de rotina de LCR revelou maior frequência de Gama e maior quantidade de células totais nos pacientes com HAND, indicando um potencial rastro neuroinflamatório que pode estar relacionado com a doença.

A análise dos peptídeos intracelulares revelou variações significativas em suas sequências, com aumento ou diminuição em indivíduos com MND em comparação com grupos de PVHA sem alterações e indivíduos com ANI. É possível que esses peptídeos desempenham um papel importante nas vias de sinalização intracelular na HAND.

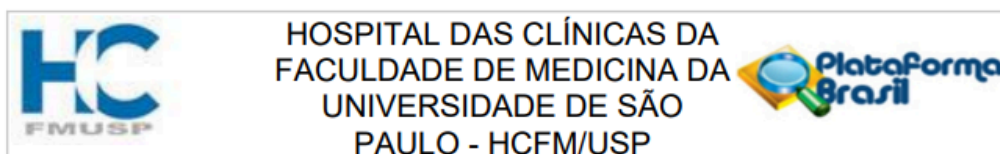
REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. HIV. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>>. Acesso em: 20 jun. 2023.
2. boletim-epidemiologico-especial-hiv-aids-2021.pdf.
3. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*. 2005;34:233–44.
4. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1981;30:250–2.
5. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:865–7.
6. 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;220:868–71.
7. Banapour B, Sernatinger J, Levy JA. The AIDS-associated retrovirus is not sensitive to lysis or inactivation by human serum. *Virology*. 1986;152:268–71.
8. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984;224:500–3.
9. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1981;30:250–2.
10. Marx JL. Strong New Candidate for AIDS Agent: A newly discovered member of the human T-cell leukemia virus family is very closely linked to the immunodeficiency disease. *Science*. 1984;224:475–7.
11. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2013. Disponível em [manual_tecnico_diagnostico_infeccao_hiv.pdf](#).
12. Prevedel L, Ruel N, Castellano P, Smith C, Malik S, Villeux C, et al. Identification, Localization, and Quantification of HIV Reservoirs Using Microscopy. *Curr Protoc Cell Biol*. 2019;82:e64.
13. Navia BA, Price RW. The acquired immunodeficiency syndrome dementia complex as the presenting or sole manifestation of human immunodeficiency virus infection. *Arch Neurol*. 1987;44:65–9.
14. Zayyad Z, Spudich S. Neuropathogenesis of HIV: From Initial Neuroinvasion to HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND). *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015;12:16–24.
15. Saylor D, Dickens AM, Sacktor N, Haughey N, Slusher B, Pletnikov M, et al. HIV-associated neurocognitive disorder — pathogenesis and prospects for treatment. *Nat Rev Neurol*. 2016;12:234–48.
16. Uleri E, Mei A, Mameli G, Poddighe L, Serra C, Dolei A. HIV Tat acts on endogenous retroviruses of the W family and this occurs via Toll-like receptor 4: inference for neuroAIDS. *AIDS*. 2014;28:2659–70.

