

Marília Ladeira de Araújo

Associação entre senescência celular e comprimento dos telômeros em indivíduos infectados pelo HIV-1 com alterações neurocognitivas

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

**(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)**

São Paulo

2016

Marília Ladeira de Araújo

Associação entre senescência celular e comprimento dos telômeros em indivíduos infectados pelo HIV-1 com alterações neurocognitivas

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

**(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)**

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Araújo, Marília Ladeira de

Associação entre senescência celular e comprimento dos telômeros em indivíduos infectados pelo HIV-1 com alterações neurocognitivas / Marília Ladeira de Araújo. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb.

Descritores: 1.Telômero 2.Transtornos neurocognitivos 3.HIV-1
4.Envelhecimento celular 5.Complexo AIDS demência 6.Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Agradecimentos

À Deus, por estar em todos os momentos da minha vida.

À minha família, por todo apoio e compreensão, dedicação e amor!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Casseb, por quem tenho grande admiração e respeito, agradeço pela oportunidade, apoio, dedicação e orientação na realização deste trabalho.

À equipe de Neurociência do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, pela cuidadosa avaliação diagnóstica dos pacientes, em especial Dr. Augusto Penalva e equipe de neuropsicólogas.

Aos colaboradores, Dr. Rodrigo Calado, Dra. Bárbara Santana e Dra. Raquel Paiva do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto por toda colaboração na avaliação dos telômeros.

Aos amigos Wellington Duarte e Ana Carolina Soares pela constante perseverança e cuidados aplicados no recrutamento de todos os pacientes da pesquisa.

Aos participantes deste estudo, que doaram seus tempos e otimismo em nome da Ciência.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação.

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

Sumário

1.INTRODUÇÃO	21
2.REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 HIV no Sistema Nervoso Central e Manifestações Neurológicas.....	4
2.2 Classificação dos transtornos neurocognitivos	5
2.3 Prognósticos da HAND	8
2.3.1 Neuropsicológicos	8
2.3.2 Neuroimagem	9
2.3.3 Liquóricos	9
2.3.4 Carga viral	10
2.3.5 Envelhecimento Celular e HAND.....	11
3.OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4.CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
4.1 Local do Estudo	17
4.2 Período da coleta de dados	17
4.3 Recrutamento da casuística e tipo de estudo	17
4.4 Critérios de inclusão.....	19
4.5 Critérios de exclusão.....	20
4.6 Coleta e Processamento das amostras	20

4.7 Aspectos Éticos.....	22
4.8 Análise Estatística.....	22
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	38
8. ANEXOS	53
9. REFERÊNCIAS.....	40

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida

ANI: *Asymptomatic Neurocognitive Impairment*

ApoE4: Apolipoproteína E

ART: Terapia antirretroviral

AZT: Azidotimidina ou 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine ou zidovudina

BHE: Barreira hemato- encefálica

Cel: Célula

CPE: Efetividade de penetração dos antirretrovirais no sistema nervoso central

DNA : Ácido desoxirribonucleico

DST: Doença sexualmente transmissível

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FISH: Hibridação *in situ* fluorescente

FLOW: Citometria de fluxo

gp120: Glicoproteína 120

HAART:Terapia antirretroviral altamente ativa

HAD: *HIV associated dementia*

HAND: *HIV-associated neurocognitive disorders*

HIV-1: Vírus da imunodeficiência

IIER: Instituto de infectologia Emílio Ribas

IPAQ: *International physical activity questionnaire*

LCR; Líquido cefalorraquidiano

MET: *Metabolic equivalent*

MIN: Minuto

MND: *HIV-associated mild neurocognitive disorder*

mL: Mililitro

NFL: Neurofilamento

PCR: Reação em cadeia da polimerase

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: *Ribonucleic acid*

RNM: Ressonância nuclear magnética

SNC: Sistema nervoso central

TCD4+: Linfócitos T CD4+

TCD8+: Linfócitos T CD8+

T/S : Telômeros amplificados em relação ao gene de cópia única

μL: Microlitro

Lista de Gráficos

Figura 1. *Comparação do comprimento dos telômeros entre controle (HIV-) indivíduos HIV+ gênero.....28*

Figura 2a. *Comparação do comprimento dos telômeros dos grupos HIV+ e com alterações neurocognitivas..... 30*

Figura 3. *Comparação do comprimento dos telômeros entre os grupos HIV+ sem e com alteração neurocognitiva30*

Lista de Tabelas

Tabela 1. *Dados demográficos dos grupos portadores do vírus HIV.....25*

Tabela 2. *Dados clínicos dos grupos estudados.....27*

Resumo

Araújo ML. Associação entre senescência celular e comprimento dos telômeros em pacientes infectados pelo HIV-1 com alterações neurocognitivas. (Dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2016.

HIV associado a desordens neurocognitivas (HAND) continua a ser um grave problema atualmente devido à alta prevalência de suas formas mais brandas. Indivíduos HIV+ possuem o comprimento dos telômeros significativamente mais curtos nas células mononucleares do sangue periférico e células T CD8+, quando comparados aos indivíduos HIV negativos. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação do comprimento dos telômeros de leucócitos em indivíduos infectados pelo HIV com deficiências cognitivas, pois ainda é um assunto bastante controverso. **Métodos:** Um total de 73 pacientes infectados pelo HIV-1 de ambos os sexos, com idades entre 20 a 60 anos, participaram deste estudo. Entre 19 indivíduos HIV(+) sem comprometimento cognitivo e 54 indivíduos HIV(+) com distúrbios neurocognitivos: 29 alteração neurocognitiva assintomático (ANI), 15 comprometimento neurocognitivo leve a moderado (MND) e, 10 demência associada ao HIV (HAD); 118 indivíduos HIV negativos formaram o grupo controle. Todos os participantes foram submetidos a uma série de testes neuropsicológicos previamente validados. Determinou-se a carga viral de HIV-1 nas células do líquido cefalorraquidiano (LCR) e em PBMC. Utilizou-se DNA a partir de leucócitos periféricos para calcular o comprimento de telômeros por PCR em tempo real. **Resultados:** O comprimento dos telômeros não foi associado com gêneros e diminuiu com a idade, independentemente do status de HIV. Indivíduos infectados pelo HIV-1 com formas mais leves de deficiência neurocognitiva apresentaram um comprimento dos telômeros reduzida em comparação com pacientes HIV+ sem comprometimento neurocognitivo. Não houve correlação entre a carga viral plasmática e o tamanho dos telômeros. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que o comprimento dos telômeros pode ser considerado um marcador de senescência celular em indivíduos com alterações neurocognitivas.

Descritores: Envelhecimento celular, Transtornos neurocognitivos, reação em cadeia da polimerase em tempo real, complexo de demência da Aids.

Abstract

Araújo ML. Association between cellular senescence and telomere length in patients infected with HIV-1 neurocognitive changes. (Dissertation). Sao Paulo: School of Medicine. University of Sao Paulo; 2016.

HIV associated neurocognitive disorders (HAND) remains a serious problem today because of the high prevalence of its milder forms. HIV + individuals have the length substantially shorter telomeres in peripheral blood mononuclear cells and CD8 + T cells compared to HIV negative individuals. Given the above, the objective of this study was to evaluate the association of telomere length of leukocyte (LTL) in HIV-infected individuals with cognitive disabilities because it is still a very controversial subject. **Methods:** A total of 73 patients infected with HIV-1 of both sexes, aged 20 to 60 years participated in this study. Among 19 HIV patients (+) without cognitive impairment and 54 HIV patients (+) with neurocognitive disorders: 29 asymptomatic neurocognitive disorder (ANI), 15 mild neurocognitive disorder to moderate (MND) and 10 HIV-associated dementia (HAD); 118 HIV-negative individuals formed the control group. All participants underwent a series of previously validated neuropsychological tests. Determined if the viral load of HIV-1 in cerebrospinal fluid cells (CSF) and in PBMC. We used DNA from peripheral leukocytes to calculate the length of telomeres by real time PCR. **Results:** The telomere length was not associated with genres and decreased with age, irrespective of HIV status. HIV-1-infected individuals with milder forms of neurocognitive impairment had a significantly length of telomeres reduced compared to HIV + patients without neurocognitive impairment. There was no correlation between plasma viral load and the size of telomeres. **Conclusions:** Our results suggest that telomere length can be considered a marker of cellular senescence in individuals with neurocognitive abnormalities.

Key words: Cell aging, Neurocognitive Disorders. Real-time polymerase chain reaction, AIDS dementia complex.

1. Introdução

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) continua a ser um importante problema de saúde pública **(1)**. De acordo com dados da Organização Mundial de saúde, havia aproximadamente 36,7 milhões de pessoas vivendo com o HIV no final de 2015 no mundo, as quais ainda apresentam alta prevalência de comprometimento cognitivo, mesmo em indivíduos que estão fazendo uso da terapia antirretroviral combinada altamente ativa (HAART) **(2,3)**.

De acordo com dados do Unids Brasil, foi registrado um patamar anual de 610 mil a um milhão de indivíduos infectados no Brasil, sendo que novas infecções por HIV estão atingindo de 31 mil a 57 mil indivíduos, chegando a 9.9mil - 23 mil mortes relacionadas à Aids **(4)**. Dessa forma, ficou evidente o comprometimento imunológico progressivo em pacientes infectados pelo HIV. Esta condição acabava tornando-os susceptíveis a neoplasias e infecções, as quais sempre trouxeram elevada morbimortalidade para os indivíduos infectados pelo HIV-1**(5)**.

O mecanismo da neuropatogênese se dá pela entrada viral no sistema nervoso central (SNC) cedo durante o curso da infecção por rompimento da barreira hematoencefálica (BHE), seguido por uma série de eventos que giram em torno da atividade neurotóxica de proteínas HIV-1 como gp120, Tat e Vpr, e provavelmente outras, juntamente com alterações na homeostase do SNC que envolvem a integridade metabólica da BHE e no metabolismo dos astrócitos, macrófagos perivascularres e células microgliais residente **(6,7)**. Este cenário pode dar origem às alterações de ordem cognitiva.

O termo *HIV-associated neurocognitive disorders* (HAND) é uma denominação genérica que engloba as três categorias de comprometimento cognitivo: assintomático

(ANI- *Asymptomatic Neurocognitive Impairment*) e alteração cognitiva leve/moderada (MND- *HIV-associated mild neurocognitive disorder*) que correspondem às formas leves e intermediárias; e, por fim, demência associada ao HIV (HAD- *HIV associated dementia*), sendo classificada como a forma mais grave. Um aumento expressivo da incidência de alterações cognitivas em pacientes com AIDS/HIV vem ocorrendo **(8)**.

Muitos pesquisadores continuam a explorar os diversos fatores de risco existentes que possam acelerar o declínio cognitivo relacionado com a idade em pessoas vivendo com HIV. O envelhecimento celular é marcado pelo encurtamento do comprimento dos telômeros, e tem sido utilizado como um biomarcador de envelhecimento, podendo refletir a variação individual em pessoas com HIV **(9)**.

Estudos apontam um menor comprimento dos telômeros em leucócitos em indivíduos com sorologia positiva para HIV-1, o que sugere um envelhecimento biológico acelerado em indivíduos infectados pelo HIV-1 **(10,11)**. Alguns pesquisadores apontam estudos nos quais o telômero encurtado aumenta a deficiência cognitiva e risco de demência em populações com sorologia negativa para HIV-1 **(12,13)**. De acordo com estudo prévio, **(14)** existe uma associação de telômero encurtado em leucócitos, tais como a doença de Alzheimer, ou seja, telômero encurtado é considerado um provável marcador para prever o risco de doenças relacionadas com a idade, como a doença de Alzheimer, e mortalidade. Com isso, nosso estudo busca encontrar uma possível associação entre o comprimento telomérico em indivíduos HIV+ com diversos graus de comprometimentos neurocognitivos, a fim de aferir se o telômero pode atuar como um eficiente marcador de envelhecimento celular nesta população.

