



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

WLISSÉS HENRIQUE VELOSO DE CARVALHO DA SILVA

Polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2RA* e sua influência na recuperação imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral

**Recife
2018**

WLISSES HENRIQUE VELOSO DE CARVALHO DA SILVA

Polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2RA* e sua influência na recuperação imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração Genética Humana, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães

**Recife
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Wlisses Henrique Veloso de Carvalho da
Polimorfismo nos genes *IL2* e *IL2RA* e sua influência na recuperação imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral / Wlisses Henrique Veloso de Carvalho da Silva. – Recife, 2018.

93 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2018.
Inclui referências e anexos.

1. Aids (Doença). 2. Síndrome de imunodeficiência imunológica. I. Guimarães, Rafael Lima (Orientador). II. Título.

616.9792

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 369

WLISSES HENRIQUE VELOSO DE CARVALHO DA SILVA

Polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2R α* e sua influência na recuperação imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral

Aprovado em 27 / 07 / 2018

Banca Examinadora:

**Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Fabrício Oliveira Souto
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Will Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco**

**Recife
2018**

Dedico este trabalho aos amantes da ciência, que apesar das dificuldades encontradas nessa longa caminhada, continuam perseverantes e otimistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Arlete, que me apoiou nas minhas decisões e com muito amor me ensinou a lutar pelos meus sonhos, encarando os obstáculos de cabeça erguida.

À minha linda e pequena irmãzinha, Weydla, que amo muito e sempre foi um dos motivos para eu seguir em frente nos meus objetivos. Além de ser a pessoa que me faz muito feliz e me ajudou a superar os momentos difíceis durante o mestrado.

Agradeço aos meus grandes amigos de pós-graduação, Werbson e Moezio, que se tornaram meus irmãos de coração e com quem tive ótimos momentos de alegria e também científicos. Que venham mais maratonas. “Tripé”.

À Rafael, Leonardo, Caio e Lucas, que desde a graduação se tornaram bons amigos com quem compartilhei momentos felizes e de descontração durante o mestrado. “The Batchas”.

Às minhas lindas amigas, Patrícia e Talita, pela amizade, cumplicidade, conselhos e os bons momentos compartilhados. “Se amação”.

Agradeço, em especial, à Thays por suportar minhas chatices e aflições durante o mestrado e sempre torcendo por mim em momentos decisivos.

Ao meu orientador e também amigo, Prof. Dr. Rafael Guimarães, pelos ensinamentos e confiança em mim depositada e em meus trabalhos.

Ao meu amigo de projeto, Leandro, que me ajudou no desenvolvimento desse trabalho de mestrado.

Às ICs Carol e Jessyca que me deram suporte na execução de alguns dos meus experimentos no laboratório.

Aos demais companheiros do grupo de PatGen (Camila, Heitor, Natália, Jeanne, Dalila, Ana, Ronald, Ronaldo, Antônio e tantos outros) que tornam o laboratório um ambiente mais agradável ao trabalho.

Ao Prof^o Fabrício pelo apoio e paciência nas análises de citometria.

A equipe do IMIP pelo apoio durante as coletas das amostras, especialmente Ana, sempre paciente e simpática.

A todos os indivíduos doadores de suas amostras, pois sem elas o desenvolvimento desta pesquisa não seria possível.

Aos membros da banca examinadora por suas disponibilidades e importantes contribuições para melhoria do trabalho.

À FACEPE e ao CNPq pelo suporte financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, deixo os meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigado a todos!

“Ver é viver. E ser visto é ter certeza que eu vivi.”

Leandro Karnal

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é consequência de uma infecção causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que leva a destruição progressiva das células T CD4+. O atual tratamento antirretroviral (ART) objetiva suprimir a replicação viral, impedindo a progressão da doença e mortes relacionadas à AIDS. Apesar da eficiência da terapia anti-HIV, alguns indivíduos apresentam recuperação deficiente de células T CD4+, mesmo com a supressão viral, caracterizando a falha imunológica. Existem diversos fatores que podem levar à falha imunológica, principalmente relacionados à produção e proliferação de linfócitos T CD4+. Com isso, o presente estudo se propôs a (1) investigar a influência de polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2R* com a recuperação imunológica em pacientes HIV-positivos sob ART e (2) analisar a produção dos linfócitos T CD4+ nesses indivíduos. 248 pacientes (107 homens e 141 mulheres) em tratamento com carga viral suprimida (<50cópias/mL) foram recrutados, 122 incluídos no grupo caso (falha imunológica) e 126 no grupo controle (sucesso imunológico). Foi realizado o isolamento de células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs), para imunofenotipagem, e extração de DNA seguida de genotipagem dos polimorfismos rs2069762 e rs2069763 (*IL2*); rs7072793, rs3118470 e rs706778 (*IL2R α*). Dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. O sexo masculino e contagem baixa de células T CD4+ pré-tratamento (<500cels/ μ L) foram estatisticamente associados com o risco de falha imunológica ($p=0,03$ e $p=0,01$; respectivamente). Além disso, foi observada uma tendência estatisticamente significativa entre a contagem de células T CD4+ e a falha imunológica ($X^2=21,14$; $p<0,001$). Comparados com o grupo controle, os indivíduos do grupo caso apresentaram menor porcentagem de linfócitos T CD4+ naive (CD4+/CD45RA+CD62L+) ($p=0,044$) e de células T CD4+ recém emigradas do timo (CD4+CD31+) ($p<0,001$), evidenciando uma maior produção tímica nos pacientes do grupo controle. Essas variáveis mostraram-se afetar a produção e proliferação das células T CD4+, influenciando assim, na resposta imune dos indivíduos HIV-positivos em ART.

Palavras-chave: Falha imunológica. Produção tímica. HIV-1. AIDS.

ABSTRACT

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is consequence of an infection by the Human Immunodeficiency Virus (HIV), which progressively destroys CD4+ T cells. The current antiretroviral therapy (ART) aims at suppressing the viral replication, preventing the disease progression and AIDS-related deaths. Despite the efficiency of anti-HIV therapy, some patients present impaired CD4+ T-cells recovery, even with the viral suppression, characterizing the immunological failure. There are several factors involved in immunological failure, mainly related to CD4+ T-cells production and proliferation. Thus, the present study aims (1) to investigate the influence of *IL2* and *IL2R α* polymorphisms on immune recovery in HIV-positive patients under ART and (2) to assess the CD4+ T lymphocytes production in these individuals. 248 HIV-patients (107 males and 141 females) at treatment that showed complete viral suppression (<50copies/mL) were enrolled, being 122 included in case group (immunological failure) and 126 in control group (immunological success). Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation for immunophenotype, and DNA extraction followed by genotyping of rs2069762 and rs2069763 (*IL2*); and rs7072793, rs3118470 and rs706778 (*IL2R α*) polymorphisms were performed. Sociodemographic and clinical data were evaluated from medical records. Male sex and low pre-treatment CD4+ T-cell count (<500cells/ μ L) were statistically associated with risk of immunological failure ($p=0.03$ and $p=0.01$; respectively). Furthermore, we observed a statistically significant trend between CD4+ T-cell count and immunological failure ($X^2=21.14$; $p<0.001$). Comparing with the control group, individuals in the case group showed smaller percentage of naïve CD4+ T-cell (CD4+/CD45RA+CD62L+) ($p=0.044$) and recent thymic immigrants CD4+ T-cell (CD4+CD31+) ($p<0.001$), demonstrating a higher thymic production in the individuals of control group. These variables could affect the CD4 T-cells production and proliferation influencing the immune response of HIV-infected individuals receiving ART.

Key-words: Immunological failure. Thymic production. HIV-1. AIDS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estimativa mundial de pessoas vivendo com HIV.	19
Figura 2 – Árvore filogenética das linhagens virais SIV e HIV-1.....	21
Figura 3 – Estrutura morfológica do HIV-1.	22
Figura 4 – Organização genômica do HIV-1.....	23
Figura 5 – Ciclo viral do HIV-1.....	24
Figura 6 – Curso clínico natural da infecção pelo HIV-1.....	27
Figura 7 – As principais classes de antirretrovirais e as etapas do ciclo viral que são bloqueadas pelas drogas.	29
Figura 8 – Recuperação média de células T CD4+ sob ART.	32
Figura 9 – Regulação da expressão de IL-2R.	36
Figura 10 – Ligação da IL-2 e vias de sinalização do IL-2R.	37
Figura 11 – Localização cromossômica do gene <i>IL2</i> e seus transcritos variantes. ...	40
Figura 12 – Localização cromossômica do gene <i>IL2Rα</i> e seus transcritos variantes.	40
Figura 13 – Localização dos sítios de ligação e seus correspondentes fatores de transcrição do gene <i>IL2</i>	41
Figura 14 – Os elementos regulatórios e seus correspondentes fatores de transcrição identificados no gene <i>IL2Rα</i>	43
Figura 15 – Polimorfismos do gene <i>IL2</i>	44
Figura 16 – Ilustração esquemática do gene <i>IL2Rα</i> mostrando a posição dos Tag SNPs rs7072793 (C>T), rs311470 (T>C) e o rs706778 (T>C).	45
Figura 17 – Padrões de bandas de DNA gerados pela enzima de restrição Bfal para o polimorfismo rs2069762 (-330 T>G).	48
Figura 18 – Padrões de bandas de DNA gerados pela enzima de restrição MwoI para o polimorfismo rs2069763 (+114 G>T).	49
Figura 19 – Comparação da contagem de células T CD4+ pré-tratamento entre os grupos.	54
Figura 20 – Ilustração esquemática da formação de haplótipos entre os SNPs dos locos <i>IL2</i> e <i>IL2Rα</i>	57
Figura 21 – Produção de linfócitos T CD4+ em relação a expressão do CD31+ (A) e dos marcadores CD45RA+ e CD62L+ (B) nos grupos de sucesso (controle) e falha (caso) imunológica.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis epidemiológicas de HIV/AIDS no Brasil e suas respectivas regiões desde 1980 a 2017.....	19
Tabela 2 – Classificação das interleucinas humanas. Algumas características estruturais que foram usadas para classificação estão listadas na coluna da direita.	34
Tabela 3 – Padrões de bandas da genotipagem dos polimorfismos do gene <i>IL2</i>	48
Tabela 4 – Dados sociodemográficas da população de estudo.....	52
Tabela 5 – Testes de associação com as variáveis clínicas (teste Exato de Fisher, exceto para peso, idade e tempo de início da terapia).....	53
Tabela 6 – Testes de associação com as coinfeções ao longo da terapia (teste Exato de Fisher).	53
Tabela 7 – Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do gene <i>IL2</i> nos grupos estudados e teste de associação com ocorrência de falha imunológica à ART nos indivíduos HIV-positivos.	55
Tabela 8 – Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do gene <i>IL2Rα</i> nos grupos estudados e teste de associação com ocorrência de falha imunológica à ART nos indivíduos HIV-positivos.	56
Tabela 9 – Variáveis incluídas no modelo de regressão logística para explicar a ocorrência de falha imunológica.....	58
Tabela 10 – Testes univariados para os fatores de confusão da análise de produção tímica dos pacientes HIV-positivos em ART.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	- <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AKT	- <i>Alpha serine/threonine-protein kinase</i>
APC	- <i>Antigen-presenting cell</i>
AZT	- <i>Azidotimidina (Zidovudina)</i>
ART	- <i>Antiretroviral therapy</i>
CCR5	- <i>Chemokine (C-C Motif) Receptor 5</i>
CDC	- <i>Center for Disease Control</i>
CMV	- <i>Citomegalovírus</i>
CRF	- <i>Circulating Recombinant Forms</i>
CXCR4	- <i>Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4</i>
HAART	- <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV-1	- <i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i>
HIV-2	- <i>Human Immunodeficiency Virus type 2</i>
IIQ	- <i>Intervalo Interquartis</i>
IF	- <i>Inibidor de Fusão</i>
INI	- <i>Inibidor de Integrase</i>
INNTR	- <i>Inibidor Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa</i>
INTR	- <i>Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa</i>
IP	- <i>Inibidor de Protease</i>
JAK	- <i>Janus Kinase</i>
MAPK	- <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PBMC	- <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PI3K	- <i>Phosphoinositide 3- Kinase</i>
PVHA	- <i>Pessoas que vivem com HIV/AIDS</i>
SGR	- <i>Second Generation Recombinants</i>
SIV	- <i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
STAT	- <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCGF	- <i>T-cell growth factor</i>
UNAIDS	- <i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
URF	- <i>Unique Recombinant Forms</i>
VDLR	- <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2 Objetivos Específicos	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)	17
2.1.1 Histórico.....	17
2.1.2 Epidemiologia.....	18
2.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1).....	19
2.2.1 Características gerais	19
2.2.2 Biologia do HIV-1.....	21
2.2.3 Patogênese da infecção pelo HIV-1	25
2.3 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (ART).....	27
2.3.1 Antirretrovirais e a ART	27
2.3.2 Respostas à ART	30
2.4 INTERLEUCINA-2 E SEU RECEPTOR IL-2RA	32
2.4.1 Interleucinas: origem, função e classificação	32
2.4.2 Biologia da Interleucina-2.....	34
2.4.3 Relação IL-2 e HIV/AIDS.....	38
2.4.4 Os genes <i>IL2</i> e <i>IL2Rα</i>	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 DESENHO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	46
3.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES.....	46
3.3 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS	46
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA	47
3.5 GENOTIPAGEM.....	47
3.6 ISOLAMENTO DE PBMC.....	49
3.7 IMUNOFENOTIPAGEM	50
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
4 RESULTADOS	52
4.1 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS	52
4.2 VARIÁVEIS GENÉTICAS.....	54