17. Kaul M. HIV-1 associated dementia: update on pathological mechanisms and therapeutic approaches. *Current Opinion in Neurology*. 2009;22:315–20.
18. McArthur JC, Steiner J, Sacktor N, Nath A. HIV-associated neurocognitive disorders: 'mind the gap'. *Ann Neurol*. 2010;NA-NA.
19. Kaul M, Zheng J, Okamoto S, Gendelman HE, Lipton SA. HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system. *Cell Death Differ*. 2005;12:878–92.
20. Lawrence DM, Major EO. HIV-1 and the brain: connections between HIV-1-associated dementia, neuropathology and neuroimmunology. *Microbes and Infection*. 2002;4:301–8.
21. Meyer AC, Njamnshi AK, Gisslen M, Price RW. Neuroimmunology of CNS HIV Infection: A Narrative Review. *Front Neurol*. 2022;13:843801.
22. Bednar MM, Sturdevant CB, Tompkins LA, Arrildt KT, Dukhovlina E, Kincer LP, et al. Compartmentalization, Viral Evolution, and Viral Latency of HIV in the CNS. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015;12:262–71.
23. Rojas-Celis V, Valiente-Echeverría F, Soto-Rifo R, Toro-Ascuy D. New Challenges of HIV-1 Infection: How HIV-1 Attacks and Resides in the Central Nervous System. *Cells*. 2019;8:1245.
24. Christo PP, Greco DB, Aleixo AW, Livramento JA. HIV-1 RNA levels in cerebrospinal fluid and plasma and their correlation with opportunistic neurological diseases in a Brazilian AIDS reference hospital. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2005;63:907–13.
25. Heaton RK, Ellis RJ, Tang B, Marra CM, Rubin LH, Clifford DB, et al. Twelve-year neurocognitive decline in HIV is associated with comorbidities, not age: a CHARTER study. *Brain*. 2023;146:1121–31.
26. Sacktor N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol*. 2002;8 Suppl 2:115–21.
27. Laut K, Kirk O, Rockstroh J, Phillips A, Ledergerber B, Gatell J, et al. The EuroSIDA study: 25 years of scientific achievements. *HIV Med*. 2020;21:71–83.
28. Dore GJ, Correll PK, Li Y, Kaldor JM, Cooper DA, Brew BJ. Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 1999;13:1249–53.
29. Moore RD, Chaisson RE. Natural history of HIV infection in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS*. 1999;13:1933–42.
30. Childs EA, Lyles RH, Selnes OA, Chen B, Miller EN, Cohen BA, et al. Plasma viral load and CD4 lymphocytes predict HIV-associated dementia and sensory neuropathy. *Neurology*. 1999;52:607–13.
31. McArthur JC. HIV dementia: an evolving disease. *Journal of Neuroimmunology*. 2004;157:3–10.
32. Stern Y, McDermott MP, Albert S, Palumbo D, Selnes OA, McArthur J, et al. Factors associated with incident human immunodeficiency virus-dementia. *Arch Neurol*. 2001;58:473–9.
33. Sacktor NC, Bacellar H, Hoover DR, Nance-Sproson TE, Selnes OA, Miller EN, et al. Psychomotor slowing in HIV infection: a predictor of dementia, AIDS and death. *J Neurovirol*. 1996;2:404–10.

34. Gabbai AA, Castelo A, Oliveira ASB. HIV peripheral neuropathy. Em: Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2013 [citado 1º de novembro de 2023]. p. 515–29. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444529022000291>
35. Christo PP. Alterações cognitivas na infecção pelo HIV e Aids. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56:242–7.
36. Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology.* 2007;69:1789–99.
37. Nightingale S, Ances B, Cinque P, Dravid A, Dreyer AJ, Gisslén M, et al. Cognitive impairment in people living with HIV: consensus recommendations for a new approach. *Nat Rev Neurol.* 2023;19:424–33.
38. Harrison MJ, McArthur JC. *AIDS and neurology.* 1996.
39. Ndinda C, Uzodike UO, Chimbwete C, Pool R, Microbicide Development Programme. Gender relations in the context of HIV/AIDS in rural South Africa. *AIDS Care.* 2007;19:844–9.
40. Cañizares S, Cherner M, Ellis R. HIV and Aging: Effects on the Central Nervous System. *Semin Neurol.* 2014;34:027–34.
41. adult-and-adolescent-arv [Internet]. [citado 1º de novembro de 2023]. Disponível em: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv>
42. Spudich SS, Nilsson AC, Lollo ND, Liegler TJ, Petropoulos CJ, Deeks SG, et al. Cerebrospinal fluid HIV infection and pleocytosis: relation to systemic infection and antiretroviral treatment. *BMC Infect Dis.* 2005;5:98.
43. McLaurin KA, Booze RM, Mactutus CF. Diagnostic and prognostic biomarkers for HAND. *J Neurovirol.* 2019;25:686–701.
44. Shiramizu B, Gartner S, Williams A, Shikuma C, Ratto-Kim S, Watters M, et al. Circulating proviral HIV DNA and HIV-associated dementia: *AIDS.* 2005;19:45–52.
45. Münch J, Ständker L, Forssmann WG, Kirchhoff F. Discovery of modulators of HIV-1 infection from the human peptidome. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12:715–22.
46. Muqaku B, Oeckl P. Peptidomic Approaches and Observations in Neurodegenerative Diseases. *IJMS.* 2022;23:7332.
47. Peng J, Zhang H, Niu H, Wu R. Peptidomic analyses: The progress in enrichment and identification of endogenous peptides. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2020;125:115835.
48. Monteiro MA, Prates GS, De Lima Nascimento NA, Veiga APR, Magri MMC, Polis TJB, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Clinical Course Among Subjects HIV-1-Infected in Sao Paulo. *CHR.* 2022;20:457–62.
49. Melanson JE, Avery SL, Pinto DM. High-coverage quantitative proteomics using amine-specific isotopic labeling. *Proteomics.* 2006;6:4466–74.
50. Boersema PJ, Aye TT, Van Veen TAB, Heck AJR, Mohammed S. Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics.* 2008;8:4624–32.
51. Williams ME, Stein DJ, Joska JA, Naudé PJW. Cerebrospinal fluid immune markers and HIV-associated neurocognitive impairments: A systematic review. *Journal of Neuroimmunology.* 2021;358:577649.