2. Revisão da Literatura

2.1 HIV no Sistema Nervoso Central e Manifestações Neurológicas

A infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) no sistema nervoso central (SNC) ocorre através da migração das células mielóides e linfóides e estabelece infecção de macrófagos perivascularres e micróglia **(15)**, que atravessam a BHE, resultando na liberação de citocinas e produtos virais, afetando vias neuronais. Independente da supressão da viremia no sangue periférico, a replicação do vírus pode persistir e compartimentar em diversas áreas do SNC, ocasionando uma desestabilização das vias neuronais **(16,17,18,19)**.

Os efeitos imunológicos e a possibilidade de desenvolvimento das alterações neurocognitivas devido à infecção pelo HIV não estão descartadas, apesar da supressão de HIV-RNA no sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) **(20)**. Em alguns pacientes, o HIV-1 pode ser encontrado em concentrações mais elevadas no LCR do que no sangue, o que potencialmente resulta da má distribuição de drogas antirretrovirais para o SNC. A distribuição dos medicamentos antirretrovirais e a toxicidade no SNC podem afetar a tomada de decisão clínica, apesar de este tópico ser ainda bastante debatido **(21)**.

De acordo com Letendre et al., 2008, a efetividade combinada dos antirretrovirais se dá através do escore da efetividade de penetração dos antirretrovirais no SNC (CPE, *CNS Penetration Effectiveness*), esse mecanismo se baseia nas propriedades químicas dos medicamentos que influenciam sua penetração pela BHE (por exemplo, baixa ligação protéica, baixo peso molecular, proteína de ligação, maior solubilidade lipídica) **(22)** nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, quando disponíveis. Dessa forma, propõe-se

estruturar esquemas com CPE \geq 8. Adicionalmente, a composição do esquema deveria contemplar pelo menos dois medicamentos com elevada penetração no SNC (escore três ou quatro), sendo válidas tanto para pacientes sob tratamento, quanto para os que não estão **(23)**.

Segundo estudo de Cysique LA *et al.*, 2011, as drogas antirretrovirais, com alto nível de penetração no SNC poderão melhorar a função cognitiva e a diminuição das concentrações de RNA do HIV no LCR, porém, ainda se faz necessário uma maior investigação nesse assunto **(24)**.

2.2 Classificações dos transtornos neurocognitivos

Os danos do HIV no SNC poderão desencadear distúrbios neurocognitivos, afetando dessa forma habilidades como atenção, memória, função executiva, linguagem e habilidades de percepção. Os distúrbios neurocognitivos foram classificados de acordo com os critérios da Academia Americana de Neurologia, conhecido também como critérios de Frascati, 2007. Os indivíduos são classificados de acordo com o aumento da severidade das alterações cognitivas: Alteração neurocognitiva assintomática (ANI, *asymptomatic neurocognitive impairment*): há alterações de \geq dois domínios cognitivos, em pelo menos um desvio padrão abaixo da média na avaliação neuropsicológica com testes padronizados e pontuações apropriadas para idade e escolaridade. A avaliação deve incluir as funções: visual, linguagem, atenção, memória, abstração, função executiva, velocidade de processamento das informações, habilidades motoras. Não pode haver comprometimento funcional nas atividades de vida diária e critérios para delírio e demência, bem como, evidências de outras causas pré-existentes para o déficit.

Comprometimento neurocognitivo leve/moderado (MND, mild neurocognitive disorder): há alterações de ≥ 2 domínios cognitivos em pelo menos um desvio padrão abaixo da média na avaliação neuropsicológica com testes padronizados e pontuações apropriadas para idade e escolaridade. A avaliação deve incluir as funções: visual, linguagem, atenção, memória, abstração, função executiva, velocidade de processamento das informações, habilidades motoras. A diferença desta classificação para a anterior a presença do comprometimento funcional leve a moderado nas atividades da vida diária. Também, não podem existir critérios para delírio e demência, bem como, evidências de outras causas pré-existentes para o déficit.

Demência associada ao HIV (HAD, HIV-associated dementia): há alterações graves de ≥ 2 domínios cognitivos, geralmente o distúrbio é encontrado em múltiplos domínios, especialmente no aprendizado de novas informações, vagaroso no processamento de novas informações e déficit em atenção e concentração. O déficit cognitivo ocasiona comprometimento grave nas atividades da vida diária (trabalho, atividades em casa e atividades sociais). Também, não podem existir critérios para delírio ou evidência de outras causas pré-existentes para o déficit como: infecções no SNC, acidente vascular cerebral, doenças neurológicas pré-existentes, uso de drogas ilícita **(25)**.

Devido à introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), muitos indivíduos infectados pelo HIV podem ter uma sobrevida maior. Embora ocorra em muitos casos a supressão viral plasmática, as taxas de declínio neurocognitivo estão aumentando, principalmente quanto às formas mais leves de neurocognição.

Detecção de *declínio* na função cognitiva pode ser particularmente importante clinicamente, uma vez que sugere um processo ativo, potencialmente reversível que requer uma investigação mais aprofundada e talvez mudanças na gestão **(26)**.

O perfil das manifestações neurocognitivas mudou drasticamente, caracterizando-se por uma incidência reduzida de HAD e aumento de MND e ANI **(27,28)**. Atualmente, estimam-se prevalências de 15-30% para ANI, 20-50% para MND e 2-8% para HAD **(27,28,29,30)**. O cenário imunológico também se tornou mais complexo, pois todas as categorias da HAND podem ser observadas com níveis moderados ou inclusive muito discretos de imunodepressão **(31)**.

Existem muitos fatores que podem contribuir para um prognóstico de prejuízos neurocognitivos em pacientes infectados pelo HIV. Comorbidades, como por exemplo, a infecção pela hepatite C está amplamente associada com disfunção cognitiva **(32)**, uso de drogas psicoativas **(33)**, tendo efeitos deletérios sobre a cognição, fatores de risco cardiovascular, além disso, alguns fatores genéticos estão associados com a demência, por exemplo, o APOE4 (Apolipoproteína E), caracterizada como uma proteína envolvida na doença de Alzheimer) **(34,35)**, transtorno de humor podendo mascarar o comprometimento cognitivo **(36)** e depressão. Segundo Nightingale *et al* 2014, várias condições devem ser considerados na avaliação de pacientes com infecção pelo HIV e comprometimento cognitivo, e uma avaliação clínica cuidadosa é essencial **(37)**.

Os fatores genéticos que estão associados com a demência, por exemplo, o APOE4 ainda possui uma associação inconsistente com comprometimento leve **(38, 39)**. Alterações cognitivas relacionadas ao envelhecimento **(40)** podem ser agravadas

pela infecção pelo HIV, além do baixo nível de escolaridade, o que pode contribuir para uma deficiente função cognitiva (41,42). Os transtornos de humor (43) podem ser mascarados, ou ser causado por comprometimento cognitivo (44). À medida que cada fator contribui para a prevalência de déficits cognitivos em várias populações não está claramente descrita.

2.3 Prognósticos da HAND

2.3.1 Neuropsicológicos

A partir da identificação de indícios da presença do complexo cognitivo associado ao HIV-1, os testes de avaliação neuropsicológica, podem prestar uma contribuição estratégica à detecção precoce de lesões causadas no SNC. Os resultados destas avaliações neuropsicológicas poderão estar associados a estudos de imagens, valores bioquímicos do LCR, procedimentos neuroinvasivos e a outros métodos de neuroinvestigação, o que garante maior precisão prognóstica e estabelecimento da conduta terapêutica mais adequada (45).

A avaliação neuropsicológica tem um papel fundamental na identificação e diagnóstico de transtornos neurocognitivos associados ao HIV, sendo utilizados para quantificar alterações em processos cognitivos associados ao tratamento. Estes testes são sensíveis para detectar transtornos cognitivos na infecção pelo HIV-1 e devem incluir os seguintes domínios: atenção/concentração; rapidez do processamento da informação; função executiva; raciocínio; abstração; memória/aprendizado; habilidade visuoespacial; e funcionamento motor. Deverão ser considerados como fatores de confusão como, por exemplo, o uso de álcool, drogas ilícitas e determinadas drogas

terapêuticas, antecedentes de doenças neurológicas ou psiquiátricas (**Anexo um**) **(46)**.

2.3.2 Neuroimagem

Diversos estudos envolvendo técnicas de imagens têm sugerido importantes correlações entre os testes neuropsicológicos, validando clinicamente as alterações encontradas. Investigações com métodos de imagens já foram conduzidas em algumas amostras de pacientes com HIV/Aids. Estas técnicas buscam encontrar alterações morfológicas ou funcionais em pacientes que apresentam ressonância nuclear magnética (RNM) convencional sem alterações significativas. O uso da RNM auxilia na investigação do declínio neurológico promovendo tratamento adequado **(47,48)**. O HIV também tem efeitos diretos e indiretos sobre a estrutura e função do cérebro, apesar de encontrarmos anomalias de neuroimagem mais significativas nos casos de infecção oportunista do cérebro. Existem dados de que pessoas com HIV mostram redução da substância cinzenta e desgaste cortical **(49, 50, 51, 52)**. Devido à utilização de métodos de neuroimagem, tem-se observado muitos avanços na compreensão das alterações neurológicas em pacientes com HIV-1. Dessa forma, existe a necessidade de um diagnóstico mais preciso e características específicas de neuroimagem podem, no futuro, serem incorporadas na classificação da HAND **(53)**.

2.3.3 Liquóricos

A presença de neurofilamento (NFL) no LCR é considerada um marcador de lesão axonal no SNC no curso da infecção por HIV. Os NFLs correspondem os

principais constituintes do citoesqueleto das células neuronais, importantes para a manutenção da integridade estrutural e calibre dos axônios e dendritos e estão envolvidos na influência da velocidade na condução dos impulsos de correntes nervosas. De acordo com a literatura, doenças neurodegenerativas relacionadas à desmielinização e/ ou degeneração axonal, tais como a HAD, apresentam elevados índices de NFL no LCR (54).

2.3.4 Carga viral

Durante a constante ativação do sistema imunológico, diversos estudos sugerem que os níveis de citocinas inflamatórias se correlacionam com a progressão da infecção pelo HIV (55, 56, 57). As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que influenciam na neuropatogênese do HIV, sendo multifuncionais e imunomoduladoras. De acordo com estudos, as quimiocinas podem modificar a replicação do HIV e a progressão da doença, pois o HIV utiliza os seus receptores para entrar nas células, podendo afetar a ativação de macrófagos (58, 59). As quimiocinas podem afetar a sinalização neuronal e reparação no cérebro, levando a aberrações nas células da glia e funções neuronais.

O HIV migra para o cérebro logo após a infecção, e continua a ser um reservatório para o HIV, mesmo entre pacientes que recebem ART (terapia antirretroviral) (60). Alguns aspectos virológicos podem estar implicados na patogênese da HAND, onde se destaca a carga viral. Os indivíduos que interrompem a ART caracterizam-se por terem uma melhor evidência clínica para a existência de um reservatório para o HIV. Em geral, indivíduos que apresentam alterações neurocognitivas possuem níveis elevados de HIV-1 no LCR. A persistência do HIV

durante a ART é a razão pela qual as terapias atuais não são curativas e tem sido objeto de intensa pesquisa durante os últimos 15 anos desde que foi implementada a ART (61).