4.2.1 Polimorfismos do gene <i>IL2</i>.....	54
4.2.2 Polimorfismos do gene <i>IL2Rα</i> (CD25)	55
4.2.3 Haplótipos dos genes <i>IL2</i> e <i>IL2Rα</i>	57
4.3 ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA.....	57
4.4 PRODUÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+.....	59
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	80
ANEXO B – QUESTIONÁRIOS E FORMULÁRIOS DE ACOMPANHAMENTO.....	83
ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP.....	88
ANEXO D – CURRICULUM VITAE (LATTES).....	89

1 INTRODUÇÃO

Desde a identificação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em 1981 e a descoberta do seu agente causador, o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em 1983, estima-se que existam aproximadamente 37 milhões de pessoas infectadas pelo vírus ao redor do mundo. Essa doença é caracterizada pela destruição progressiva das células T CD4+, ocasionando nos indivíduos um quadro severo de deficiência imune e tornando-os mais susceptíveis a doenças oportunistas e morte.

Com o crescente número de pessoas vivendo com HIV/AIDS, que se tornou um problema mundial de saúde, houve intensa pesquisa da comunidade científica mundial para a descoberta de antirretrovirais. A terapia anti-HIV consiste em combater a replicação viral por meio de drogas antirretrovirais usadas em combinações, constituindo a Terapia Antirretroviral (ART, na sigla em inglês). Apesar do tratamento ter se mostrado eficiente, aproximadamente 30% dos indivíduos que iniciam ART apresentam deficiência na recuperação de células T CD4+, mesmo com a supressão viral a níveis indetectáveis, o que caracteriza a falha imunológica à terapia anti-HIV.

A recuperação deficiente de linfócitos T CD4+ pode ser determinada por dois principais mecanismos: produção insuficiente ou destruição excessiva das células T CD4+. Sendo a produção tímica dos linfócitos T CD4+ um fator determinante para recuperação imunológica dos pacientes HIV-positivos em ART. Além disso, existem outros diversos fatores que podem levar à falha imunológica, dentre eles, alterações genéticas, especialmente em genes codificadores de citocinas e seus receptores envolvidos nas respostas imune, como a interleucina-2 e seu receptor IL-2R α (CD25). Por estimular o crescimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação dos linfócitos T, a interleucina-2 e seu receptor CD25 desempenham importantes funções nas respostas imunológicas a patógenos, além de estimularem a ativação do sistema imune adaptativo do organismo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação de polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2R α* com a recuperação imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral e analisar a produção dos linfócitos T CD4 nesses indivíduos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar as variáveis sociodemográficas e clínicas e suas influências com a recuperação imunológica dos pacientes HIV-positivos em terapia antirretroviral;
- Verificar a associação entre as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2R α* obtidas com a reconstituição imunológica em pacientes HIV-positivos em ART;
- Investigar a formação de haplótipos entre os polimorfismos do gene *IL2* e do gene *IL2R α* e suas possíveis associações com a falha imunológica;
- Analisar fenotipicamente a produção dos linfócitos T CD4 por citometria de fluxo, verificando a possível associação com a falha imunológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

2.1.1 Histórico

No início da epidemia, começo da década de 80, não se sabia como as pessoas teriam adquirido HIV ou desenvolvido AIDS. O vírus ainda era desconhecido e a transmissão não era acompanhada por sinais ou sintomas perceptíveis. Porém, o vírus já tinha se espalhado por todo território mundial e milhares de pessoas já haviam sido infectadas. Nesse período, os primeiros casos teriam ocorrido no Brasil (MANN; CHIN, 1988).

Em 1981, surgiram alguns casos de uma rara infecção pulmonar causada por um fungo chamado *Pneumocystis carinii*, que acometeu cinco jovens homens homossexuais, previamente saudáveis, em Los Angeles. No mesmo ano, foram reportados casos da mesma infecção pulmonar em usuários de drogas injetáveis, mas que não apresentavam histórico de sexo homossexual. Desde então, foram surgindo casos de infecções oportunistas em indivíduos homossexuais, usuários de drogas injetáveis, hemofílicos e profissionais do sexo. Essas infecções indicavam uma deficiência do sistema imune dessas pessoas. Com esses acontecimentos, foi sugerida a hipótese que o agente causador, até então desconhecido, era transmitido por contato sexual, sangue ou materiais contaminados por fluidos corporais (CDC, 1981; HYMES, 1981; MASUR, 1981).

No final de 1982, o *Center for Disease Control* (CDC) dos Estados Unidos nomeou essa nova doença de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, sigla em inglês), e a partir de então a comunidade científica voltou suas pesquisas para elucidar as muitas dúvidas sobre a doença. Enquanto isso, o número de casos de AIDS no mundo já chegava a 1200, e o CDC publicava que a AIDS era de fato transmissível por um agente infeccioso (ainda desconhecido) que debilitava o sistema imune lentamente, e, portanto, só após algum tempo no organismo, o indivíduo desenvolvia a AIDS (CDC, 1982, 1983).

O agente causador da AIDS, o vírus da imunodeficiência humana (HIV, sigla em inglês) só veio ser descrito em meados de 1983, quando foi primeiramente isolado a partir de células linfocitárias de pacientes com quadro de deficiência na resposta

imune e apresentando doenças oportunistas severas, principais sintomas da AIDS (BARRÉ-SINOUSI et al., 1983; GALLO et al., 1983).

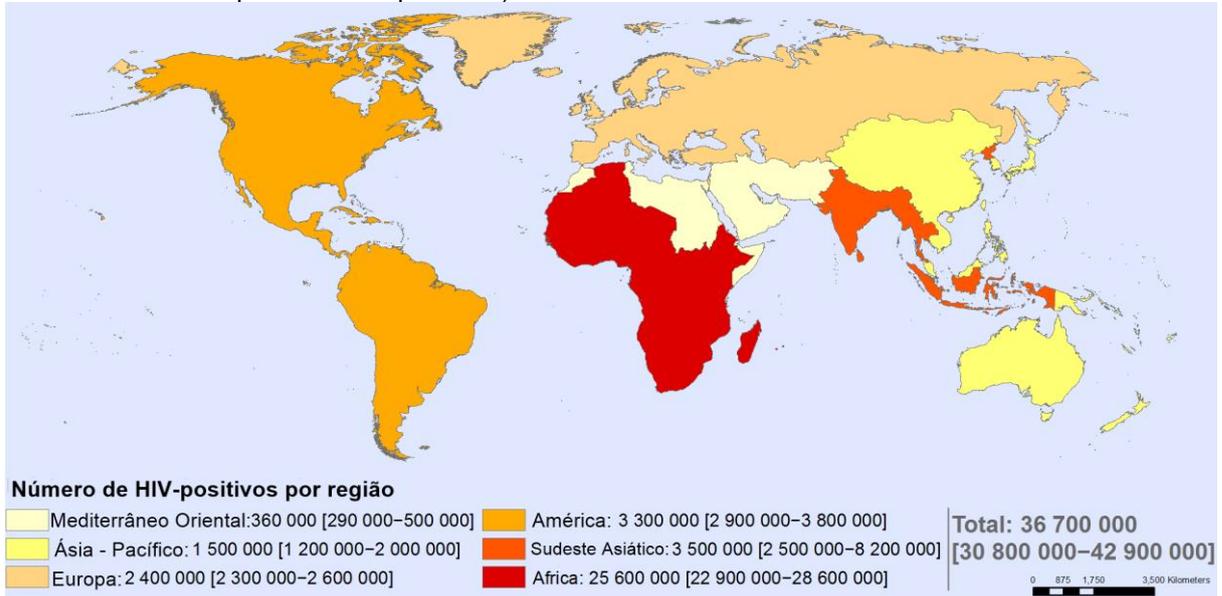
Estudos evidenciaram um tipo de chimpanzé da África Central como sendo a fonte da infecção do HIV em humanos. Acredita-se que o vírus que infecta os chimpanzés, chamado de vírus da imunodeficiência símia (SIV), foi provavelmente transmitido para humanos por meio de contato de fluidos do chimpanzé com sangue humano durante processos de caça, captura e tratamento da carne desses primatas. Dessa forma, O SIV sofreu mutações, gerando novas linhagens do vírus por meio de seleção natural, passando a infectar humanos com mais eficiência e sendo nomeado assim como HIV. Estudos mostram que isso possa ter acontecido do final do século XIX para o início do século XX, e com o passar das décadas o vírus lentamente se espalhou por toda a África e mais tarde para outras partes do mundo (HEMELAAR, 2012; SHARP; HAHN, 2011).

2.1.2 Epidemiologia

A infecção pelo HIV, ao longo dos anos, tornou-se uma pandemia, e continua sendo um grave problema de saúde pública mundial. Estima-se que existam aproximadamente 37 milhões de pessoas vivendo com o HIV ao redor do mundo (Figura 1), e cerca de 35 milhões já morreram por causas relacionadas à AIDS desde que a epidemia começou. De acordo com o relatório anual do Programa das Nações Unidas para HIV/AIDS (UNAIDS), 1,8 milhões de novas infecções e um milhão de óbitos foram registrados em 2016 no mundo todo (UNAIDS, 2017a; WHO, 2017a).