52. Gelman JS, Sironi J, Castro LM, Ferro ES, Fricker LD. Peptidomic Analysis of Human Cell Lines. *J Proteome Res.* 2011;10:1583–92.
53. Berezniuk I, Sironi JJ, Wardman J, Pasek RC, Berbari NF, Yoder BK, et al. Quantitative Peptidomics of Purkinje Cell Degeneration Mice. Vaudry H, organizador. *PLoS ONE.* 2013;8:e60981.
54. Fricker LD. Analysis of mouse brain peptides using mass spectrometry-based peptidomics: implications for novel functions ranging from non-classical neuropeptides to microproteins. *Mol BioSyst.* 2010;6:1355.
55. Gascon MR, Lima M, Cheutchuk PM, Oliveira EA, Oliveira GS de, Gualqui CF, et al. High prevalence of HIV-associated neurocognitive disorders (HAND) in São Paulo City, Brazil [Internet]. 2021°-04–28° ed. Vol. 57, *Revista Brasileira de Neurologia.* 2021. Disponível em: <https://revistas.ufrj.br/index.php/rbn/article/view/43075>
56. for the CHARTER and HNRC Groups, Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, McCutchan JA, Letendre SL, et al. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol.* 2011;17:3–16.
57. Parada CA, Osbun J, Kaur S, Yakkoui Y, Shi M, Pan C, et al. Kinome and phosphoproteome of high-grade meningiomas reveal AKAP12 as a central regulator of aggressiveness and its possible role in progression. *Sci Rep.* 2018;8:2098.
58. Sakaya GR, Parada CA, Eichler RA, Yamaki VN, Navon A, Heimann AS, et al. Peptidomic profiling of cerebrospinal fluid from patients with intracranial saccular aneurysms. *Journal of Proteomics.* 2021;240:104188.
59. Bora A, Ubaida Mohien C, Chaerkady R, Chang L, Moxley R, Sacktor N, et al. Identification of putative biomarkers for HIV-associated neurocognitive impairment in the CSF of HIV-infected patients under cART therapy determined by mass spectrometry. *J Neurovirol.* 2014;20:457–65.

ANEXO A : COMPROVANTE ENVIO DO PROJETO**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Incidência, fatores de risco e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND).

Pesquisador: jorge simão do rosário casseb

Versão: 5

CAAE: 44791921.0.1001.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Informamos que o projeto Incidência, fatores de risco e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND), que tem como pesquisador responsável jorge simão do rosário casseb, foi recebido para análise ética no CEP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFM/USP em 31/05/2023 às 10:50.



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa:
 Incidência, fatores de risco e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND)

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF/Documento: 305.943.832-34	Nome: jorge simão do rosário casseb
Telefone: 1130617193	E-mail: jcasseb@usp.br

Instituição Proponente

CNPJ: 60.448.040/0001-22	Nome da Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
--------------------------	--

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda não é exclusiva de seu Centro Coordenador, então quando a emenda for aprovada, esta SERÁ replicada nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes.

É um estudo internacional? Não

Assistentes

CPF/Documento	Nome
032.644.098-44	Rosa Maria Nascimento Marcusso

Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
027.175.211-43	Luisa de Oliveira Pereira
025.565.071-01	LARISSA GABRIELLE LIMA DE ARAÚJO CURVAL
046.860.765-01	George Gonçalves de Souza
467.155.548-46	SANDY VIEIRA TEIXEIRA
132.988.868-58	WILSON DOMINGUES

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Incidência, fatores de risco e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND).

Contato Público

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
305.943.832-34	jorge simão do rosário casseb	1130617193	jasseb@usp.br

Contato Científico: jorge simão do rosário casseb

São Paulo, 10 de março de 2021.

Ao
Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade de São Paulo

O aluno de Mestrado George Gonçalves de Souza foi inserido como membro da equipe de pesquisa para realizar três objetivos do projeto (observados abaixo) e estará sob minha orientação. O referido projeto foi submetido e está sob apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, "intitulado *Incidência, fatores de risco, e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND)*.

Gostaria de enfatizar que não haverá modificação no TCLE, em nenhuma etapa do projeto e em nada com relação aos participantes do estudo.