A supressão contínua do vírus HIV-1 para atingir níveis indetectáveis no plasma e, retardar a progressão da doença e prolongar a sobrevida é o principal objetivo da ART (62, 63), fazendo com que possa suprimir os níveis virais no plasma e LCR além de melhorar os resultados neurológicos em pacientes com HIV (64). Com a monitorização da carga viral (a cada 3-6 meses), consegue-se detectar possíveis falhas do tratamento precoce (65). Como resultado, a incidência de HAD diminuiu substancialmente ao longo das últimas duas décadas (66).

Uma pesquisa realizada por Canestri *et al.*, 2010, aponta um grupo de indivíduos com sintomas neurológicos atribuídos a infecção pelo HIV-1 com carga viral detectável no LCR, apesar da supressão da viremia no plasma. Dessa forma, acredita-se que existe uma necessidade específica de uma melhor compreensão da dinâmica de replicação viral no compartimento do SNC e seus efeitos sobre os potenciais de disfunções neurológicas (67).

2.3.5 Envelhecimento Celular e HAND

O telômero ou porção final do cromossomo é um complexo nucleoprotéico composto de DNA, de fita simples e duplas, permeados por proteínas (68, 69) que se interagem mantendo a estrutura estável (70) cuja principal função é proteger o material genético de possíveis degradações, garantindo a manutenção e integridade do genoma (71).

O DNA telomérico da maioria dos eucariontes consiste de repetições curtas ricas em guanina (G) na fita que contém o final 3', referida como fita G. A fita complementar, contendo o final 5' é rica em citosina (C) denominada de fita (C). A fita G ocorre na direção 5'-3' do cromossomo e é mais longa do que a sua fita complementar C, devido à saliência no final 3' da fita simples. Durante a replicação do DNA, as fitas antiparalelas não são replicadas de forma homogênea. Isto ocorre devido alteração na replicação da fita descontínua do DNA, após ação da DNA ligase unindo os Fragmentos de Okasaky, restando o fragmento do telômero para ser reconhecido pela DNA polimerase, a qual não consegue finalizar sua extensão na região telomérica (72).

Os telômeros encurtam-se por aproximadamente 20-200 pares de bases em cada divisão celular mitótica, enquanto que a enzima telomerase adiciona o DNA telomérico para os cromossomos, impedindo dessa forma o encurtamento excessivo dos telômeros (73, 74). A atividade da telomerase está presente nas células-tronco, tecidos embrionários e placenta, mas está ausente na maioria das células somáticas humanas, ou seja, em quaisquer células responsáveis pela formação de tecidos e órgãos em organismos multicelulares (75).

Estudos sugerem que indivíduos infectados pelo HIV-1 possuem o comprimento dos telômeros significativamente mais curtos em células TCD8+ em relação aos indivíduos com sorologia negativa para HIV-1. Dessa forma, tem-se a hipótese de que a infecção pelo HIV-1 resulta em esgotamento do sistema imunológico favorecendo ao encurtamento dos telômeros (76, 77). Além disso, estudos apontam que telômeros encurtados aumentam a deficiência cognitiva e o risco de demência em populações

com sorologia negativa para HIV-1, podendo representar um marcador para o declínio cognitivo estando relacionado com a idade atípica **(78, 79, 80, 81)**.

Algumas evidências relatam que a diminuição da atividade da telomerase está associada com estresse fisiológico e psicológico, resultando em telômeros mais curtos **(82)**. Diversos fatores podem afetar no comprimento dos telômeros, tais como medicamentos antiinflamatórios **(83)**, obesidade **(84)**, exercícios físicos **(85)**, tabagismo **(86)**, idade do pai no momento do nascimento do filho **(87)**, gêneros (masculino/feminino) **(88)** e raça **(89)**. Dessa forma, tendo em vista o envelhecimento populacional em indivíduos com sorologia positiva para HIV-1 acredita-se ser de grande importância clínica a avaliação do comprimento dos telômeros em leucócitos nesses indivíduos e, verificar a possibilidade de ser caracterizado como um marcador de envelhecimento celular eficiente em indivíduos com HIV-1 com alterações neurocognitivas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar associação entre neurocognição e comprimento dos telômeros em leucócitos totais nos indivíduos infectados pelo HIV-1.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar e comparar o comprimento dos telômeros entre indivíduos portadores do vírus HIV e com alterações neurocognitivas.
- Analisar o comprimento dos telômeros entre homens e mulheres com e sem HIV+.
- Associar o comprimento dos telômeros com outras variáveis

4. Casuística e Métodos

4.1 Local do Estudo

Pacientes provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), sendo executadas parte das análises no Instituto de Medicina Tropical (IMT II) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e outra parte no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.2 Período da coleta de dados

A coleta de amostras e de dados deste estudo foi realizada entre março de 2015 a março de 2016.

4.3 Recrutamento da casuística e tipo de estudo

Este foi um estudo transversal, onde a coorte deste projeto de pesquisa faz parte de um grande projeto desenvolvido no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER)- Projeto n° 09/13, onde 575 voluntários se submeteram a avaliação neuropsicológica com uma equipe de neuropsicólogas no IIER no período de 05/2013 até 03/2015, sob a coordenação do Prof. Dr. Augusto César Penalva de Oliveira. A coleta de dados dos pacientes incluídos neste estudo compreendeu cinco seções: 1) inquérito sociodemográfico; 2) histórico médico e levantamento do estado funcional; 3) questionário de sintomas neurológicos subjetivos; 4) avaliação neurológica completa; 5) teste de rastreio neuropsicológico (International HIV Dementia Scale) seguido por bateria de testes neuropsicológicos.

Para avaliação do uso de substâncias psicoativas foi utilizado o ASSIST (Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test) (90, 91) para

avaliação das atividades de vida diária foi utilizada a Escala de Lawton **(92)**. A presença de depressão foi avaliada pelo Inventário Beck de Depressão **(93)**. O perfil neuropsicológico dos pacientes foi determinado através de avaliação neuropsicológica ampla **(94, 95, 96, 97, 98, 99)**. Além de estabelecer o perfil neuropsicológico dos pacientes, avaliou-se o nível de atividade física com o auxílio do Questionário Internacional de Atividade Física (*International Physical Activity Questionnaire* -IPAC), versão abreviada, desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde **(OMS, 1998)**.

Classificação das desordens neurocognitivas foi utilizado os critérios da Academia Americana de Neurologia de 2007: alteração neurocognitiva assintomática (asymptomatic neurocognitive impairment (ANI), comprometimento neurocognitivo leve/moderado (mild neurocognitive disorder (MND) e Demência associada ao HIV (HIV-associated dementia (HAD) **(25)**. A bateria de testes neuropsicológicos avaliou os seguintes domínios: atenção/concentração; rapidez do processamento da informação; função executiva; raciocínio; abstração; memória/aprendizado; habilidade visuo-espacial; e funcionamento motor.

A triagem dos grupos controle (HIV-) e do grupo HIV+ com e sem alteração neurocognitiva foi realizada da seguinte forma: os pacientes que apresentaram resultado negativo para investigação de *Treponema pallidum*, HIV, toxoplasmose, Hepatite B e C foram convidados a participar da pesquisa e pertenceram ao grupo controle, e aqueles que apresentaram resultado positivo para HIV pertenceram os mesmos resultados do grupo controle, com exceção do teste com sorologia positiva

para HIV, classificaram-se como os demais grupos. Em seguida, os grupos foram submetidos aos testes neuropsicológicos.

Uma detalhada investigação das condições de co-morbidade foram consideradas, inclusive as 1. "condições secundárias": aquelas que provavelmente tiveram pouco ou nenhum impacto sobre o desempenho neurocognitivo e/ou limitações funcionais; 2. "condições contributing (contribuintes)": condições que provavelmente tiveram alguma contribuição significativa ao desempenho cognitivo observado e/ou limitações funcionais e 3. "condições de confusão": que são consideradas tão importantes que se opõem a qualquer atribuição confiante no desempenho neurocognitivo observado e/ou limitações funcionais. As avaliações neurológicas dos pacientes incluídos neste estudo foram conduzidas por um neuropsicólogo responsável pelo acompanhamento clínico no IIER.

A partir de estudo prévio que contou com 575 indivíduos infectados pelo HIV, 191 voluntários de ambos os sexos foram convidados a participar dessa pesquisa. Foram divididos entre os seguintes grupos: 118 indivíduos com sorologia negativa para HIV-1 (controle), 19 indivíduos infectados pelo HIV-1 sem Alteração neurocognitiva, 29 indivíduos ANI (*Asymptomatic Neurocognitive Impairment*), 15 Indivíduos MND (*HIV-associated mild neurocognitive disorder*), e por fim 10 indivíduos HAD (*HIV associated dementia*), estando todos em acompanhamento clínico no IIER.

4.4 Critérios de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão, indivíduos correspondentes a faixa etária 20 a 60 anos de ambos os gêneros, com sorologia negativa para HIV

(correspondentes ao grupo controle) e indivíduos HIV+ sob terapia anti-retroviral e que preencheram os critérios de comprometimento neurocognitivo de acordo com a bateria de testes neurológicos.

4.5 Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão indivíduos que fazem uso de drogas abusivas e psicotrópicas, pacientes com dados clínicos e laboratoriais incompletos, gestantes e indivíduos que apresentam co-morbidades tais como toxoplasmose, sífilis, hepatite B e C e outras patologias que possam ter como consequência algum tipo de alteração neurológica.

4.6 Coleta e Processamento das amostras

Foram coletados cerca de 20 mL de sangue periférico de cada indivíduo participante do estudo, em tubo estéril contendo EDTA como anticoagulante. Parte deste material foi utilizado para a quantificação da carga viral plasmática e, o restante foi utilizado para análise do comprimento dos telômeros. Para análise da carga viral líquórica, foram coletados cerca de três ml de LCR em tubo de 1.5ml e posteriormente armazenados em freezer -80°C. A execução da análise da carga viral foi realizada no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM56), seguindo o protocolo da *Abbott Real Time (Des Plaines, IL 60018, EUA)*.

Para efetuar a medição do comprimento do telômero, o DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos totais, utilizando o kit *illustragenomic Prep Mini Kit (GE*

também foi utilizado para a curva padrão, tanto como uma referência e amostra como uma amostra de validação. Em cada corrida, duas amostras de referência foram incluídas para validar cada reação. O experimento foi considerado aceitável se razão da amostra de controle T / S variou dentro do intervalo de variação de 95% (0,95-1.05).

4.7 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela *Comissão Científica, Comitê de Ética em pesquisa e Diretoria Técnica do Instituto nº 034/11*, parecer C.C 130/11. Foram obtidos os consentimentos informados de todos os participantes do estudo.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram tratados por meio de estatística descritiva, com cálculos de percentuais, frequências. Testes paramétricos (teste T) foram utilizados quando a distribuição das variáveis foi considerada segundo os parâmetros estatísticos normais. No caso de não distribuição normal foram utilizados testes não paramétricos (prova U de Man-Whitney para a comparação e o p de Spearman com o propósito de descobrir se há relacionamento entre as variáveis). Para confecção de gráficos, o software GraphPad Software 5.0 (La Jolla, CA), utilizando o teste *Anova* para comparar os grupos. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p \leq 0.05$. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado na comparação do comprimento dos telômeros entre os grupos controle (HIV-) e indivíduos HIV+ e gêneros. Para a análise da comparação dos grupos HIV+ com e sem alterações neurocognitivas também foi

adotado este teste. E, por fim, na verificação das variáveis dos grupos de estudo, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis. Para correlação do comprimento dos telômeros com outras variáveis utilizou-se Pearson r test.