Desse total de pessoas infectadas pelo HIV, 1,8 milhões vivem na América Latina. Com aproximadamente 880 mil casos, o Brasil abriga quase metade dos indivíduos latino-americanos infectados com HIV, sendo registrados desde o início da epidemia cerca de 575 mil (65%) casos de AIDS em homens e 305 mil (35%) em mulheres. Além disso, já foram identificados no Brasil mais de 300 mil óbitos tendo como causa básica a AIDS. Em relação às regiões do país, Sudeste (52,3%) e Sul (20,1%) possuem a maior proporção de casos registrados do que as regiões Nordeste (15,5%), Norte (6,1%) e Centro-Oeste (6,0%) conforme mostra a Tabela 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; UNAIDS, 2017a; WHO, 2017a).

Figura 1 – Estimativa mundial de pessoas vivendo com HIV. Atualmente cerca de 37 milhões de adultos e crianças estão infectadas com o vírus. A prevalência do HIV continua sendo mais alta nos países da África Oriental e Meridional, com mais de 25 milhões dos habitantes infectados (quase 70% do total mundial de pessoas HIV-positivas).



Fonte: Adaptado de WHO (2017).

Entre os estados nordestinos, Pernambuco possui o maior número de casos de AIDS registrados (31.955 casos), representando 23,4% do total. A cidade do Recife é a 8ª capital brasileira com a maior taxa de detecção de casos de AIDS, com 36,7 indivíduos infectados pelo HIV por cada 100 mil habitantes em 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Tabela 1 – Variáveis epidemiológicas de HIV/AIDS no Brasil e suas respectivas regiões desde 1980 a 2017.

Indicadores	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste	Brasil
Casos Notificados	54.190	136.290	461.988	177.327	53.006	882.801
Proporção dos casos (%)	6,1	15,5	52,3	20,1	6,0	100
Óbitos	14.749	41.065	188.340	55.681	16.250	316.085

Fonte: Ministério da Saúde (2017).

2.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1)

2.2.1 Características gerais

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um lentivírus pertencente à família Retroviridae, responsável por causar uma infecção crônica no hospedeiro que gradualmente prejudica o sistema imune do mesmo e, se não tratada, pode ser fatal (DOITSH; GREENE, 2016; HUTCHINSON, 2001).

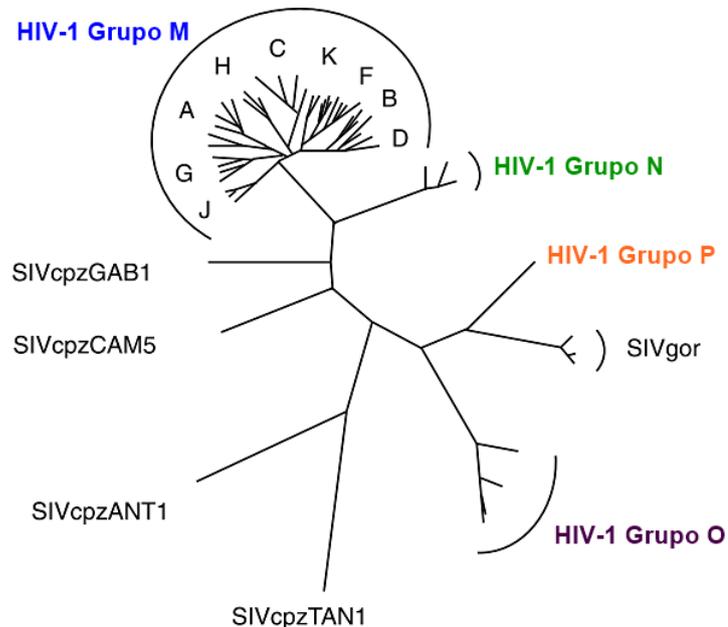
Com base nas sequências genéticas, existem atualmente dois tipos desse vírus responsáveis pela infecção em humanos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 está amplamente distribuído no território mundial, e é o responsável pela pandemia global (representando aproximadamente 95% das infecções mundiais). Já o HIV-2, pouco disseminado, causa uma forma da AIDS de progressão mais lenta, e é encontrado quase que exclusivamente na região da África Ocidental. Ambos foram derivados do vírus da imunodeficiência simia (SIV) presente em diversas espécies de primatas da África Ocidental e Central (JAFFAR et al., 2004; PEETERS; JUNG; AYOUBA, 2013; SHARP; HAHN, 2011).

O HIV-1, filogeneticamente, apresenta várias linhagens que são classificadas em quatro grupos: M, N, O e P. Essas linhagens apresentam diferentes distribuições geográficas de acordo com suas origens. O grupo M é responsável por aproximadamente 33 milhões de indivíduos infectados mundialmente, o grupo O causa alguns milhares de infecções na África Centro-Ocidental, e os grupos N e P têm sido encontrados em alguns indivíduos de Camarões (país da África Central). O grupo M parece ser a linhagem mais antiga do HIV-1 em humanos, e atualmente apresenta nove subtipos: A-D, F-H, J e K (Figura 2). Além disso, o HIV-1 apresenta recombinações entre esses diferentes grupos e subtipos: formas recombinantes circulantes (CRFs) e únicas (URFs), e as recombinantes de segunda geração (SGRs) (HEMELAAR, 2012; LIHANA et al., 2012; MOUREZ; SIMON; PLANTIER, 2013; SHARP; HAHN, 2011; VUILLEUMIER; BONHOEFFER, 2015).

Quanto ao tropismo, O HIV-1 pode ser classificado de acordo com o correceptor celular no qual a partícula viral se liga, em: HIV-1 de tropismo R5, pois infectam células do sistema imune que apresentam CCR5 na superfície celular, principalmente macrófagos; HIV-1 de tropismo X4, infectam células que apresentam CXCR4, principalmente linfócitos T CD4+; e o de tropismo duplo (R5/X4), que podem interagir com ambos os correceptores (CCR5 ou CXCR4) durante o processo de fusão celular na infecção do HIV-1. As cepas virais de tropismo R5 aparecem no início da infecção e são responsáveis pela transmissão do HIV-1, além disso, eles têm um impacto relativamente menos danoso no sistema imune do hospedeiro e predominam nos indivíduos infectados. Enquanto que as cepas de tropismo X4 aparecem tardiamente e tem sido associados com o declínio mais rápido das células T CD4+ e progressão à

AIDS (ALKHATIB, 2009; CARTER; EHRLICH, 2008; PESSÔA; SABINO; SANABANI, 2015; WILEN; TILTON; DOMS, 2012).

Figura 2 – Árvore filogenética das linhagens virais SIV e HIV-1. Em destaque estão as relações filogenéticas entre as linhagens SIVcpz, SIVgor e HIV-1 e evidenciando a diversidade dos tipos e subtipos do HIV-1.



Fonte: Adaptado de Hemelaar (2012).

Apenas certos fluidos corporais de uma pessoa infectada podem transmitir o HIV-1, tais como sangue, sêmen, fluídos vaginal e retal, e leite materno. Para que ocorra a transmissão, o indivíduo deve entrar em contato direto com esses fluidos por meio de regiões de mucosas, tecido lesado ou inoculação intravenosa ou cutânea. Com isso, o HIV-1 pode ser transmitido por relações sexuais sem proteção, transfusões sanguíneas, compartilhamentos de objetos cortantes ou perfurantes, e transmissão vertical (da mãe para o filho). De acordo com relatórios da UNAIDS, mais de 80% dos adultos infectados com HIV-1 tornam-se infectados devido à exposição das regiões de mucosa ao vírus (COHEN et al., 2013; HUTCHINSON, 2001; UNAIDS, 2016).

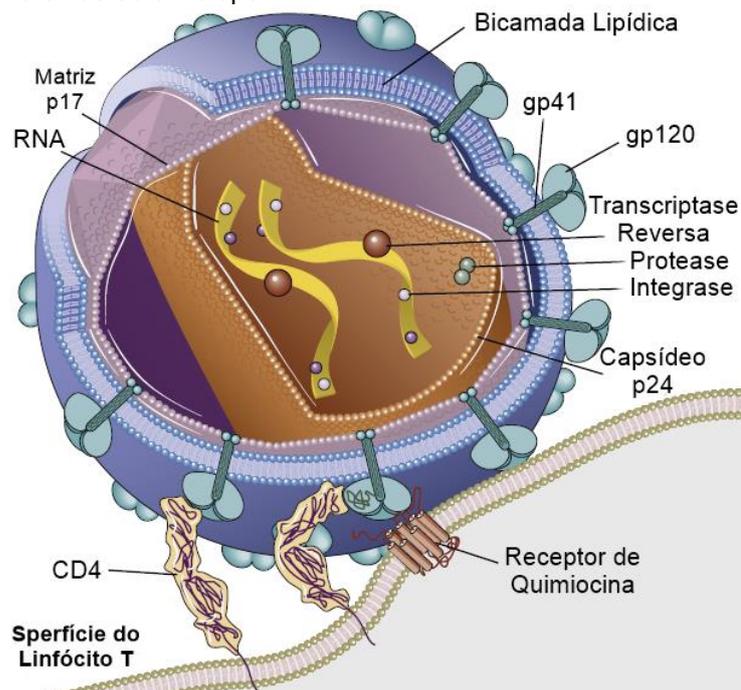
2.2.2 Biologia do HIV-1

2.2.2.1 Estrutura morfológica e genética

O HIV-1 apresenta uma forma esférica com aproximadamente 100 nm de diâmetro, que externamente possui um envelope constituído por uma bicamada lipídica de origem da célula hospedeira com inúmeros *spikes*, estruturas glicoproteicas

virais. Cada estrutura é composta por três moléculas de proteínas transmembrana (gp41), envolvidas na fusão de membranas; e três proteínas de superfície (gp120), que atuam no reconhecimento e ligação aos receptores celulares. Essas proteínas do envelope viral formam um trímero fortemente glicosilado de heterodímeros (Figura 3) (ARAÚJO; ALMEIDA, 2013; HUTCHINSON, 2001; WILEN; TILTON; DOMS, 2012).

Figura 3 – Estrutura morfológica do HIV-1. Em destaque um vírus próximo à superfície de uma célula T, mostrando seus respectivos componentes virais: duas fitas de RNA, as enzimas, o capsídeo, a matriz proteica, e as glicoproteínas do envelope.