Objetivos:

- (2A). Identificar biomarcadores no sangue para indivíduos com distúrbios neurológicos ou comprometimento cognitivo;
- (2B). Avaliar a ativação imune celular em indivíduos com e sem distúrbios neurológicos ou comprometimento cognitivo devido à HAND;
- (2C) Determinar marcadores virológicos que podem estar associados a distúrbios neurológicos ou comprometimento cognitivo.

Agradeço a atenção e me coloco a disposição para qualquer esclarecimento.

Atenciosamente

Prof. Dr. Jorge Casseb

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - "Incidência, fatores de risco, e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND)"

Pesquisador principal - Jorge Simão do Rosário Casseb

Departamento/Instituto – HCFMUSP- Dermatologia – ADEE 3002

Convidamos o (a) Senhor (a) para participar do projeto de pesquisa: "Incidência, fatores de risco, e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND)". Sua participação é muito importante para que possamos investigar se existem alterações de marcadores de danos ao Sistema Nervoso Central (SNC). Essas alterações podem te prejudicar nas atividades do dia-a-dia e também no uso correto dos medicamentos. Caso sejam identificadas alterações nesses exames laboratoriais, você terá acesso a todo o apoio necessário por parte da equipe multidisciplinar (médico, psicóloga, enfermeira e nutricionista), se assim o desejar. Sua participação é voluntária e você é livre para recusar caso não se sinta à vontade para participar. Caso você opte por participar dessa pesquisa, vamos coletar o material biológico (20 ml de sangue e uma entrevista breve para preenchimento de questionários. Vamos o sangue da veia periférica, e você poderá sentir uma leve picada na pele do braço.

Dentre os procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados: para os pacientes em que os testes realizados pelos psicólogos derem alterados, você será convidado a uma nova consulta e, se você concordar, uma coleta bastante cuidadosa na coluna (região lombar, e região da coluna vertebral), coleta de 10 ml de Líquido Cefalorraquidiano (LCR). Esse exame será coletado por neurologistas especializados nessa função. Você poderá também ser convidado para a realização de uma ressonância da cabeça para avaliar o volume total do cérebro. Esse exame leva em torno 1-2 horas e poderá ser usado contraste para uma visualização mais detalhada do cérebro. Todos esses exames ficarão à disposição do seu médico e de você.

A entrevista com questões sobre dados demográficos e clínicos como sexo, idade, orientação sexual, data do diagnóstico da infecção pelo HIV, mecanismo de transmissão da infecção, uso de álcool e outras substâncias psicoativas; uso atual e histórico de antirretrovirais; dados laboratoriais: contagem de linfócitos T CD4+ e quantificação da carga viral do HIV-1 serão coletados por entrevista direto ou telefone. Serão considerados os resultados laboratoriais mais próximos à avaliação clínica (até 3 meses antes). O dia e horário para a realização das atividades acima será combinado anteriormente com você. Se você quiser desistir da pesquisa a qualquer momento, você não será prejudicado nos atendimentos em qualquer serviço deste hospital. O seu nome será preservado em total sigilo.

Nome resumido do projeto: distúrbios neurocognitivos	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 23 de 04 de 2020	
Nome do pesquisador: Jorge Casseb Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	
	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal Rubrica do Investigador Responsável

A resolução 466/2012 recomenda explicitação da garantia de ressarcimento e como serão cobertas as despesas tidas pelos participantes da pesquisa e dela decorrentes;

O pesquisador somente utilizará os dados e material coletado para essa Pesquisa. As amostras serão armazenadas e permanecerão sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do Pesquisadores em fins comerciais. Caso haja necessidade de utilizar alguma amostra armazenada para novas pesquisas, essas serão utilizadas somente mediante autorização prévia pela Cappelq, e alguns casos pela CONEP.

Você receberá uma via desse termo de consentimento (TCLE). É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. caso HAJA despesa adicional, ela será coberta pelo orçamento da pesquisa

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb que pode ser encontrado no endereço Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 255 3º andar Telefone(s) : (11) 98338-4661 e/ou (11) 3061-7193 e-mail: jcasseb@usp.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo "Incidência, fatores de risco, e mecanismos patogênicos nos distúrbios neurocognitivos associados ao HIV-1 (HAND)".

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Data / /

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Nome resumido do projeto: distúrbios neurocognitivos	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 23 de 04 de 2020		
Nome do pesquisador: Jorge Casseb Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal	Rubrica do Investigador Responsável

25

Nome resumido do projeto: distúrbios neurocognitivos	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 23 de 04 de 2020	
Nome do pesquisador: Jorge Casseb Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	
	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal Rubrica do Investigador Responsável