5. Resultados

Conforme descrito no item 4.1, realizamos o recrutamento da casuística e separamos os indivíduos de acordo com grau de alteração neurocognitiva, sendo eles classificados em HIV+ sem alteração, ANI, MND e HAD. Os dados das características gerais dos grupos dos pacientes estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Os controles foram pareados segundo gênero e idade. A média de idade dos indivíduos do sexo feminino foi 39.51 ± 9.747 e a média de idade do sexo masculino foi de 41.10 ± 9.234 .

Tabela 1- Dados demográficos dos grupos portadores do vírus HIV

Variáveis	Total	Sem alteração neurocognitiva	ANI	MND	HAD
<i>Idade (anos)</i>	43.32 (9.705)	42.11 (11.11)	47.17 (8.636)	50.80 (9.829)	52.40 (4.274)
<i>Gêneros</i>					
<i>Masculino</i>	72.60%	84.21%	72.41%	73.33%	50%
<i>Feminino</i>	27.40%	15.79%	27.59%	26.67%	50%
<i>Escolaridade(anos)</i>	12.27 (3.994)	15.26 (4.817)	11.79 (2.944)	11.47 (2.722)	9.200 (3.393)
<i>Tempo de infecção (anos)</i>	11.21 (5.740)	11.0 (7.379)	10.59 (6.327)	9.933 (4.301)	14.80 (3.084)

Nota: Grupos classificados como: HIV + sem alteração neurocognitiva, ANI: alteração neurocognitiva assintomática, MND: Comprometimento neurocognitivo leve a moderado, HAD: demência associada HIV. Dados representados em média e desvio padrão.

As amostras dos participantes e os demais dados desta pesquisa foram coletadas em até um ano após efetuada a avaliação neuropsicológica, garantindo dessa forma o resultado da bateria neurológica. O histórico de cada indivíduo foi minuciosamente coletado, como por exemplo, a presença ou ausência da prática de atividade física, tempo de infecção, tabagistas, contagem linfócitos T CD4+ e nadir de linfócitos T CD4+. Os dados demográficos estão descritos na tabela 1.

Na tabela 1 pode-se observar que quanto maior o tempo de infecção e maior a idade média referente a cada grupo estudado, maior o grau de comprometimento neurocognitivo. Em relação ao tempo de escolaridade é inversamente proporcional aos graus de neurocognição.

Em nosso estudo, a contagem de células T CD4+ foi realizada após coleta da amostra, caracterizando como valores atuais do participante no estudo em questão. No contexto da adesão a hábitos nocivos para a saúde, como por exemplo, o tabaco, este poderá influenciar o processo de senescência celular, levando a uma diminuição precoce da região telomérica. Em nosso estudo, realizamos o levantamento dos indivíduos com tais características, entretanto, não foi um fator de impacto relevante quando correlacionado com o comprimento dos telômeros ($p=0.93$).

Tabela 2- Dados clínicos dos grupos estudados

Variáveis	Sem alteração neurocognitiva	ANI	MND	HAD	p-Valor
Fumantes	25%	4.54%	16.66%	0	.30
Atividade Física	2073 (2157)	2556 (3261)	2292 (2436)	1656 (1496)	.46
CPE Rank	5200 (3.256)	6.857 (2.699)	5300 (1947)	7000 (1265)	.19
Carga viral plasma	23.08%	17.65%	0	16.67%	.43
Carga viral LCR	10%	0	10%	16.67%	.37
TCD4+ atual	698 (264.1)	628.1 (320.3)	819.8 (375.5)	512.6 (179.2)	.17
Nadir TCD4+	350.7 (175.0)	337.9 (215.0)	388.4 (155.5)	338.0 (241.7)	.88
Comprimento Telômero (T/S)	0.59 (0.21)	0.47 (0.16)	0.47 (0.21)	0.51 (0.12)	.13

Nota: Grupos classificados como: HIV + sem alteração neurocognitiva, ANI: alteração neurocognitiva assintomática, MND: Comprometimento neurocognitivo leve a moderados, HAD: demência associada HIV. Dados representados em média e desvio padrão. Escore de atividade física foi classificada de acordo com os seguintes critérios: inativo: 0 a 500 MET-min/semana; moderadamente ativo: 600 MET de 2999 MET-min/semana; Ativo: pelo menos 3000 MET-min/ semana. Classificação CPE: pontuação eficácia dos medicamentos antirretrovirais penetração no sistema nervoso central.

Outras variáveis, tais como carga viral plasmática não evidenciou associação no comprimento do telômero ($p=0.66$). Não foi realizada análise estatística da carga viral líquórica entre os grupos HIV+, sendo representada apenas por três indivíduos com carga viral positiva no LCR. Tempo de infecção e contagem de linfócitos TCD4+

também não foram fatores relevantes de impacto no comprimento telomérico ($p= 0.9$, $p=0.85$).

A infecção pelo HIV causa fenômenos inflamatórios que levam a diversos distúrbios, bem como a ativação imunitária crônica e a proliferação de algumas células do sangue, reduzindo ainda mais o comprimento do telômero, potencializando a imunossenescência (100, 101). Com o intuito de verificarmos os efeitos da infecção pelo HIV-1 sobre a imunossenescência, foi comparado o comprimento dos telômeros entre os gêneros (controle) e entre os grupos controle e HIV+ (independente do grau de alteração neurocognitiva (Figura 1). Alguns autores atribuem o fato de o comprimento do telômero dos leucócitos serem maiores em mulheres do que nos homens se dê pela ação do estrogênio, estando presente na transcriptase reversa da telomerase. Este hormônio pode estimular a enzima telomerase a adicionar repetições teloméricas nas extremidades do cromossomo (102, 103, 104).

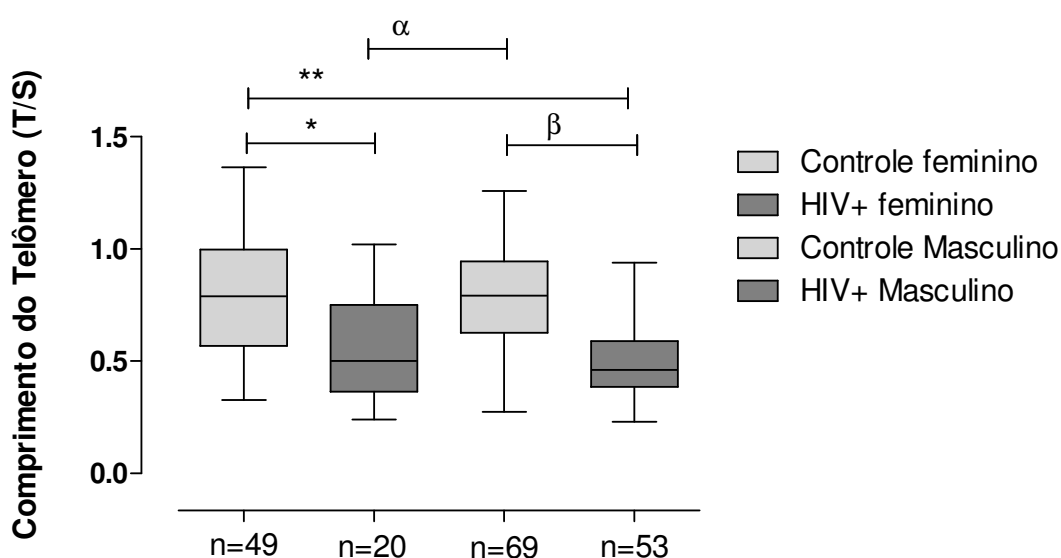


Figura 1. Comparação do comprimento dos telômeros entre controle (HIV-) e indivíduos HIV+ e gênero. * $p=0.0010$, ** $p<0.0001$, α $p=0.0007$ e β $p<0.0001$.

O comprimento do telômero e a sua razão de encurtamento variam entre os cromossomos, tecidos, indivíduos e principalmente idade. Nos vertebrados, o comprimento do telômero durante o desenvolvimento embrionário é similar nas células da maioria dos tecidos, mas, após o nascimento, estes encurtam progressivamente nas células somáticas proliferativas **(105)**.

Alguns autores reportam que telômeros encurtados podem estar associados com o aumento da deficiência cognitiva e demência de risco em populações não-HIV **(106, 107)** e, como tal, este parâmetro pode ser um marcador para o declínio relacionado com a idade atípica cognitiva **(108, 109)**. Desta forma, telômero encurtado para além do esperado para uma determinada idade, pode prever funcionamento neurocognitivo em pessoas com HIV e, finalmente, sugerir envelhecimento acelerado neurocognitivo.

Na Figura **2a** podemos comparar a classificação entre os grupos e observamos diferença estatística entre HIV+ sem alteração neurocognitiva e MND ($p=0.039$). Na figura **2b**, a comparação entre os grupos HIV+ com e sem alteração cognitiva apresentou mais evidenciada ($p=0.0369$).

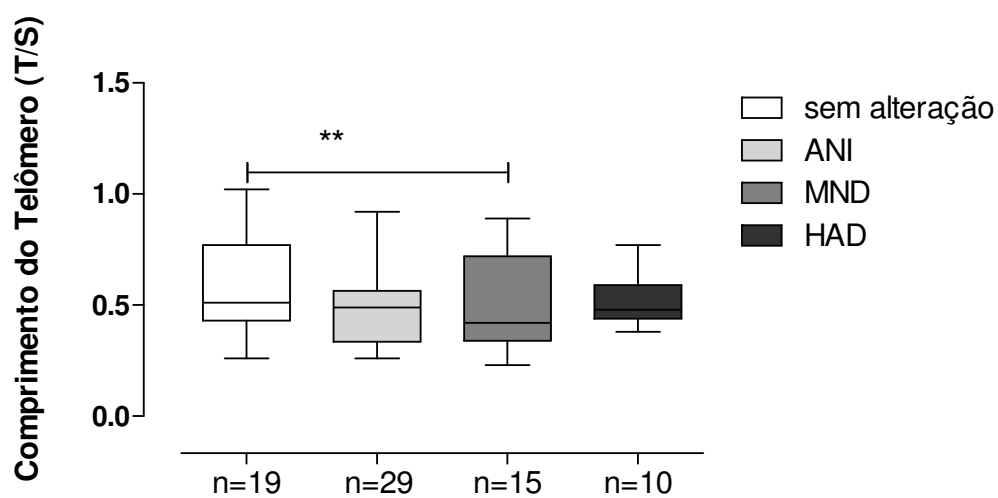


Figura 2a- Comparação do comprimento dos telômeros dos grupos HIV+ e com alterações neurocognitivas. **p=0.0389.