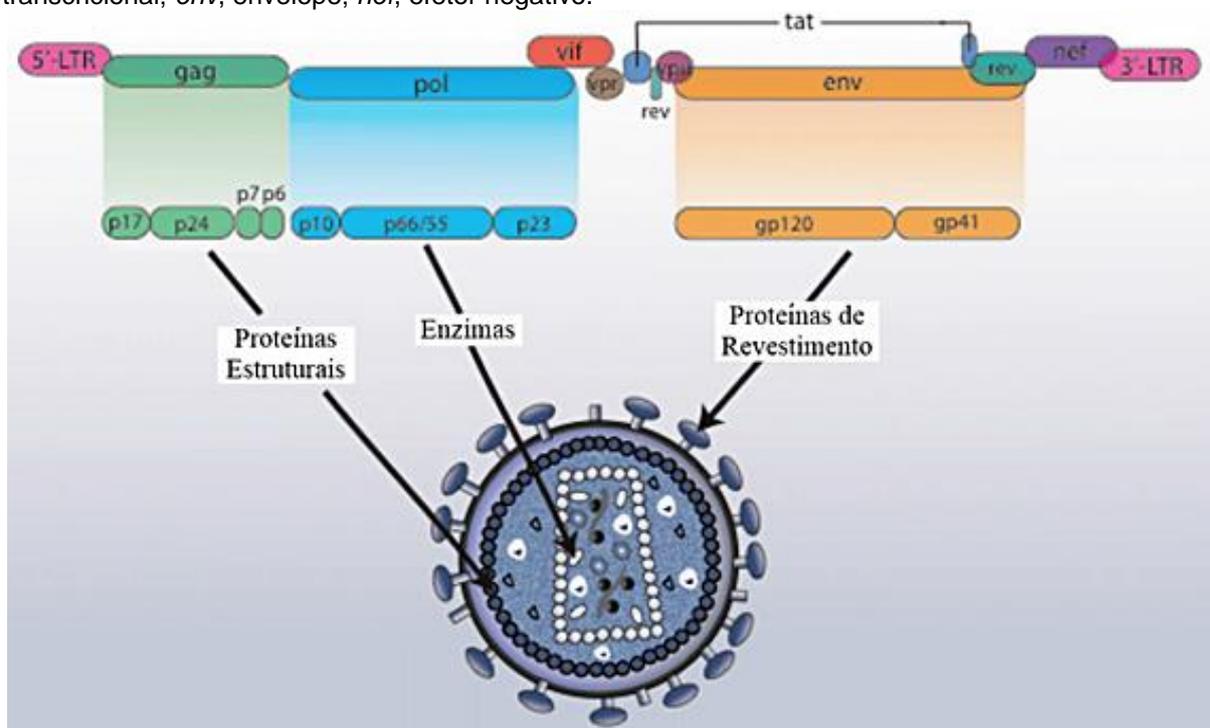
Fonte: Adaptado de Abbas et al. (2018).

Abaixo da membrana bilipídica encontram-se uma matriz estrutural, constituída pelas proteínas associadas (p17), e o capsídeo viral de formato cônico. Esse núcleo em forma de cone é composto por várias unidades da proteína p24, que abriga o genoma viral (duas fitas simples de RNA), integrases, proteases, e a transcriptase reversa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018a; BRIGGS; KRÄUSSLICH, 2011; FANALES-BELASIO et al., 2010).

O genoma viral do HIV-1 contém aproximadamente 9200 nucleotídeos, organizados em nove regiões gênicas que codificam 15 proteínas diferentes. Esses genes são delimitados por duas regiões terminais longas (5'LTR e 3'LTR), e classificados em duas classes principais de acordo com sua funcionalidade: Os genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) responsáveis pela codificação das proteínas estruturais, enzimas e proteínas do envelope, respectivamente; e os genes regulatórios (*vif*, *vpr*,

vpu, *nef*, *rev* e *tat*) responsáveis pela codificação das proteínas auxiliares e regulatórias, que atuam na replicação, transcrição, tradução, maturação e infectividade viral (Figura 4) (DONNELLY; CIBOROWSKI, 2016; GOLDSTEIN, 2006; LI; DE CLERCQ, 2016; WATTS et al., 2009).

Figura 4 – Organização genômica do HIV-1. Os genes ao longo do genoma linear estão indicados por blocos de cores diferentes, agrupados de acordo com a categoria da proteína que será sintetizada. Bloco verde: genes codificadores das proteínas estruturais; bloco azul: genes codificadores das enzimas; bloco laranja: genes codificadores das proteínas de revestimento. Os blocos menores, de outras cores, representam os genes codificadores das proteínas regulatórias e auxiliares. *LTR*, repetição terminal longa; *gag*, antígeno específico de grupo; *pol*, polimerase; *vif*, fator de infectividade viral; *vpr*, proteína viral R; *rev*, regulador de expressão de genes virais; *vpu*, proteína viral U; *tat*, ativador transcricional; *env*, envelope; *nef*, efector negativo.



Fonte: Adaptado de Donnelly e Ciborowski (2016).

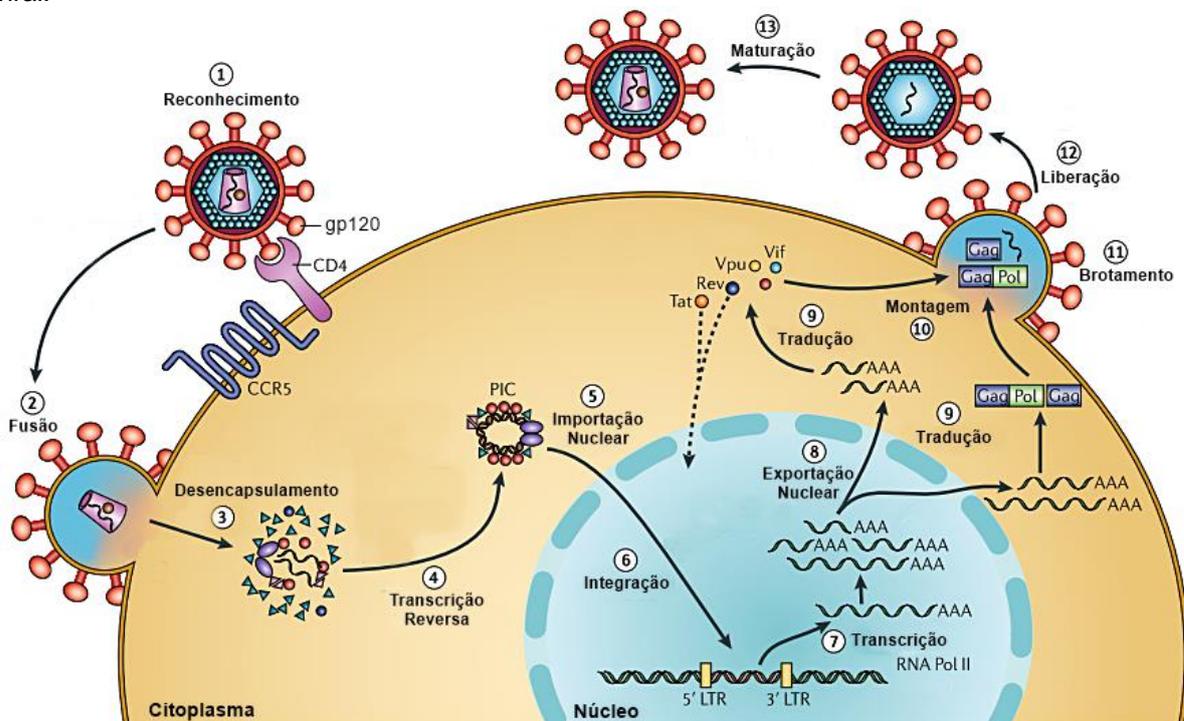
2.2.2.2 Ciclo de replicação do HIV-1

O HIV-1 infecta células que expressam em sua superfície celular o receptor CD4, sendo os linfócitos T CD4+ as principais células-alvo do vírus no organismo, além de ser capaz de infectar também outros tipos celulares, tais como macrófagos e células dendríticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018a; FANALES-BELASIO et al., 2010; HUTCHINSON, 2001).

A infecção pelo HIV-1 nas células-alvo inicia quando a glicoproteína do envelope viral gp120 se liga primeiramente aos receptores de superfície (CD4), para reconhecimento celular, e em seguida aos receptores de quimiocinas CCR5 ou

CXCR4, que atuam como correceptores para fusão do HIV-1 à célula. Após esta ligação, a glicoproteína viral gp41 sofre uma mudança conformacional, que permite a fusão da membrana viral com a membrana da célula-alvo. Com isso, o capsídeo é liberado dentro do citoplasma celular para posteriores etapas do ciclo viral (Figura 5). Vários estudos sugerem que a entrada do HIV-1 na célula-alvo também pode ocorrer por via de endocitose (BLUMENTHAL; DURELL; VIARD, 2012; BRANDENBERG et al., 2015; DUMAS; PREIRA; SALOME, 2014; WILEN; TILTON; DOMS, 2012).

Figura 5 – Ciclo viral do HIV-1. Em destaque os passos sequenciais do ciclo de replicação do HIV-1, mostrando desde a infecção inicial em uma célula hospedeira até a liberação de uma nova partícula viral.



Fonte: Adaptado de Engelman e Cheperanov (2012).

Uma vez no interior da célula-alvo, o capsídeo é desencapsulado, liberando o material genético viral e tornando as enzimas do complexo núcleo-capsídeo ativas. O RNA genômico do HIV-1 é então convertido, por meio da transcriptase reversa, em uma fita dupla de DNA (chamado de DNA complementar, cDNA) que é transportada para o núcleo celular através da formação do complexo de pré-integração (PIC). Com auxílio da integrase viral, o cDNA é então inserido no genoma celular hospedeiro. O DNA viral integrado é agora chamado de provírus (ou DNA proviral) e pode permanecer inativo por meses ou anos no hospedeiro, e assim, a infecção do HIV na célula do indivíduo torna-se latente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018a; DUMAS; PREIRA; SALOME, 2014; ENGELMAN; CHEREPANOV, 2012; LIU et al., 2015).

No núcleo, o genoma proviral, integrado ao material genético da célula infectada, inicia a fase de transcrição e processamento do DNA viral. Os transcritos, por sua vez, irão originar o RNA genômico e as proteínas virais. A transcrição dos genes do HIV-1 nas células infectadas inicia-se por meio da ativação dessas células por citocinas. Sendo assim, após a transcrição do genoma proviral no núcleo, os RNAs transcritos (processados por *splicings* alternativos e também os não processados) do HIV-1 são transportados para o citoplasma onde formarão o genoma viral e servirão de instrução para a tradução das proteínas regulatórias, estruturais e as enzimas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018a; ENGELMAN; CHEREPANOV, 2012; LI; DE CLERCQ, 2016).

Por fim, ocorrem as etapas de montagem e brotamento das partículas virais. Na montagem, o capsídeo é reestabelecido em torno do genoma viral e das enzimas, e direcionado para a periferia celular. Em seguida, durante e após o brotamento, o capsídeo adquire o envelope a partir da membrana celular do hospedeiro, e as partículas virais liberadas passam por maturação (promovida pela protease viral) e modificação morfológica em que o vírion torna-se infeccioso (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018a; DEEKS et al., 2016; ENGELMAN; CHEREPANOV, 2012; FANALES-BELASIO et al., 2010).

2.2.3 Patogênese da infecção pelo HIV-1

A infecção pelo HIV-1 deprime o sistema imunológico do hospedeiro à medida que o vírus infecta e destrói os linfócitos T CD4+ (os quais coordenam a resposta imune) por induzir vias de morte celular tanto das células infectadas quanto das saudáveis. Isso ocorre devido a liberação de sinais inflamatórios pelas células mortas, que recrutam mais células para o local de inflamação, e conseqüentemente gerando mais morte celular. Esse mecanismo da infecção pelo HIV-1 cria um ciclo vicioso, que por fim causa no indivíduo a depleção das células T CD4+ e uma inflamação crônica nos órgãos linfoides. As manifestações clínicas da infecção no indivíduo variam desde um estado assintomático até o desenvolvimento de doenças oportunistas graves e potencialmente letais (COHEN et al., 2013; DOITSH; GREENE, 2016; STEVENSON, 2003).