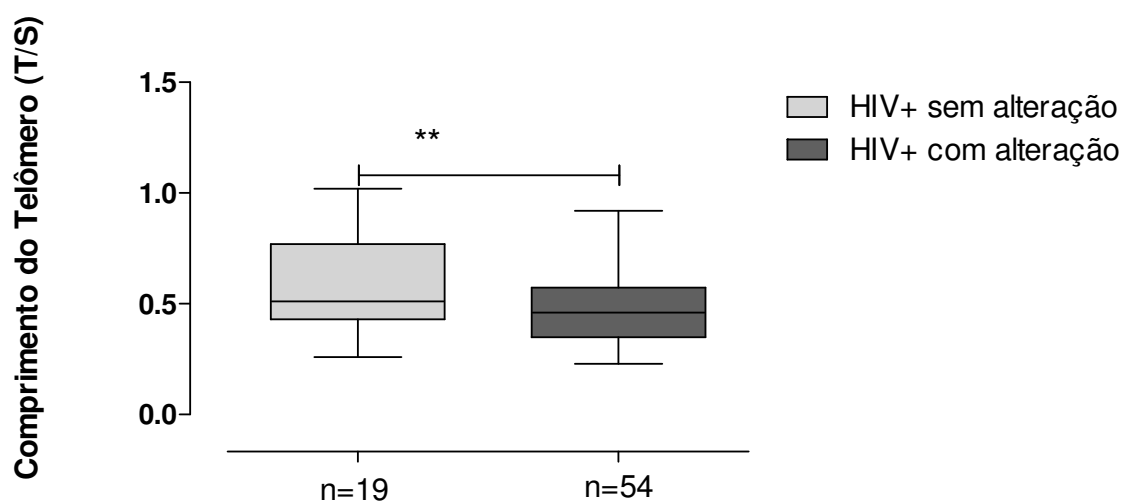


Figura 2b- Comparação do comprimento dos telômeros entre os grupos HIV+ sem e com alteração neurocognitiva. **p=0.0369.

6. Discussão

Nossos resultados demonstraram que há diferença significativa no comprimento dos telômeros em leucócitos entre indivíduos HIV+ em comparação MND. Este fato está de acordo o estudo desenvolvido por Palmer *et al.*, 1997 **(110)**, o qual visou estudar o comprimento dos telômeros em subpopulações de linfócitos T. Até o momento, este é o terceiro estudo (depois de Chantebrecht *et al.*, 2014 e Malan Muller *et al.*, 2013), que avaliou o comprimento dos telômeros em leucócitos totais de indivíduos com alterações neurocognitivas infectados pelo HIV-1.

Neste estudo, os telômeros das células T CD8+ de indivíduos HIV+ foram consideradas mais curtas do que em doadores HIV negativos, evidenciando o impacto da infecção viral sobre a senescência, neste compartimento celular, apesar das células T CD4+ demonstrarem resultado oposto. Neste contexto, os autores sugeriram que a infecção por HIV estava associada às alterações na dinâmica de ambas as subpopulações de linfócitos T, entretanto não fornecerem evidências para a exaustão clonal ou senescência replicativa como um mecanismo subjacente ao declínio nas células T CD4+ infectadas pelo HIV **(111)**. Alguns autores ainda sugerem que a infecção por HIV em si pode causar inflamação, bem como a ativação imunitária crônica e a proliferação de algumas células do sangue, reduzindo ainda mais o comprimento do telômero, levando à imunossenescência **(100, 101)**.

Entretanto, ainda existem algumas divergências na literatura quanto a estes achados. Um estudo realizado com mulheres soropositivas para HIV-1 sugere que o comprimento dos telômeros de leucócitos não difere significativamente entre HIV+ e HIV- **(112)**, ressaltando que pode haver também uma variação individual em processos celulares em indivíduos infectados pelo HIV-1, contradizendo com outros

estudos (113, 114) os quais relataram significância. Curiosamente, muitos autores sugerem que os inibidores da transcriptase reversa, como Azidotimidina (AZT), podem inibir a atividade da telomerase *in vitro* (115, 116) e, como consequência, induzir a senescência celular através do encurtamento dos telômeros (117, 118, 119, 120).

Outro fator que poderá influenciar no comprimento dos telômeros seria quanto ao gênero. Em nosso estudo, foram avaliados 122 homens e 69 mulheres (com e sem HIV) e não foi verificada diferença significativa entre os gêneros, possivelmente pela heterogeneidade de número entre eles. Estes achados condizem com outros estudos (121), os quais não encontraram diferença no tamanho dos telômeros entre os gêneros, dentre as idades 19 até 37 anos, porém foram encontrados telômeros maiores em mulheres em relação aos homens entre 30 a 93 anos de idade.

De acordo com Gartner et al., 2014 (122), a avaliação do tamanho telomérico pode variar de acordo com a metodologia utilizada. Segundo estudo de Gutierrez-Rodrigues 2014, a técnica de PCR quantitativa é mais suscetível a variações menores em condições de amostra e integridade do DNA. A coleta de sangue e purificação de DNA também podem contribuir para a variabilidade da *qPCR*. Devido à fisiopatologia de algumas doenças, a escassez de células em amostras dos pacientes pode interferir no estudo do telômero, isto é, na purificação de DNA, e afetar diretamente a qualidade do DNA genômico. Pequenas variações na qualidade da amostra, bem como diferenças de doadores individuais podem ser amplificadas por *qPCR*, em última análise, levando à baixa precisão observada em medidas de comprimento dos telômeros dos pacientes, assim como verificado na técnica de *Southern Blot*. Com isso, foi demonstrada que a metodologia de Flow-FISH é a mais exata, precisa e

reprodutível quando comparada com as técnicas de *Southern Blot* e *qPCR*, apesar do alto custo metodológico. Isto sugere um fator limitante em nossa pesquisa, uma vez que empregamos a técnica de *qPCR* **(123)**.

A associação entre os sexos e o comprimento dos telômeros é também bastante controversa, uma vez que estudos sugerem que o tamanho dos telômeros em leucócitos das mulheres é maior do que dos homens **(103,104)**. Tal hipótese se dá pela ação do estrogênio, estimulando a enzima telomerase, a qual adiciona repetições de telômeros nas extremidades dos cromossomos.

Muitos estudos reportam que o estilo de vida de um indivíduo pode influenciar não apenas suas características fenotípicas, mas também genotípicas representadas aqui pelo comprimento dos telômeros. Estes são complexos nucleoprotéicos localizados nas extremidades dos cromossomos, em que os componentes são trechos de DNA repetidos centenas a milhares de vezes, rico em guanina (TTAGGG) **(122)** com a finalidade de proteger esta região cromossômica da degradação enzimática **(124)**, mantendo a estabilidade cromossômica **(125)**. O DNA telomérico da maioria dos eucariontes consiste em repetições curtas e ricas em guanina (G) na fita que contém o final 3' referida como fita G. A fita complementar contendo o final 5' é rica em citosina (C) e denominada de fita C. A fita G ocorre na direção 5'-3' do cromossomo, mais longa que sua fita complementar C, devido a saliência no final 3' da fita simples **(126)**. Os telômeros tendem a encurtar progressivamente em cada divisão, apesar de ser regulado pela enzima telomerase **(127, 128)**.

Segundo Steward & Weinberg, 2006 muitos estudos correlacionam o comprimento dos telômeros com o envelhecimento humano **(129)**. Estes, por sua vez,

sugerem que o envelhecimento resulta de um lento acúmulo de danos que conduzem à deterioração celular e tecidual. Deste modo, orientado pelo mecanismo de morte celular programada ou “relógio biológico”, e regido pelo comprimento do telômero. Entretanto, existem estudos que suportam este papel, porém muitos ainda são contraditórios e inconclusivos **(130, 131, 132)**.

De fato, sabe-se que os telômeros são sensíveis aos danos oxidativos, por conter sequências ricas em Guaninas (G). Em regiões do DNA não codificantes, o reparo do dano ocasionado pelo corte deste nucleotídeo é pouco eficaz e o mecanismo de reparo por combinação homóloga é dificultado pela natureza de sequências repetitivas dos mesmos. Dessa forma, o encurtamento dos telômeros, dependente da idade pode ser significativamente acelerado por danos ao DNA, erros de replicação e falta de reparo **(133)**.

Em nosso estudo, como esperado, encontramos uma associação entre a progressão da idade e a diminuição do comprimento telomérico. Houve uma correlação inversa entre o tamanho do telômero e idade dos participantes, independente do status de HIV+, em conformidade com outros estudos **(134,135)**. Dessa forma, o encurtamento do telômero seria o "relógio molecular" que sinalizaria a eventual entrada no processo de senescência replicativa, observada em células humanas.

Até o momento, nosso estudo é o terceiro a avaliar associação entre comprimento dos telômeros e diferentes graus de neurocognição em ambos os gêneros, em portadores de HIV-1.

Existem estudos que relatam o agravamento do declínio cognitivo relacionado à idade, por consequência da infecção pelo HIV-1. Muitas pessoas infectadas pelo HIV de meia-idade estão experimentando declínio cognitivo semelhante àquela encontrada entre os adultos mais velhos **(136)**. De acordo com Seider e colaboradores, o HIV está associado com o envelhecimento cognitivo acelerado de modo a que as pessoas com HIV, na faixa de 50 e 60 anos estão com um funcionamento cognitivo similar ao das pessoas de 70 e 80 anos de idade. Há evidências crescentes de que o HIV e envelhecimento podem interagir para afetar negativamente as funções cerebrais e cognitivas **(137)**.

Em nosso estudo, o comprimento dos telômeros atuou como um marcador de envelhecimento entre as formas mais leves de neurocognição: MND, apresentando diferença estatística, ao contrário da forma mais severa (HAD), talvez pelo fato do número de indivíduos limitado. Este dado pode ser reforçado a partir da figura 2b, onde fica evidente que o comprimento dos telômeros entre os grupos, independente da infecção pelo HIV, e com as alterações neurocognitivas.

Uma das limitações de nosso estudo é a pequena quantidade de voluntários formados principalmente pelo grupo HAD, o que condiz com a literatura sobre a limitação da existência desse grupo atualmente. Um estudo anterior ao nosso avaliou o comprimento dos telômeros em mulheres infectadas pelo HIV-1 no contexto de trauma de infância **(113)**. Os autores sugerem que os telômeros podem atuar como um fator de susceptibilidade no aumento do declínio neurocognitivo em indivíduos infectados pelo HIV-1. Em contraste a estes achados, Giesbrecht et al., 2014 não encontraram relação significativa entre telômeros e níveis de neurocognição **(112)**.

Nossa coorte de estudo foi formada por ambos os gêneros, diferentemente de outros estudos que avaliaram em uma população do sexo feminino apenas, onde identificamos níveis de atividade física, das quais tem apresentado destaque científico, uma vez que estudos reportam efeitos benéficos em indivíduos que realizam exercícios físicos moderados e intensos sobre o comprimento dos telômeros **(134)**. Em nosso estudo não foi possível encontrar uma associação entre tabagismo e comprimento dos telômeros. Da mesma forma, a atividade física também não foi associada com o comprimento dos telômeros, contrariamente aos publicados anteriormente (134).

Diante desses achados, podemos sugerir que o comprimento dos telômeros foi associado com alterações neurocognitivas em indivíduos portadores do vírus HIV, em suas formas de comprometimento leve, o que reforça nossa hipótese inicial onde acreditamos que através do comprimento dos telômeros podemos identificar envelhecimento cognitivo nesse grupo de indivíduos, sendo uma ferramenta extremamente importante para a clínica médica.

7. Conclusões

- O comprimento dos telômeros não difere entre os gêneros (independente da infecção pelo HIV-1);
- Menor comprimento dos telômeros com a progressão da idade;
- Indivíduos com alterações cognitivas, incluindo as formas mais leves, apresentaram menor tamanho de telômero.
- De acordo com nossos achados, sugerimos que os telômeros podem ser considerados importantes biomarcadores em indivíduos com alterações neurocognitivas associadas ao HIV-1, por apresentarem diminuição telomérica evidente em relação ao grupo HIV+, independente da gravidade da neurocognição.
- Não há associação do comprimento dos telômeros com outras variáveis, tais como: tabagismo, atividade física, TCD4+, tempo de infecção pelo HIV, carga viral plasmática.

8. Referências

- 1)Centers for Disease Control and Prevention. HIV surveillance report, 2011. Vol. 23.2013:11.Disponível em:<http://www.cdc.gov/hiv/topics/surveillance/resources/reports/> Acessado agosto 2016.
- 2)World Health Organization. UNAIDS Global Aids 2016. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/en/> acessado agosto 2016.
- 3)Cañizares S, Cherner M, Ellis RJ. HIV and aging: effects on the central nervous system. *Semin Neurol* 2014;34:27-34.
- 4)Unaid's Brasil. Disponível em: <http://unaid's.org.br/> acessado agosto 216
- 5)Paulo Pereira Cristo. Alterações Cognitivas na Infecção pelo HIV e Aids. *Rev. Assoc. Med. Bras.*2010;56(2):242-7
- 6)Toborek M., Lee Y. W., Flora G., Pu H., Andrés I. E., Wylegala E., et al. Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 181–199. 10.1007/s10571-004-1383-x
- 7)Rao V. R., Ruiz A. P., Prasad V. R. (2014). Viral and cellular factors underlying neuropathogenesis in HIV associated neurocognitive disorders (HAND). *AIDS Res. Ther.* 11:13. 10.1186/1742-6405-11-13
- 8)Michel Elyas et al., 2015. Neuroimaging of HIV-associated neurocognitive disorders Dement. *Neuropsychol* 2015 December;9(4):380-384
- 9)Giesbrecht CJ et al Select neurocognitive impairment in HIV-infected women: associations with HIV viral load, hepatitis C virus, and depression, but not leukocyte telomere length. *PLoS One.* 2014 Mar 4;9(3):e89556.
- 10)Pathai S, Relvado SD, Gilbert CE, McGuinness D, McGlynn L, et al. 2013. accelerated biological aging in HIV-infected individuals in South Africa: A case-control. *AIDS.* 2013Sep24;27(15):2375-84.
- 11)Zanet DL, Sattha B, Maan E, Thorne A, Gadawski I, et al. 2012. Factors associated with shorter telomere length of white blood cells in HIV + and HIV adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 23
- 12)Von Zglinicki T, Serra V, Lorenz M, Saretzki G, Lenzen-Grossimlighaus R, et al. 2000. Short telomeres in patients with vascular dementia: An indicator of low antioxidant capacity and a possible risk factor *Lab Invest* 80: 1739-1747 10.1038
- 13)Honig LS, Kang MS, Schupf N, Lee JH, Mayeux R. Association of shorter leukocyte telomere repeat length with dementia and mortality. *Arch Neurol.* 2012 Oct;69(10):1332-9

14)Dr Lawrence S. Honig, MD, PhD, Dr Min Suk Kang, PhD, Dr Nicole Schupf, PhD, MPH, Dr Joseph H. Lee, DrPH, MPH, and Dr Richard Mayeux, MD, MSc Association of Shorter Leukocyte Telomere Repeat Length with Dementia and Mortality *Arch Neurol*. 2012 Oct; 69(10): 1332–1339.

15)McArthur JC, Steiner J, Sacktor N, Nath A Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: Mind the gap. *Ann Neurol*. 2010 Jun; 67(6):699-714.

16)Desplats P, Dumaop W, Smith D, Adame A, Everall I, Letendre S, Ellis R, Cherner M, Grant I, Masliah E Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain. *Neurology*. 2013 Apr 9; 80(15):1415-23.

17)Rao V. R., Ruiz A. P., Prasad V. R. Viral and cellular factors underlying neuropathogenesis in HIV associated neurocognitive disorders (HAND) *AIDS Research and Therapy*. 2014;11(article 13) doi: 10.1186/1742-6405-11-13

18)Gill A. J., Kolson D. L. Chronic inflammation and the role for cofactors (hepatitis C, drug abuse, antiretroviral drug toxicity, aging) in HAND persistence. *Current HIV/AIDS Reports*. 2014;11(3):325–335. doi: 10.1007/s11904-014-0210-3.

19)Tavazzi E., Morrison D., Sullivan P., Morgello S., Fischer T. Brain inflammation is a common feature of HIV-infected patients without HIV encephalitis or productive brain infection. *CurrentHIVResearch*.2014;12(2):97110.doi:10.2174/1570162x12666140526114956

20)Cysique LA, Brew BJ, Halman M, Catalan J, Sacktor N, Price RW, Brown S, Atkinson JH, Clifford DB, Simpson D, Torres G, Hall C, Power C, Marder K, McArthur JC, Symonds W, Romero C Undetectable cerebrospinal fluid HIV RNA and beta-2 microglobulin do not indicate inactive AIDS dementia complex in highly active antiretroviral therapy-treated patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Aug 1; 39(4):426-9

21)Sam Nightingale, Alan Winston, Scott Letendre, Bento DMichael, Justin McArthur, Saye K hoo e Tom Solomon. Controversies in neurocognitive disorders associated with HIV *Lancet Neurol*.2014 november;13(11):1139-1151.

22)Letendre, s marquie-beck, j, capparelli et al. Validation of the CNS penetration effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch. NEUROL*. (S.L), V 65, P 65-70, 2008

23)Departamento de DST, Aids e hepatites virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/> acessado agosto 2016

- 24) Cysique LA, Waters EK, Brew BJ. Effectiveness of the central nervous system antiretroviral in HIV infection: a review and qualitative and quantitative implications for future research. *BMC Neurol.* 2011; 11: 148
- 25) Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, et al. (2007) Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 69: 1789–1799.
- 26) Brouillette MJ, Yuen T, Fellows LK, Cysique LA, Heaton RK, Mayo NE. Identifying Neurocognitive Decline at 36 Months among HIV-Positive Participants in the CHARTER Cohort Using Group-Based Trajectory Analysis. *PLoS One.* 2016 May 18;11(5):e0155766. doi: 10.1371/journal.pone.0155766.
- 27) McArthur, J.C.; Steiner, J.; Sacktor, N.; Nath A. Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: Mind the gap. *Ann Neurol*,67:699-14, 2010.
- 28) Simioni, S.; Cavassini, M.; Annoni, J.M.; et al. Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS*,24:1243-50, www.journals.lww.com/aidsonline2010
- 29) Maria Rita Polo Gascón Heaton, R.; Franklin, D.; Woods, S.; et al. Asymptomatic Mild HIV-associated Neurocognitive Disorder Increases Risk for Future Symptomatic Decline: A CHARTER Longitudinal Study. 19th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Seattle, March 5-8, Abstract 77, 2012.
- 30) McArthur, J.C.; Brew, BJ. HIV-associated neurocognitive disorders: is there a hidden epidemic? *AIDS*,24:1367-70, 2010.
- 31) Dore, G.J.; McDonald, A.; Li, Y.; et al. Marked improvement in survival following AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 17:1539-45, 2003
- 32) Wright EJ, Nunn M, Joseph J, K Robertson, Lal L, Brew BJ neuroAIDS Asia-Pacific region. *J Neuroradiol.* November 2008; 14 (6): 465-73.
- 33) Heaton RK, Cysique LA, Jin H, et al. Effects Neurobehavioral of infection by the human immunodeficiency virus among former plasma donors in China rural. *J Neurovirol.* 2008; 14 : 536-49.
- 34) Valcour V, Shikuma C, Shiramizu B, et al. Age, apolipoprotein E4, and the risk of HIV dementia: the Hawaii Aging with HIV Cohort. *J Neuroimmunol.* 2004;157:197–202.
- 35) Morgan EE, Woods SP, Letendre SL, et al. Apolipoprotein E4 genotype does not increase risk of HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol.* 2013;19:150–56.

- 36) Atkinson JH, Heaton RK, Patterson TL, Wolfson T, Deutsch R, SJ Brown, Summers J, Sciolla A, Gutierrez R, Ellis RJ, Abramson I, Hesselink JR, McCutchan JA, Grant I, Grupo HNRC Two-year prospective study of major depressive disorder in HIV-infected men. *J Affect Disord.* 2008 Jun;108(3):225-34.
- 37) Sam Nightingale, Alan Winsto, Scott Letendre, Bento D Michael, Justin C McArthur, Saye Khoo, e Tom Solomon. Controversies in neurocognitive disorders associated with HIV. *Lancet Neurol.* 2014 Nov; 13 (11): 1139-1151. doi: 10.1016 / S1474-4422 (14) 70137-1
- 38) Valcour V, Shikuma C, Shiramizu B, et al. Age, apolipoprotein E4, and the risk of HIV dementia: the Hawaii Aging with HIV Cohort. *J Neuroimmunol.* 2004;157:197–202.
- 39) Morgan EE, Woods SP, Letendre SL, et al. Apolipoprotein E4 genotype does not increase risk of HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol.* 2013;19:150–56.
- 40) Robertson KR, Smurzynski M, Parsons TD, et al. The prevalence and incidence of neurocognitive impairment in the HAART era. *AIDS.* 2007;21:1915–21.
- 41) Canizares S, Cherner M, Ellis RJ. HIV and aging: effects on the central nervous system. *Semin Neurol.* 2014;34:27–34.
- 42) Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, et al. HIV-associated neurologic disease incidence changes: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990–1998. *Neurology.* 2001;56:257–60
- 43) Woods SP, Moore DJ, Weber E, Grant I. Cognitive neuropsychology of HIV-associated neurocognitive disorders. *Neuropsychol Rev.* 2009;19:152–68.
- 44) Atkinson JH, Heaton RK, Patterson TL, et al. Two-year prospective study of major depressive disorder in HIV-infected men. *J Affect Disord.* 2008;108:225–34
- 45) Rosângela S Kalil et al hiv infection of brain: the biologics basis of neuropsychology dst – *J bras Doenças Sex Transm* 17(1): 71-75, 2005
- 46) Paulo Pereira christo – alterações cogntivas na infecção pelo HIV e aids- ver. *Assoc. med. Brás* 2010;56(2): 242-7
- 47) *Radiol Bras.* 2011 Jan/Fev;44(1):7–12
- 48) Sjöbeck M, Elfgrén C, Larsson EM, et al. Alzheimer's disease (AD) and executive dysfunction. A case-control study on the significance of frontal white matter changes detected by diffusion tensor imaging (DTI). *Arch GerontolGeriatr.* 2010; 50:260–6.

- 49) Cohen RA, Harezlak J, Gongvatana A, Buchthal S, Schifitto G, Clark U, et al. Cerebral metabolite abnormalities in human immunodeficiency virus are associated with cortical and subcortical volumes. *J Neurovirol.* 2010;16:435–44.
- 50) Hua X, Boyle CP, Harezlak J, Tate DF, Yiannoutsos CT, Cohen R, et al. Disrupted cerebral metabolite levels and lower nadir CD4+ counts are linked to brain volume deficits in 210 HIV-infected patients on stable treatment. *Neuroimage Clin.* 2013;3:132–42
- 51)Thompson PM, Dutton RA, Hayashi KM, Toga AW, Lopez OL, Aizenstein HJ, et al. Thinning of the cerebral cortex visualized in HIV/AIDS reflects CD4+ T lymphocyte decline. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2005;102:15647–52.
- 52)Becker JT, Bajo R, Fabrizio M, Sudre G, Cuesta P, Aizenstein HJ, et al. Functional connectivity measured with magnetoencephalography identifies persons with HIV disease. *Brain Imaging Behav.*2012;6:366–73.
- 53)Michel Elyas Jung Haziot, Silas Pereira Barbosa Junior , José E. Vidal, Francisco Tomaz Meneses de Oliveira, Augusto César Penalva de Oliveira- *Dement Neuropsychol* 2015 December;9(4):380-384 380 Neuroimaging of HIV-associated neurocognitive disorders
- 54)Abdulle S, Mellgren A, Brew BJ, Cinque P, Hagberg L, et al. (2007) CSF neurofilament protein (NFL) -- a marker of active HIV-related neurodegeneration. *J Neurol* 254: 1026-1032
- 55)Bebell LM, Passmore JA, Williamson C, Mlisana K, Iriogbe I, et al. (2008)Relationship between levels of inflammatory cytokines in the genital tract and CD4+ cell counts in women with acute HIV-1 infection. *J Infect Dis*198: 710-714.
- 56)Letendre SL, Zheng JC, Kaul M, Yiannoutsos CT, Ellis RJ, et al. (2011)Chemokines in cerebrospinal fluid correlate with cerebral metabolite patterns in HIV-infected individuals. *J Neurovirol* 17: 63-69.
- 57)Roberts L, Passmore JA, Williamson C, Little F, Bebell LM, et al. (2010)Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 24: 819-831
- 58)Lane BR, King SR, Bock PJ, Strieter RM, Coffey MJ, Markovitz DM. The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology.* 2003;307(1):122–134. doi: 10.1016/S0042-6822(02)00045-4.
- 59)Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.*2005;307(5714):1434–1440. doi: 10.1126/science.1101160.