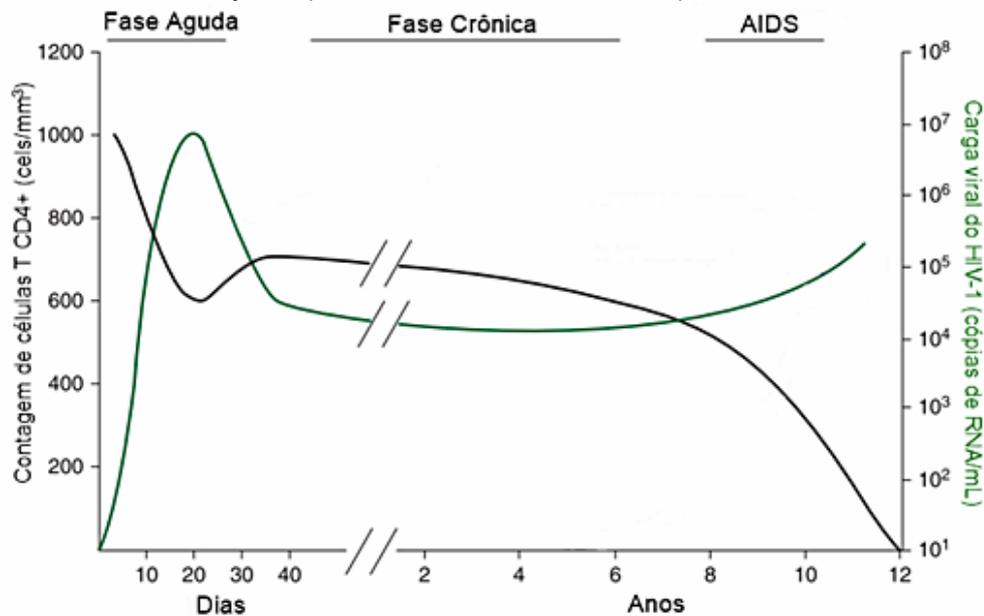
Os primeiros sinais da resposta imune à infecção pelo HIV-1 ocorrem na fase aguda. O vírus geralmente entra no organismo através da mucosa epitelial genital ou

retal, e durante os primeiros dias do contato com o HIV-1, as células infectadas são imunologicamente ativadas (principalmente macrófagos presentes nas mucosas) e migram para tecidos linfoides, onde por meio do contato direto intercelular a disseminação viral é favorecida. A fase aguda caracteriza-se por uma alta viremia (carga viral circulante no plasma), uma vez que a resposta imune adaptativa ainda não foi desenvolvida, aumentando assim o potencial infeccioso do indivíduo. Nas primeiras semanas (ou meses) após a exposição ao HIV-1, alguns indivíduos podem apresentar febre e mal-estar (CARTER; EHRLICH, 2008; COHEN et al., 2013; FRASER et al., 2014).

A fase crônica da infecção ocorre logo após a fase aguda, quando o sistema imune do hospedeiro começa a gerar resposta adaptativa contra o vírus. Esta fase é marcada pela forte interação entre as células de defesa e as constantes e rápidas mutações do HIV-1, mas que não enfraquece o organismo o suficiente para permitir novas doenças. Consequentemente, a viremia é estabilizada, pois as partículas virais amadurem e morrem de forma equilibrada. Porém, o HIV-1 apresenta mecanismos de escape da resposta imune, permitindo que entre em latência nas células infectadas e forme os reservatórios virais. Esse período pode durar anos, causando uma doença crônica e assintomática (Figura 6) (CORY; SCHACKER, 2013; LIU et al., 2015; MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014; NAIF, 2013; SALEMI; RIFE, 2016; SWANSTROM; COFFIN, 2012).

Com isso, em média 10 anos após a exposição pelo HIV-1, os indivíduos infectados e não tratados apresentam elevada carga viral plasmática e níveis de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 cels/mm³, caracterizando o estágio clínico de AIDS. AIDS é a fase final de uma doença progressiva e patogênica que causa uma profunda deficiência imunológica, tornando os indivíduos susceptíveis a infecções oportunistas e neoplasias. Nesse momento, na ausência de tratamento antirretroviral, o indivíduo tem grande risco de vir a óbito (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014; MANZARDO et al., 2015; NAIF, 2013; SWANSTROM; COFFIN, 2012).

Figura 6 – Curso clínico natural da infecção pelo HIV-1. Durante a fase aguda da infecção existe uma perda inicial de células T CD4+ seguida de uma recuperação parcial, e em seguida um decaimento lento durante o período de latência clínica (fase crônica) (linha preta). Enquanto isso, a viremia na fase aguda é alta e quando a resposta imune adaptativa ao HIV-1 é estabelecida, há uma queda na produção viral (linha verde), entrando na infecção crônica. Com a destruição progressiva das células T CD4+, o HIV-1 se replica de forma descontrolada e a imunodeficiência (fase de AIDS) é estabelecida, aumentando o risco de infecções oportunistas e, sem tratamento, podendo levar a óbito.



Fonte: Adaptado de Swanstrom e Coffin (2012).

2.3 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (ART)

2.3.1 Antirretrovirais e a ART

Com a descoberta do HIV-1 e o crescente número de pessoas vivendo com HIV/AIDS, houve intensa pesquisa da comunidade científica mundial para a descoberta de remédios antirretrovirais. O desenvolvimento desses medicamentos anti-HIV surgiu ainda na década de 1980, com o objetivo de impedir a multiplicação do vírus no indivíduo infectado. A azidotimidina (AZT) ou zidovudina (ZVD) foi o primeiro antirretroviral aprovado para o tratamento da infecção pelo HIV-1, e foi lançado em 1987 (DE CLERCQ; LI, 2016; PAU; GEORGE, 2014; TSENG; SEET; PHILLIPS, 2014).

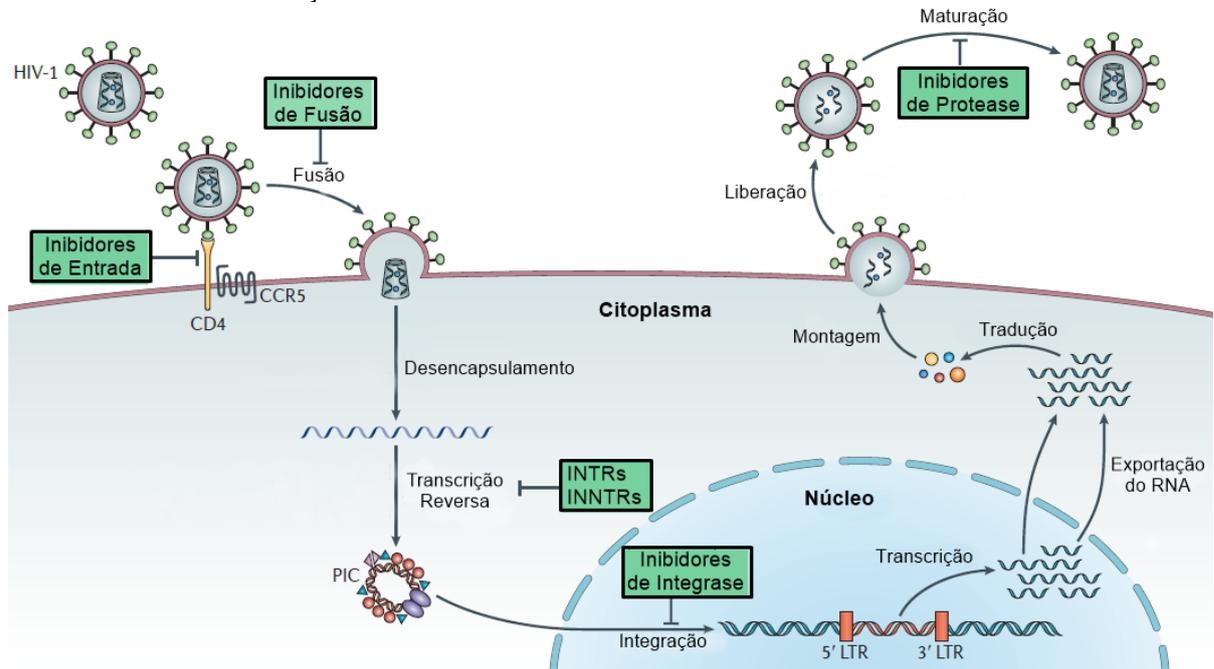
Os antirretrovirais são fármacos usados no tratamento de infecções retrovirais, principalmente o HIV-1. Essas drogas não eliminam completamente o vírus, que permanece em latência proviral nas células infectadas, mas ajudam a evitar o enfraquecimento do sistema imunológico e aumentam o tempo e a qualidade de vida dos indivíduos vivendo com HIV/AIDS (ACETI et al., 2015; ASENSI; COLLAZOS;

VALLE-GARAY, 2015; TOZZI, 2010; TSENG; SEET; PHILLIPS, 2014; ZYL; BALE; KEARNEY, 2018).

Atualmente, estão disponíveis no mercado 28 fármacos antirretrovirais, usadas geralmente em combinações de três drogas, constituindo a terapia antirretroviral (ART), conhecida também como HAART (do inglês, *Highly Active Antiretroviral Therapy*). Essa terapia é responsável pela melhoria do prognóstico dos pacientes, queda da carga viral e recuperação do sistema imune. Tais drogas podem ser divididas em seis classes de acordo com o seu modo de ação (Figura 7) (BARRÉ-SINOUSI; ROSS; DELFRAISSY, 2013; DE CLERCQ; LI, 2016; MICHAUD et al., 2012; PAU; GEORGE, 2014; TSENG; SEET; PHILLIPS, 2014; WOLFF et al., 2017):

- Inibidores de Entrada (IE): ligam-se ao correceptor CCR5 na célula, atuando como antagonista do CCR5 e bloqueando a entrada do vírus HIV-1 R5 nos linfócitos T CD4+ e macrófagos.
- Inibidores de Fusão (IF): Se ligam especificamente à proteína gp41 do HIV-1, impedindo o rearranjo estrutural da gp41, e assim, bloqueando a fusão do vírus na membrana celular hospedeira.
- Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR): são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos que atuam na enzima transcriptase reversa, interrompendo a síntese do material genético do vírus.
- Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INNTR): impedem a síntese do material genético do vírus por se ligarem a sítios alostéricos da transcriptase reversa, inibindo sua atividade.
- Inibidores de Integrase (INI): agem no bloqueio da atividade da enzima integrase responsável pela inserção do DNA viral ao DNA humano. Assim, inibe a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células.
- Inibidores de Protease (IP): interagem com a protease viral, impedindo o processamento correto das proteínas, abolindo a infectividade das partículas virais.

Figura 7 – As principais classes de antirretrovirais e as etapas do ciclo viral que são bloqueadas pelas drogas. PIC, complexo de pré-integração; CCR5, C-C receptor de quimiocinas tipo 5; *LTR*, repetição terminal longa; INTRs, Inibidores Nucleosídeos da Transcrição Reversa; INNTRs, Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcrição Reversa.



Fonte: Adaptado de Barre-Sinoussi et al. (2013).

O Brasil foi o primeiro país a distribuir os antirretrovirais gratuitamente para os portadores de HIV-1. Desde 1996, foi estabelecida a oferta universal ao tratamento antirretroviral, que permitiu reduzir a morbidade e mortalidade relacionada à infecção pelo HIV-1, e conseqüentemente, melhorou a qualidade de vida das pessoas que vivem com HIV/AIDS (PVHA) no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2015; WOLFF et al., 2017).