60)Masliah E, DeTeresa RM, Mallory ME, Hansen LA. Changes in pathological findings at autopsy in AIDS cases for the last 15 years. *AIDS*. 2000;14:69–74.

61)Deanna A. Kulpa e Nicolas Chomont *J Virus Erad*. 2015 Apr; 1 (2): 59-66. Persistence of HIV in antiretroviral therapy environment: when, where and how HIV is hiding?

62)NeoGame L,Heylen E,Shet A, *et al* The long-term efficacy of antiretroviral therapy in first-line Indian HIV-1 infected patients: a study of longitudinal cohort.*PLoS ONE* 2013; 8: e55421.

63)Terapia Anti-Retroviral Cohort Collaboration. The life expectancy of individuals on antiretroviral combination therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* 2008; 372: 293 – 12.

64)Price RW, Spudich S. Antiretroviral therapy and central nervous system HIV type 1 infection. *J Infect Dis*. 2008;197(Suppl 3):S294–306.

65)Bryant G,Smith N,Keiser P A model for HIV-1 viral load monitoring reduction in resource-limited settings. *J Int Assoc Provid AIDS Cuidados* 2013; 12: 67- 71.

66)D'Arminio Monforte A, Cinque P, Mocroft A, *et al*. Changing incidence of central nervous system diseases in the EuroSIDA cohort. *Ann Neurol*. 2004;55:320–8.

67)Canestri A, Lescure FX, Jaureguiberry S, *et al*. Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2010;50:773–778.

68)Dahse R, Fielder W, Ernst G. Telomeres and Telomerase: Biological and clinical importance. *Clin. Chem*. 1997;43(5):708-14

69)Engelhardt M, Filke J. To the editor: Does telomere shortening count? *Blood*. 2001;98(3):888-9

70)Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: Cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:531-57

71)Oeseburg H, de Boer UA, van Gilst WH Van der Harst P (2010) Telomere biology in healthy aging and disease. *Eur J Physiol* 459: 259–268

72)Hug N, Lingner J. Telomere length homeostasis.*Chromosoma*. 2006;115:4113-25

73)Callen E, Surralles J (2004) Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutat Res* 567: 85–104

- 74)Thurnher D, Bakroeva M, Formanek M Knerer B, Kornfehl J (2001) Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit telomerase activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Head & Neck* 23: 1049–1055
- 75)Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996;18:173–179.
- 76)Appay V, Rowland-Jones SL (2002) Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS? *Trends Immunol* 23: 580–585
- 77)Effros RB (2000) Telomeres and HIV disease. *Microbes Infect* 2: 69–76
- 78)Von Zglinicki T, Serra V, Lorenz M, Saretzki G, Lenzen-Grossimlghaus R, et al. (2000) Short telomeres in patients with vascular dementia: An indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab Invest* 80: 1739–1747
10.1038/labinvest.3780184
- 79)Honig LS, Schupf N, Lee JH, Tang MX, Mayeux R (2006) Shorter telomeres are associated with mortality in those with APOE epsilon 4 and dementia. *Ann Neurol* 60: 181–187 10.1002/ana.20894.
- 80)Martin-Ruiz C, Dickinson HO, Keys B, Rowan E, Kenny RA, et al. (2006) Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline. *Ann Neurol* 60: 174–180 10.1002/ana.20869.
- 81)Yaffe K, Lindquist K, Kluse M, Cawthon R, Harris T, et al. (2011) Telomere length and cognitive function in community-dwelling elders: Findings from the health ABC study. *Neurobiol Aging* 32: 2055–2060 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.006
- 82)Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H (2003) Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 1014–1018
- 83)Thurnher D, Bakroeva M, Formanek M Knerer B, Kornfehl J (2001) Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit telomerase activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Head & Neck* 23: 1049–1055
- 84)Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B Melander O, Nilsson P, et al. (2008) Telomere length is associated to obesity parameters but with a gender difference. *Obesity* 16: 2682–2689
- 85) Puterman E, Lin J, Blackburn E, O'Donovan A, Adler N, et al. (2010) The Power of Exercise: Buffering the Effect of Chronic Stress on Telomere Length. *PLoS ONE* 5: e10837

- 86) Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, et al. (2005) Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366: 662–64
- 87) J.Prescott, Paternal age at birth is associated with offspring leukocyte telomere length in the nurses' health study *Hum Reprod.* 2012 Dec; 27(12): 3622–3631
- 88) Hunt SC, Chen W, Gardner JP, et al Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell* 2008;7:451–58
- 89) Von Känel R Comparison of telomere length in black and white teachers from South Africa: the sympathetic activity and ambulatory blood pressure in Africans stud *Psychosom Med.* 2015 Jan;77(1):26-32. doi: 10.1097/PSY.0000000000000123
- 90) Antinori, A.; Arendt, G.; Becker, J.T.; et al. Update research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology*, 69:1789-99, 2007.
- 91) Henrique, I.F., De Micheli, D.; De Lacerda, R.B; De Lacerda, L.A.; Formigoni, M.L. Validação da versão brasileira do teste de triagem do envolvimento com álcool, cigarro e outras substâncias (ASSIST). *Rev Assoc Med Bras*,50:199-206, 2004. www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0104-4230
- 92) Lawton. M.P.; Brody. E.M. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*, 9 (3): 179-186, 1969. Recuperado em 15 de julho de 2012. www.geronurseonline.org
- 93) Wang, Y., Argimon, I.I.L., Werlang, B.S.G. BDI-II: Inventário de Depressão de Beck II. Adaptação para o português, Clarice Gorenstein, et al. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2011.
- 94) Maj, M.; Satz, P.; Janssen, R.; et al. WHO Neuropsychiatric AIDS study, cross-sectional phase II. Neuropsychological and neurological findings. *Arch Gen Psychiatry*, 51:51-61, 1994. Recuperado em 12 de julho de 2012. <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=496474>
- 95) Sacktor, N.C.; Wong, M.; Nakasujja.; N, et al. The international HIV-1 Dementia Scale: a new rapid screening test for HIV-1 dementia. *AIDS*, 19:1367-74, 2005. Recuperado em 13 de julho de 2012. www.journals.lww.com/aidsonline
- 96) Ellis, RJ, Evans, S.R.; Clifford, D.B.; et al. Clinical validation of the NeuroScreen. *J Neurovirol* ,11:503-11, 2005. Recuperado em 12 de julho de 2012. www.oxfordjournals.org
- 97) Wechsler, D. (2004, 1ª Ed.). WAIS III- Escala de inteligência para adultos: manual. (Elizabeth Nascimento, Trad.). São Paulo: Casa do Psicólogo. (Original publicado em 1997)

- 98)Diniz, L.F.M.; Da Cruz, M.F.; Torres, V.M.; Cosenza, R.M. O teste de aprendizagem auditivo-verbal de Rey: nomas para uma população brasileira. *Rev Bras Neurol*, 36(3):79-83, 2000. Recuperado em 20 de julho de 2012.[www.http://journalseek.net/cgi-bin/journalseek/journalsearch.cgi?field=issn&query=0101-8469](http://journalseek.net/cgi-bin/journalseek/journalsearch.cgi?field=issn&query=0101-8469)
- 99)Rey, A. Figuras complexas de Rey – Teste de cópia e de reprodução de memória de figuras geométricas complexas. Adaptação brasileira: Oliveira, M.S.; Rigoni, M.S. *Casa do Psicólogo*: São Paulo, 2010
- 100)Bestilny LJ, Gill MJ, Mody CH, Riabowol KT. Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection. *Aids*. 2000;14:771–780.
- 101)Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med*. 2011;62:141–155.
- 102)Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet*. 2004;363:507–510.
- 103)Bekaert S, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Langlois M, Segers P, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell*. 2007;6:639–647.
- 104)Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol*. 2007;165:14–21.
- 105)Monaghan P, haussman. Do telomere dynamycs lynk lifestyle and lifespan_Trend ecology and evolution 2006: 21:47-53
- 106)Von Zglinicki T, Serra V, Lorenz M, Saretzki G, Lenzen-Grossimlighaus R, et al. (2000) Short telomeres in patients with vascular dementia: An indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab Invest* 80: 1739–1747 10.1038/labinvest.3780184.
- 107)Honig LS, Schupf N, Lee JH, Tang MX, Mayeux R (2006) Shorter telomeres are associated with mortality in those with APOE epsilon 4 and dementia. *Ann Neurol* 60: 181–187 10.1002/ana.20894.
- 108)Martin-Ruiz C, Dickinson HO, Keys B, Rowan E, Kenny RA, et al. (2006) Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline. *Ann Neurol* 60: 174–180 10.1002/ana.20869.

- 109) Yaffe K, Lindquist K, Kluse M, Cawthon R, Harris T, et al. (2011) Telomere length and cognitive function in community-dwelling elders: Findings from the health ABC study. *Neurobiol Aging* 32: 2055–2060 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.006
- 110) Palmer LD, Weng N, Levine BL, June CH, Lane HC, Hodes RJ. Telomere length, telomerase activity, and replicative potential in HIV infection: analysis of CD4+ and CD8+ T cells from HIV-discordant monozygotic twins. *J Exp Med*. 1997 Apr 7;185(7):1381-6.
- 111) Larry D. Palmer The telomere length and telomerase activity, and replicative potential in HIV infection: CD4 + analysis and CD8 + T cells in HIV-discordant monozygotic J Exp Med. 1997 07 de abril; 185 (7): 1381-1386.
- 112) Giesbrecht CJ et al Select neurocognitive impairment in HIV-infected women: associations with HIV viral load, hepatitis C virus, and depression, but not leukocyte telomere length. *PLoS One*. 2014 Mar 4;9(3):e89556. doi: 10.1371/journal.pone.0089556. eCollection 2014
- 113) Malan-Müller S et al. Shorter telomere length - A potential susceptibility factor for HIV-associated neurocognitive impairments in South African women [corrected]. *PLoS One*. 2013;8(3):e58351. doi: 10.1371/journal.pone.0058351. Epub 2013 Mar 5
- 114) Hélène CF Côté- Leukocyte Telomere Length in HIV-Infected and HIV-Exposed Uninfected Children: Shorter Telomeres with Uncontrolled HIV Viremia- *PLoS One*. 2012; 7(7): e39266.
- 115) Yamaguchi T, Takayama Y, Saito M, Ishikawa F, Saneyoshi M. Telomerase-inhibitory effects of the triphosphate derivatives of some biologically active nucleosides. *Nucleic Acids Res*. 2001
- 116) Hukazelie KC, Wong J. In vitro and in vivo inhibition studies of human telomerase by HIV reverse transcriptase. 20th Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research. Toronto, Ontario, Canada: *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2011. 45B
- 117) Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol*. 1996;16:53–65.
- 118) Brown T, Sigurdson E, Rogatko A, Broccoli D. Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol*. 2003;10:910–915.
- 119) Liu X, Takahashi H, Harada Y, Ogawara T, Ogimura Y, et al. 3'-Azido-2',3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphates inhibit telomerase activity in vitro, and the corresponding nucleosides cause telomere shortening in human HL60 cells. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:7140–7149.