Atualmente, recomenda-se o início da terapia antirretroviral para todas as PVHA assim que são diagnosticadas com a infecção, independente da contagem de células T CD4+. Quando não possível, a terapia deve ser iniciada como prioridade em todos os indivíduos HIV-positivos com contagem de células T CD4+ <350 células/μL e que apresentarem o quadro clínico avançado da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) estabelecia até 2016 a primeira linha de antirretrovirais para terapia anti-HIV sendo uma combinação de dois INTR e um INNTR: Tenofovir (TDF) ou Zidovudina (AZT) + Lamivudina (3TC) + Efavirenz (EFZ) ou Nevirapina (NVP). Porém, com os avanços nos estudos com esses esquemas antirretrovirais e uma forma de minimizar a resistência viral que vinha sendo reportada, o atual esquema recomendado pela WHO consiste de dois INTR e um INI: TDF + 3TC

+ DTG (Dolutegravir); ou dois INTR e um INNTR, sendo: TDF + 3TC + EFZ400 (Efavirenz 400 mg). Esses novos esquemas terapêuticos têm sido associados com uma melhor tolerabilidade dos pacientes, maior eficácia antirretroviral, taxas mais baixas de descontinuação do tratamento, uma maior barreira genética à resistência e menos interações medicamentosas. Já na segunda linha de esquemas, geralmente utilizada em caso de falha a primeira, o INNTR podia ser substituído por um Inibidor de Protease (IP) com ritonavir (r). Neste caso os antirretrovirais recomendados eram: Lopinavir (LPV) e o Atazanavir (ATV). Todavia, após as novas recomendações em 2016, esses antirretrovirais passaram a ser substituídos pelos: Darunavir/r (DRV/r, um IP/r) e o Raltegravir (RAL, um INI). Essas são algumas das diretrizes estabelecidas pela WHO que os países mundiais vem adotando no tratamento anti-HIV e atualizando ao longo do tempo (WHO, 2016, 2017b).

2.3.2 Respostas à ART

Com os avanços da terapia antirretroviral houve um aumento progressivo do sucesso na resposta terapêutica. Aproximadamente 80% dos pacientes atingem carga viral plasmática indetectável (<50 cópias/mL) após um ano de tratamento e mantêm a supressão viral ao longo do tempo, demonstrando assim a eficácia e importância da terapia anti-HIV (ACETI et al., 2015; GUIHOT; TUBIANA; BRETON, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; WHO, 2016; ZYL; BALE; KEARNEY, 2018).

Em 2014, o UNAIDS estabeleceu o objetivo dos “90-90-90”, que propõe até 2020 90% das pessoas vivendo com HIV serem diagnosticadas, 90% desses diagnosticados estarem em tratamento e 90% desses em terapia alcançarem o sucesso terapêutico, supressão da carga viral. Com essa estratégia, até 2030 o número de novas infecções pelo HIV-1 e mortes relacionadas à AIDS reduzirá em até 80% (HILL; POZNIAK, 2015; UNAIDS, 2017b, 2017c).

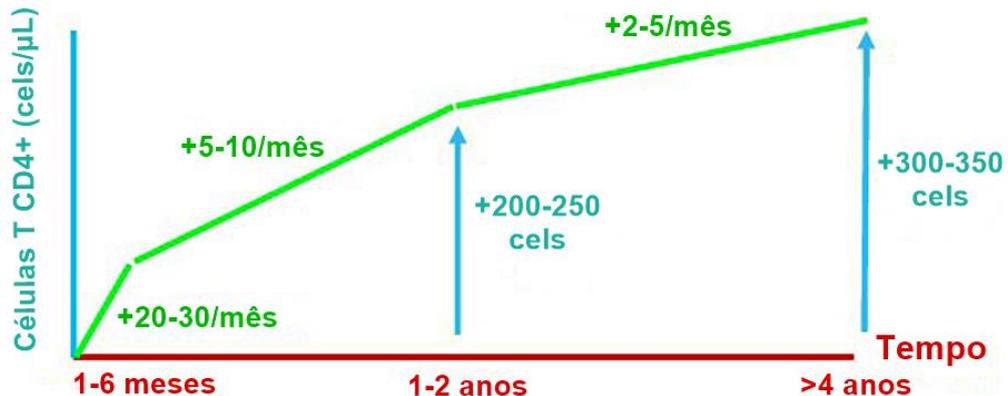
Contudo, apesar das taxas de sucesso terapêutico serem elevadas, muitos pacientes ainda apresentam falha da terapia anti-HIV e precisam de alterações em seus esquemas antirretrovirais, algumas vezes necessitando do “esquema de resgate” (esquema utilizado em casos de falha a primeira linha e segunda linha de antirretroviral). A falha terapêutica é consequência de inúmeros fatores, tais como baixa adesão ao tratamento, potência virológica insuficiente (esquemas subótimos), resistência viral e fatores farmacológicos (erros de prescrição, má absorção e/ou

eliminação acelerada dos antirretrovirais). Além disso, para caracterização da falha terapêutica, a falha virológica é o principal parâmetro, que é definida quando o indivíduo após um ano de tratamento não suprime a carga viral plasmática a níveis indetectáveis (ALDOUS; HAUBRICH, 2009; LEDERGERBER et al., 1999; LI et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; WHO, 2016).

Sendo assim, a ART visa suprimir a carga viral no organismo a níveis indetectáveis, diminuir as morbimortalidades associadas ao HIV-1 e a taxa de progressão da doença, diminuir as taxas de transmissão viral, e como uma consequência, espera-se que ocorra a reconstituição imunológica (recuperação dos níveis de linfócitos T CD4+). Esses aspectos são os que determinam o sucesso terapêutico. Porém, existem casos em que apesar da obtenção do sucesso terapêutico ao tratamento anti-HIV, o indivíduo apresenta deficiência na recuperação dos linfócitos T CD4+, caracterizando assim, a falha imunológica. Neste caso, considera-se que houve falha imunológica quando após um ano de tratamento o paciente apresenta uma baixa ou ausente reconstituição na contagem dos linfócitos T CD4+. Ou seja, quando o aumento dos níveis dessas células é inferior a 30%, sem significado clínico, ou apresenta um ganho de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/ μ L em relação à “*baseline*” (contagem de células T CD4+ pré-tratamento) (CORBEAU; REYNES, 2011; LI et al., 2011; MAHNKE et al., 2013; MANZARDO et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; TINCATI et al., 2018; TURNER; HECHT; ISMAIL, 1994).

Durante a terapia anti-HIV o ganho de células T CD4+ é crescente, mas gradual, apresentando um rápido ganho nos primeiros meses e tornando-se menos progressivo ao longo do tratamento. Nos primeiros seis meses sob ART a média de reconstituição imunológica dos indivíduos é de 20-30 cels/ μ L ao mês. Em seguida, esse aumento de células T CD4+ é cerca de 5-10 cels/ μ L ao mês até o segundo ano de terapia, e 2-5 cels/ μ L nos anos seguintes (Figura 8) (CORBEAU; REYNES, 2011; GUIHOT; TUBIANA; BRETON, 2010; LE MOING et al., 2002; SMITH et al., 2003).

Figura 8 – Recuperação média de células T CD4+ sob ART. O aumento na contagem de linfócitos T CD4+ está representando em vários pontos ao longo do tempo de terapia.



Fonte: Adaptado de Corbeau e Reynes (2011).

Aproximadamente 30% dos indivíduos que iniciam ART podem apresentar falha imunológica. Esta resposta está ligada ao início tardio do tratamento, idade avançada, coinfeções durante a terapia, ou ainda, fatores genéticos. Além disso, a recuperação deficiente de LT-CD4+ pode ser determinada por dois principais mecanismos: produção insuficiente ou destruição excessiva das células T CD4+. Neste último caso, pode ser por consequência de patogênese da infecção pelo HIV-1, ativação imunológica e/ou aumento, geneticamente determinado, da morte celular programada dos linfócitos (CORBEAU; REYNES, 2011; FESSEL et al., 2000; LIMA et al., 2007; MAHNKE et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; PINZONE et al., 2012).

2.4 INTERLEUCINA-2 E SEU RECEPTOR IL-2R α

2.4.1 Interleucinas: origem, função e classificação

As primeiras interleucinas foram identificadas no início da década de 1970. Porém, o termo “interleucina” só foi introduzido em 1979 para descrever e caracterizar um grupo de moléculas que eram produzidas por leucócitos e que atuavam primariamente em outros leucócitos. Por esta razão o termo “interleucina” que significa “entre leucócitos”. Além disso, foi uma forma de substituir os diferentes nomes usados por diferentes grupos de pesquisa para designar as primeiras interleucinas, e desde então se tornou o termo padrão para essas moléculas (BROCKER et al., 2010; MIZEL; FARRAR, 1979; VAILLANT; QURIE, 2018).

Sendo assim, as interleucinas compõem um grupo de citocinas, proteínas secretadas e de sinalização celular, expressas essencialmente pelas células do

sistema imunológico, os leucócitos. São também conhecidas como “linfocinas” por serem, em sua grande maioria, sintetizadas e secretadas pelos linfócitos T CD4+, mas também são produzidas por monócitos, macrófagos e células dendríticas e endoteliais. As principais funções das interleucinas estão relacionadas com a ativação, crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Além disso, essas moléculas são importantes nas respostas inflamatórias do organismo a patógenos por regularem a imunidade inata, adquirida e estimularem a hematopoese (LEONARD, 2001; ROCHMAN; SPOLSKI; LEONARD, 2009; VAILLANT; QURIE, 2018).

Para que as interleucinas exerçam suas funções biológicas, é necessário sua ligação e ativação a estruturas proteicas presentes na superfície celular, os receptores. Esses receptores geralmente se ligam aos seus ligantes com alta afinidade e, como consequência, pequenas quantidades de uma interleucina são suficientes para ocupar os receptores e desencadear os efeitos biológicos. Cada interleucina atua sobre um grupo limitado e específico de células que expressam os receptores adequados para seus ligantes. Porém, algumas interleucinas podem interagir com receptores de outras, geralmente do mesmo grupo. Com isso, essas moléculas podem apresentar ações pleiotrópicas, agir em diferentes tipos celulares; redundantes, múltiplas interleucinas com mesmo efeitos funcionais; sinérgicas, produzir efeitos aditivos na célula; e antagonistas, interleucinas com efeitos opostos no mesmo tipo celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; SCHLUNS; LEFRANÇOIS, 2003; SPANGLER et al., 2015).

Existem já descritas na literatura mais de 45 interleucinas denominadas por IL-1 a IL-38, numeradas pela ordem de sua descoberta e algumas são divididas em subtipos de acordo com sua atividade. Essas proteínas tem peso molecular bastante diverso com polipeptídios variando de 10 a 60 kD, podendo apresentar estruturas moleculares na forma de monômero, dímero, homodímeros, heterodímeros e estruturas em hélices (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; AKDIS et al., 2011; BROCKER et al., 2010; VAILLANT; QURIE, 2018).

As interleucinas são classificadas atualmente em sete grupos de acordo com a arquitetura genômica e as características estruturais das proteínas: citocinas tipo IL-1; citocinas helicoidais de classe I, que inclui os grupos de interleucinas tipo IL-4, tipo IL6/12 e que utilizam a cadeia- γ ; citocinas helicoidais de classe II, inclui os grupos tipo

IL-10 e tipo IL-28; e as citocinas tipo IL-17. Além dessas, existe um número de interleucinas que também atuam como agentes imunomoduladores, mas que ainda não foram classificadas, sendo então denominadas como “citocinas não classificadas” (Tabela 2) (AKDIS et al., 2011; BROCKER et al., 2010; FIETTA; COSTA; DELSANTE, 2014, 2015; YUZHALLIN; KUTIKHIN, 2015).

Tabela 2 – Classificação das interleucinas humanas. Algumas características estruturais que foram usadas para classificação estão listadas na coluna da direita.

Grupo	Interleucinas	Características estruturais comuns
Tipo IL-1	IL1 α , IL1 β , IL1R α , IL18, IL33, IL36R α , IL36, IL37, IL36 β , IL36 γ , IL38	Dobramento de proteínas rico em cadeias- β
Utilização da cadeia- γ (cadeia-curta classe I)	IL2, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21	Quatro cadeias de α -hélices fortemente empacotadas; complexo de receptor contendo a subunidade de cadeia- γ
Tipo IL-4 (cadeia-curta classe I)	IL3, IL4, IL5, IL13, CSF2	Quatro cadeias de α -hélices fortemente empacotadas; hélices principais mais curtas
Tipo IL6/12 (cadeia-longa classe I)	IL6, IL11, IL12, IL23, IL27 (ou IL30), IL31, IL35, CLCF1, CNTF, CTF1, LIF, OSM, CSF3	Quatro cadeias de α -hélices fortemente empacotadas; hélices principais mais longas
Tipo IL-10 (classe II)	IL10, IL19, IL20, IL22, IL24, IL26	Dobramento em forma de hélice, contendo seis ou sete cadeias hélices empilhadas
Tipo IL-28 (classe II)	IL28A, IL28B, IL29	Dobramento em forma de hélice, contendo seis ou sete cadeias hélices empilhadas; estruturas homólogas com interferons tipo I
Tipo IL-17	IL17A, IL17B, IL17C, IL17D, IL25 (ou IL17E), IL17F	Dobramento em nó de cisteína tipo neurotrofina
Não classificadas	IL8, IL14, IL16, IL32, IL34, CSF1	Formas variadas

Fonte: Adaptado de Brocker et al. (2010).

2.4.2 Biologia da Interleucina-2

2.4.2.1 Estrutura, produção e função

A interleucina 2 (IL-2) foi descoberta em 1976 como uma molécula com atividade estimulatória que induzia o crescimento de linfócitos T derivados da medula óssea. Devida a essa característica ela foi primeiramente descrita como “fator de crescimento de células T (TCGF)”. Além disso, a IL-2 foi a primeira citocina a ser estudada e caracterizada em nível molecular (LIAO; LIN; LEONARD, 2013; MORGAN; RUSCETTI; GALLO, 1976; TANIGUCHI et al., 1983).

IL-2 é uma glicoproteína globular e monomérica, com peso molecular de 15,5 kD e estrutura proteica contendo quatro cadeias de α -hélices fortemente empacotadas, pertencendo assim à família de citocinas classe I (Tabela 2). Essa interleucina é produzida e secretada predominantemente por células T CD4+ ativadas, mas também, em menor escala, pelas células T CD8+, NK (*natural killers*), e células dendríticas (DCs) ativadas. A IL-2 apresenta função autócrina e parácrina, atuando nas próprias células que a produzem e em células adjacentes, respectivamente. Além disso, a IL-2 pode atuar sinergicamente nas células com outras interleucinas, e apresentar também funções de redundância e pleiotropismo. Por estimular o crescimento, proliferação e diferenciação dos linfócitos T em células T efetoras, auxiliares e de memória, a IL-2 é um importante fator de ativação do sistema imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018b; ARENAS-RAMIREZ; WOYTSCHAK; BOYMAN, 2015; GAFFEN; LIU, 2004; LIAO; LIN; LEONARD, 2011; READ et al., 2016).

A produção de IL-2, que é realizada principalmente pelos linfócitos T CD4+, ocorre logo após o reconhecimento de antígeno e proteínas coestimulatórias. A ativação das células T estimula a síntese e secreção dessa interleucina. Essa secreção ocorre em uma sinapse imunológica formada entre o linfócito T e a APC (célula apresentadora de antígeno), que apresenta as moléculas coestimulatórias para síntese da interleucina. Uma vez produzida e secretada, a IL-2 estimula a produção de seu receptor (IL-2R) para que sua função seja desencadeada, promovendo e controlando as respostas das células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018b; GAFFEN; LIU, 2004; MA; KOKA; BURKETT, 2006; MALEK; BAYER, 2004).

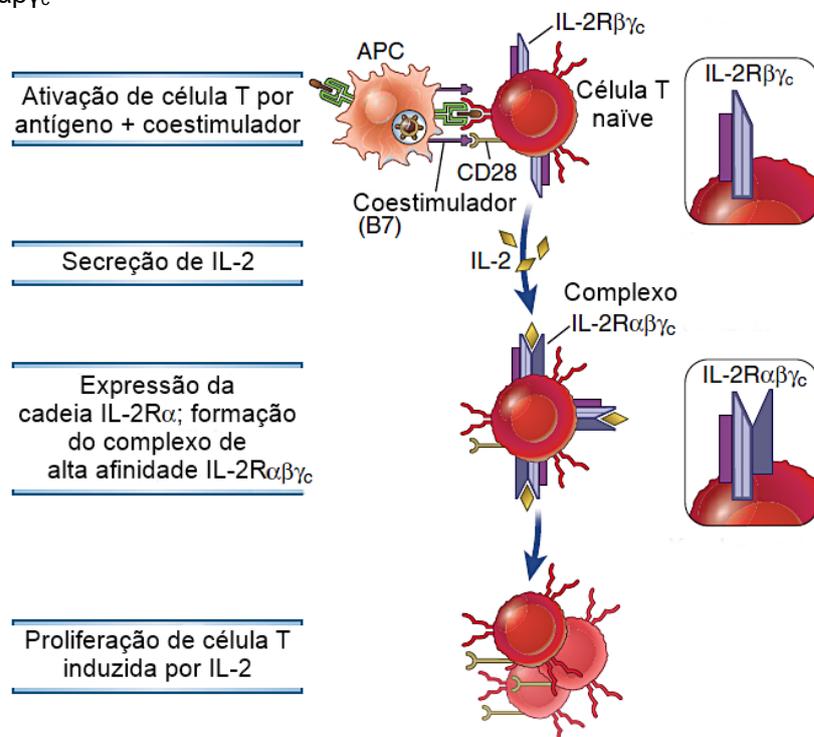
2.4.2.2 Sistema IL-2 e IL-2R α

O receptor da IL-2 é um complexo proteico de superfície celular que consiste de três subunidades: IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e γ c (CD132). A cadeia β também faz parte do receptor da IL-15, enquanto que a cadeia γ c é compartilhada por

vários receptores de interleucinas que constitui a família de citocinas de cadeia curta classe I (Tabela 2). Ambas as subunidades (CD122 e CD132) apresentam uma estrutura proteica de folha β , e juntas formam o receptor dimérico da IL-2, que apresenta baixa afinidade com a interleucina (ARENAS-RAMIREZ; WOYTSCIAK; BOYMAN, 2015; MALEK, 2008; ROCHMAN; SPOLSKI; LEONARD, 2009).

Das três subunidades do receptor, apenas a cadeia α é exclusiva para o IL-2R. A interação do CD25 com a IL-2 sozinha não induz a transdução de sinal, mas sua interação com as outras subunidades aumenta a afinidade do receptor com a interleucina-2 em aproximadamente 100 vezes. Apesar da capacidade reduzida em detectar a IL-2, o CD122 e o CD132 são necessários para que a sinalização ocorra. Sendo assim, as três subunidades do IL-2R formam o receptor de alta afinidade (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$, Figura 9) com a IL-2 e, conseqüentemente, uma elevada capacidade de sinalização celular (BOYMAN; KOLIOS; RAEBER, 2015; LIAO; LIN; LEONARD, 2013; SPANGLER et al., 2015; WALDMANN, 2006).

Figura 9 – Regulação da expressão de IL-2R. Linfócitos T naïve expressam o complexo IL-2R $\beta\gamma_c$, que apresenta baixa afinidade com a IL-2. Após ativação do linfócito T por antígeno e coestimuladores, a IL-2 estimula a expressão da cadeia IL-2R α (CD25), aumentando os níveis do complexo de alta afinidade IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$.



Fonte: Adaptado de Abbas et al. (2018).

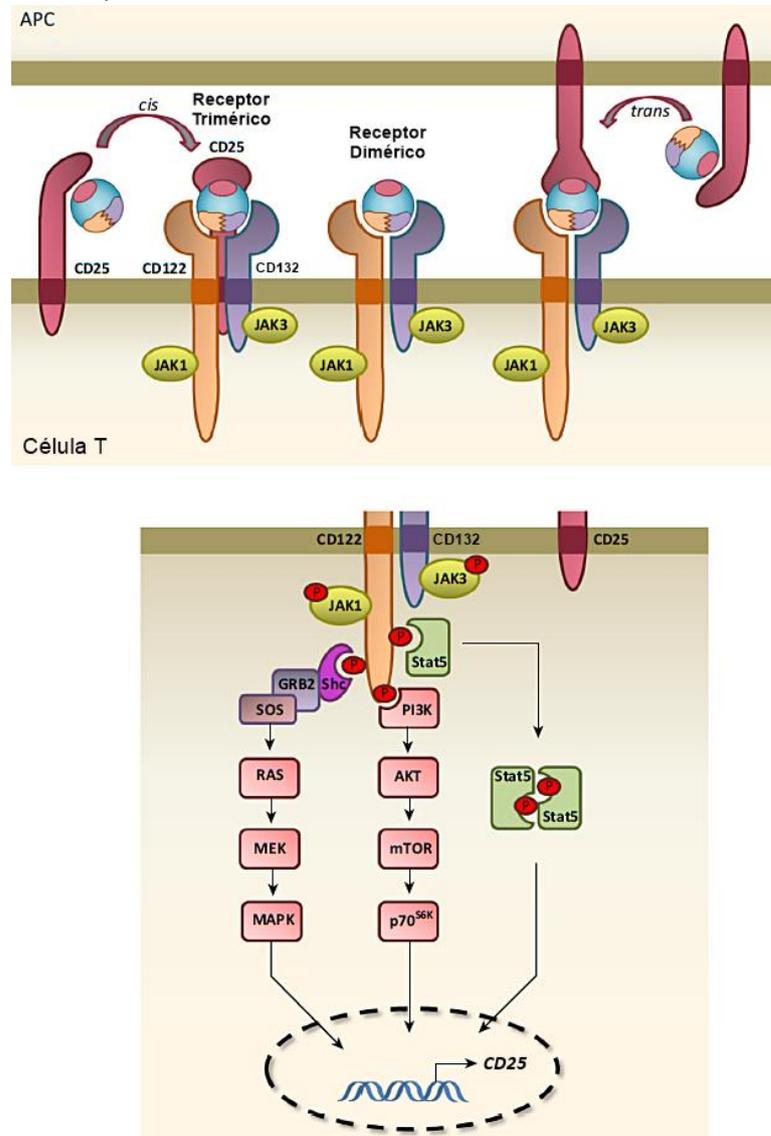
O CD25 é uma glicoproteína de membrana, praticamente ausente em células T naïve, e sua síntese é regulada pelo estímulo dos TCRs (receptores de células T) e

pelo contato com a IL-2. Após ativação das células T pelas APCs, a produção e secreção da IL-2 estimula a expressão de CD25 na superfície celular. Conseqüentemente, os níveis do complexo trimérico IL-2R $\alpha\beta\gamma$ c nos linfócitos T são aumentados. Isso fornece um mecanismo de feedback positivo à resposta das células T CD4+ ativadas, aumentando sua proliferação (Figura 9). Essa auto regulação positiva do sistema IL2/IL2R desempenha um importante papel no controle da intensidade e duração das respostas imune das células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018b; BOYMAN; SPRENT, 2012; LIAO; LIN; LEONARD, 2013).