- 120) Datta A, Bellon M, Sinha-Datta U, Bazarbachi A, Lepelletier Y, et al. Persistent inhibition of telomerase reprograms adult T-cell leukemia to p53-dependent senescence. *Blood*. 2006;108:1021–1029.
- 121) Hunt SC, Chen W, Gardner JP, Kimura M, Srinivasan SR, Eckfeldt JH, et al. Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell*. 2008;7:451–458.
- 122) Michael Gardner. Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*. 2014 Mar; 51: 15–27.
- 123) Fernanda Gutierrez-Rodrigues, et al 2014- Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans- DOI: 10.1371/journal.pone.0113747
- 124) Dahse *et al.*, 1997 Telomeres and Telomerases: Biological and Clinical importances. *Clim Chem* 1997: 43(5):708-14
- 125) Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, March GE, De Marzo AM. Telomere length assessment in human archival tissues. *Am. J pathol*. 2002;160(4):1259-67
- 126) Hug & Lingner, 2006 Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 2006;115:413-25
- 127) Harley CB, Fuchter AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-460.
- 128) Blackburn E. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-573
- 129) Stewart et al. Telomeres: Cancer to human Aging. *Annu Rev Cell Dev Bio*. 2006, 22:531-57
- 130) Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000; 408:53-56.
- 131) Sanders JL, Newman AB. Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither? *Epidemiol Rev* 2013; 35:112-131.
- 132) Simons MJ. Questioning causa involvement of telomeres in aging. *Ageing Res Rev* 2015; pii: S1568-1637 30015-5.
- 133) Goronzy JJ et al. Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Exp. Gerontol* 2006;41:246-51

134)De araujo AL et al.; Elderly men with moderate and intense training lifestyle present sustained higher antibody responses to influenza vaccine. *Age (Dordr)* 2015 Dec 19;37(6):105.

135)Pathai S et al., 2013-Is HIV a model of accelerated or accentuated aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jul;69(7):833-42.

136)Ronald A Cohen, HIV effects on age-associated neurocognitive dysfunction: premature cognitive aging or neurodegenerative disease? Published online 2015 Apr 6.

137)Seider TR, Luo X, Gongvatana A, Devlin KN, de la Monte SM, Chasman JD, et al. Verbal memory declines more rapidly with age in HIV infected versus uninfected adults. *J Clin Exp Neuropsychol*.2014;36:356–67

Anexo I

Função	Teste	Autores
Função cognitiva e Inteligência	WAIS III Escala de Inteligência Weschsler para Adultos	Autor: David Weschler Adaptação Brasileira: Elizabeth Nascimento, 2004 Casa do Psicólogo
Memória Operacional e de Trabalho	WAIS III Escala de Inteligência Weschsler para Adultos Subteste: Dígitos	Autor: David Weschler Adaptação Brasileira: Elizabeth Nascimento, 2004 Casa do Psicólogo
Memória Episódica Auditiva	Rey Auditory Verbal Learning	Rey Auditory Verbal Learning – Normative data for the Brazilian population and analysis of the influence of demographic variables Psychological & Neuroscience, 2010 Sabrina S. Magalhães, Amer C. Hamdan
Memória Visual	Figuras Complexas de Rey	Autor: André Rey Adaptação Brasileira: Margareth da Silva Oliveira e Maisa dos Santos Rigoni, 2010 Casa do Psicólogo
Atenção Sustentada e Dividida	Teste de Trilhas Coloridas – Formas 1 e 2	Autores: Lous F.D’Elia, Paul Staz, Craig Lyons Uchiyama e Travis White Adaptação Brasileira: Ivan Sant’Ana Rabelo,

		Sílvia Verônica Pacanaro, Milena de Oliveira Rossetti, Irene F. Almeida de Sá Leme, 2010 Casa do Psicólogo
Atenção Sustentada e Alternada	Trail Making A e B	A Compendium of Neuropsychological test- Esther Straus, Elisabeth M.S. and Otfried Spreen
Habilidade Motora	Grooved Pegboard Finger test	A Compendium of Neuropsychological test- Esther Straus, Elisabeth M.S. and Otfried Spreen

Função	Teste	Autores
Velocidade de Processamento das Informações	WAIS III Escala de Inteligência Wechsler para Adultos Subteste: Códigos	Autor: David Weschler Adaptação Brasileira: Elizabeth Nascimento, 2004 Casa do Psicólogo
Visuoconstrução	Figuras Complexas de Rey	Autor: André Rey Adaptação Brasileira: Margareth da Silva Oliveira e Maisa dos Santos Rigoni, 2010 Casa do Psicólogo
Fluência Verbal Fonética	FAS	A Compendium of Neuropsychological test- Esther Straus, Elisabeth M.S. and Otfried Spreen
Fluência Verbal Categórica	Animais	Brucki SMD, Malheiros SFM, Okamoto IH, Bertolucci PHF. Dados normativos para o teste de fluência verbal categoria animais em nosso meio. Arq. Neuropsiquiatria; 55(1):56-61, 1997
Escala de Atividade de Vida Diária	Lawton	Lawton MP.; Brody EM Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. Gerontologist, v. 9, p. 179-186, 1969
Escala de Rastreio IDHS	International HIV Dementia Scale	Sacktor, N.C.; Wong, M.; Nakasujja.; N, et al. The international HIV-1 Dementia Scale: a new rapid screening test for HIV-1 dementia. AIDS, 19:1367-74, 2005. Recuperado em 13 de julho de 2012. www.journals.lww.com/aidsonline

“Instituto de Infectologia Emílio Ribas”

Termo de consentimento livre e esclarecido

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

1. NOME:.....

Documento de identidade n°sexo:.....

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

Endereço:.....n°apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

Cep:.....Telefone: (DDD).....

2. RESPONSÁVEL

LEGAL:.....

.....

...

Natureza (grau de parentesco, tutor e etc).....

Documento de identidade n°sexo:.....

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

Endereço:.....n°apto:.....

.

Bairro:.....

Cidade:.....

CEP:.....Telefone:

(DDD).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Avaliação da carga viral líquórica, plasmática em pacientes infectados pelo HIV-1 com alterações neurocognitivas”.

-PESQUISADOR EXECUTANTE: Marília Ladeira de Araújo

-PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO IIER: Augusto Penalva de Oliveira

-PESQUISADOR NA FMUSP: Jorge Simão do Rosário Casseb

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO X

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24meses

Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Título do projeto de pesquisa: “Avaliação da carga viral líquórica, plasmática em pacientes infectados pelo HIV-1 com alterações neurocognitivas”

Protocolo n° 34/11

O (a) senhor (a) que já faz parte do estudo do Dr. Augusto Penalva de Oliveira (que fica no Instituto de infectologia Emílio ribas- protocolo n° 08/11, tendo como título da pesquisa: “Estudo da prevalência de neuropatia periférica e demência associada ao HIV em São Paulo), também está sendo convidado a participar desse estudo sobre a avaliação da quantidade do vírus HIV (chamado de vírus da imunodeficiência humana) que está no seu sangue, e também a quantidade de uma proteína fica no líquido da espinha (ou líquido). Essa proteína se chama neurofilamento e ela indica se o seu cérebro possui alguma lesão causada pelo HIV.

Este estudo terá dois grupos: o primeiro chamado de grupo controle, compostos por indivíduos infectados pelo HIV-1 e, o segundo grupo será composto por indivíduos HIV e com demência. No momento da entrevista nós lhe informaremos em qual grupo o senhor pertence.

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

Nesse estudo irão participar 120 pacientes em acompanhamento clínico no Instituto de infectologia Emilio ribas, das quais 60 pacientes que tenham a demência associadas ao HIV e 60 pacientes infectados pelo HIV, sem demência, que será nosso grupo controle desta pesquisa.

No instituto de infectologia Emílio ribas foi feitos uma série de testes neuropsicológicos, das quais apresentaram resultados normais, sem demência. Dessa forma eles serão usados como controle desta pesquisa.

Para fazer parte deste estudo é necessária a coleta do líquido da espinha. Esta etapa da pesquisa já foi feita pela equipe do Dr. Augusto Penalva, deste modo será feita somente a coleta de sangue. A coleta de sangue (10 ml) aproximadamente dois colheres de sopa será feita com uma agulha esterilizada, limpa, ligada a um tubo de vidro contendo anticoagulante e será colocada em uma veia do seu antebraço, puxando o sangue para dentro do tubo por um processo a vácuo. Isso raramente causa um pequeno sangramento na pele que desaparecerá em pouco tempo. Este procedimento será feito nos dois grupos de pacientes dessa pesquisa.

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

O (a) senhor (a) também terá o direito de optar por não participar deste estudo. Caso o senhor decida não participar, isso não afetará em nada quanto ao seu direito em receber tratamento na rede pública de saúde.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros pacientes, não sendo divulgada a informação de nenhum paciente. Os documentos contendo as suas informações serão guardados em local seguro e, somente o pesquisador responsável e o executante terão acesso.

Nós lhe comunicaremos sobre novas informações deste ou de outros estudos, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional ela será adicionada no orçamento da pesquisa.

No caso do participante apresentar alguma conseqüência grave em decorrência da coleta, que o imobilize de seus afazeres domésticos (desde que seja devidamente comprovado), este deverá acionar ao coordenador do estudo e/ou pesquisador executante, assim como receberá total assistência a tratamento médica na Instituição.

Ao final deste estudo todas as amostras dos pacientes que foram coletados, assim como os questionários preenchidos serão destruídos, evitando esta forma serem identificado por terceiros.

Caso o (a) senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas através do telefone: (11) 3896-1406 ou pelo e-mail comitedeeticaier@iq.com.br. O senhor também receberá uma cópia deste termo, tendo alguma dúvida sobre a pesquisa pode ligar para a pesquisadora executante Marília Ladeira e/ou pesquisador responsável Jorge Casseb através do telefone (11)3061-7194, ou através do e-mail; jorgecasseb@yahoo.com.br ou ladeira.araujo@gmail.com. Podendo tirar suas dúvidas agora ou a qualquer momento. Desde já agradecemos sua participação!

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que foram lidas pra mim, descrevendo o estudo "AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL LIQUÓRICA, PLASMÁTICA EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1 COM ALTERAÇÕES NEUROCOGNITIVAS".

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

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

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

DADOS DO PACIENTE/REPRESENTANTE LEGAL

Nome:.....

.

Assinatura:.....**Data:**...../...../.....

..

DADOS RESPONSÁVEIS QUE OBTIVE O TCLE:

Nome:.....

.

Assinatura:.....**Data:**...../...../.....

..



QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA -

Nome: _____

Data: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: F () M ()

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas Fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação às pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITAS importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?
dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?
horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos

leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia?**

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia?**

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana?**

_____ horas _____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana?**

_____ horas _____ minutos