A transdução de sinal mediada pelo complexo IL-2R $\alpha\beta\gamma$ c ocorre por três vias principais: transdutor de sinal Janus quinase (JAK) e ativador de transcrição (STAT); fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) e proteína quinase (AKT); ou proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, ou quinase regulada por sinal extracelular - ERK). Além disso, o sinal depende também dos domínios citoplasmáticos das cadeias CD122 e CD132, e das enzimas da família Janus quinase (JAK1 e JAK3), que são ativadas para que as três vias de transdução sejam iniciadas (Figura 10) (ARENAS-RAMIREZ; WOYTSCHAK; BOYMAN, 2015).

A ligação da IL-2 as subunidades do seu receptor CD122 e CD132 (por meio do CD25) causa uma heterodimerização dos domínios citoplasmáticos dessas subunidades e a ativação da JAK1 e JAK3, que se associam aos domínios intracelulares das cadeias CD122 e CD132, respectivamente. Uma vez ativadas, as quinases fosforilam os resíduos principais de tirosinas da subunidade CD122, que subsequentemente permite a associação e fosforilação das proteínas adaptadoras Shc, Stat5 e PI3K. A Shc promove a ativação da via MAPK, a Stat5 ativa as proteínas da via STAT (principal mecanismo de regulação dos genes para funcionalidade das células T), e a PI3K ativa a sua respectiva via (Figura 10). Assim, essas vias de sinalização celular regulam a expressão do locus gênico do CD25 nos linfócitos T ativados, e conseqüentemente, o crescimento e proliferação dessas células (ARENAS-RAMIREZ; WOYTSCHAK; BOYMAN, 2015; LIAO; LIN; LEONARD, 2013; MALEK, 2008).

Figura 10 – Ligação da IL-2 e vias de sinalização do IL-2R. As interações que a IL-2 pode ter com as subunidades do seu receptor, que inclui CD25 (IL-2R α), CD122 (IL-2R β) e o CD132 (IL-2R γ c). Além disso, as três vias de transdução de sinal (JAK-STAT, PI3K-AKT e MAPK) das células T a partir da interação interleucina-receptor.



Fonte: Adaptado de Arenas-Ramirez et al. (2015).

2.4.3 Relação IL-2 e HIV/AIDS

Por regular a proliferação, desenvolvimento e sobrevivência dos linfócitos T, a IL-2 é uma importante proteína na reconstituição imunológica dos indivíduos infectados pelo HIV. Como se sabe, o HIV atua no organismo diminuindo os níveis das células T CD4+, tornando o indivíduo imunodeprimido e mais vulnerável às doenças oportunistas relacionadas à AIDS e morte. Mesmo em tratamento, muitos pacientes HIV-positivos apresentam baixa produção de IL-2, levando a uma deficiência na proliferação das células T CD4+ e, conseqüentemente, recuperação

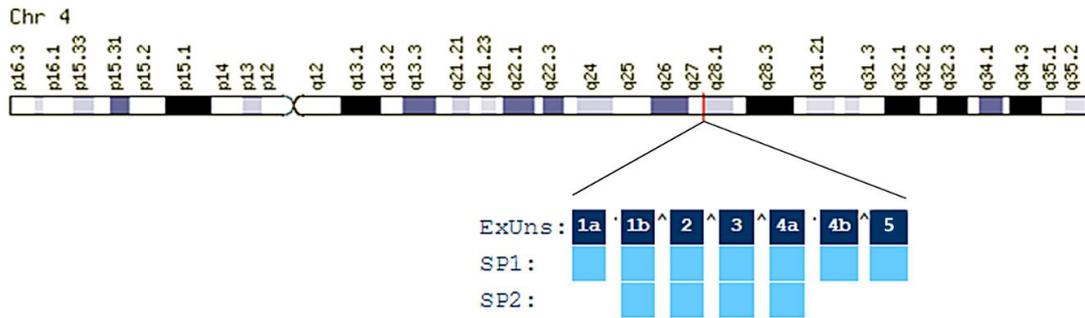
imunológica reduzida. Além disso, tem sido reportado que reduções na expressão do CD25 também afetam a resposta imune de indivíduos HIV-positivos por influenciar a atividade das células T CD4+ (CORBEAU; REYNES, 2011; DO et al., 2006; LÓPEZ-ABENTE; CORREA-ROCHA; PION, 2016; ZHANG et al., 2016b).

Há alguns anos, uma versão sintética da proteína IL-2 (chamada de “proleucina”) foi produzida para ser utilizada em combinação com a terapia antirretroviral. Essa “proleucina” tem sido administrada subcutaneamente em pacientes HIV-positivos sob HAART com recuperação imunológica deficiente. Nesse caso, a interleucina-2 sintética não substitui a terapia nem é utilizada como opção de uma droga no esquema terapêutico. Ela é apenas usada como um adjuvante na terapia anti-HIV para os pacientes que apresentam dificuldades de reconstituição imune, como forma de melhorar o resultado terapêutico dos pacientes, e reduzir os riscos de doenças oportunistas e morte. Apesar de ainda ser pouco difundida, o uso da IL-2 no tratamento antirretroviral tem se mostrado eficiente nos pacientes HIV-positivos sob terapia, aumentando sua contagem de células T CD4+ e evidenciando a importância da IL-2 na recuperação imunológica desses indivíduos. Além disso, estudos recentes tem demonstrado que utilização da IL-2 na terapia anti-HIV também levaram, de forma indireta, ao aumento na diferenciação das células T naive em células T efectoras, e na expressão de CD25 nos linfócitos T ativados (ABRAMS et al., 2009; AIUTI; MEZZAROMA, 2006; GAFFEN; LIU, 2004; KLATZMANN; ABBAS, 2015; ONWUMEH; CI; KREDO, 2017).

2.4.4 Os genes *IL2* e *IL2R α*

A interleucina-2 é codificada pelo gene *IL2*, que está localizado no braço longo do cromossomo 4 (4q27). Esse gene possui uma região codificadora de 462 pares de bases responsável por produzir a proteína solúvel IL-2 com 153 aminoácidos. Além disso, O gene *IL2* é composto por cinco éxons e quatro íntrons, os quais produzem dois transcritos variantes por *splicing* alternativo (Figura 11). Dessas, apenas a variante SP1 codifica a proteína funcional, IL-2, com seus 153aa. O segundo transcrito (SP2) produz nenhuma proteína por reter um íntron na sua sequência final do RNA mensageiro e sem uma região codificante definida, como consequência, não há tradução (GAFFEN; LIU, 2004; THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2015).

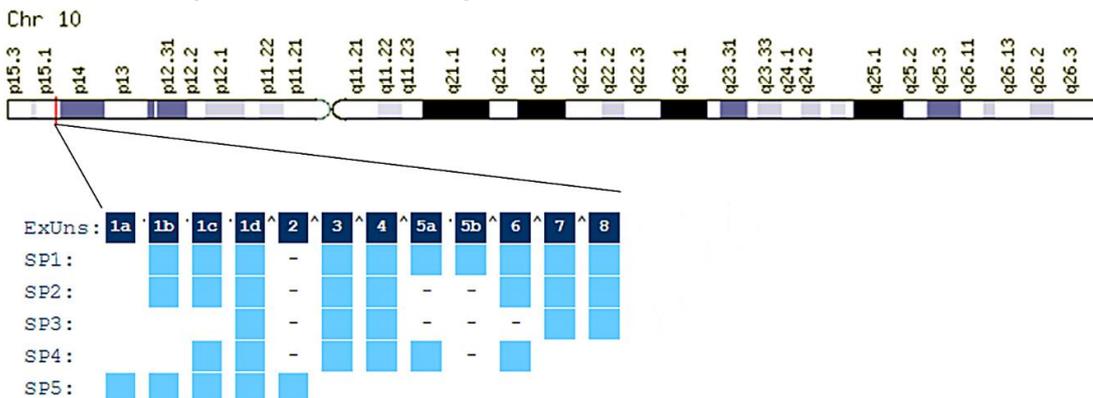
Figura 11 – Localização cromossômica do gene *IL2* e seus transcritos variantes.



Fonte: Adaptado de GeneCards (<<http://www.genecards.org>> Acesso: 25 de maio de 2018).

Por outro lado, o gene *IL2R α* (ou *CD25*), responsável por codificar a subunidade α do receptor IL-2R, localiza-se no braço curto do cromossomo 10 (10p15.1). Consistindo de oito éxons, sete íntrons e uma região codificante de 819pb, esse gene produz a proteína funcional CD25 de 272aa. A partir de processos de *splicing* alternativos, o gene *IL2R α* produz cinco transcritos variantes (Figura 12). A variante SP1 é a única que produz a proteína IL-2R α completa, com seus 272 aminoácidos. As variantes SP2, SP3 e SP4, codificam proteínas polipeptídicas menores (263aa, 200aa e 109aa, respectivamente), que geralmente são solúveis e com capacidade reduzida de ligação à IL-2. Já o transcrito variante SP5, foi recentemente descrito e ainda pouco se sabe sobre sua função (DO et al., 2006; MORRIS; WALDMANN, 2000; THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2015).

Figura 12 – Localização cromossômica do gene *IL2R α* e seus transcritos variantes.



Fonte: Adaptado de GeneCards (<<http://www.genecards.org>> Acesso: 25 de maio de 2018).

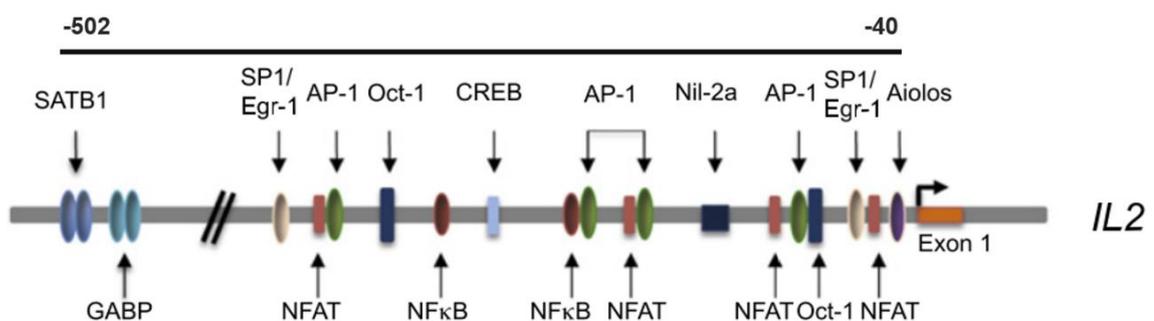
2.4.4.1 Regulação da expressão do *IL2*

Existem duas principais características em relação ao padrão de expressão do gene da IL-2 que têm sido bastante estudadas. Primeiro, a expressão da IL-2 é quase

que exclusivamente restrita a linhagem de células T, e segundo, não há evidências de produção ativa da IL-2 em células T naive, necessitando de ativação através dos TCRs ou outros sinais de ativação. A expressão da IL-2 é controlada em vários níveis, sendo a regulação transcricional a mais estudada e descrita na literatura. Diversos elementos regulatórios têm sido identificados na região promotora do gene *IL2*, que fica a aproximadamente 300pb a montante do sítio de início da transcrição. Essa região é altamente conservada em humanos, e também entre humanos e camundongos (com 86% de identidade) (BUNTING; WANG; SHANNON, 2006; LIAO; LIN; LEONARD, 2013).

Dentre os múltiplos fatores envolvidos na transcrição do gene *IL2* estão os de regulação positiva: Fator nuclear de células T ativadas (NFAT), proteína ativadora 1 (AP-1), proteínas de ligação octâmeros (Oct-1 e Oct-2), proteína específica dedo de zinco 1/reposta inicial de crescimento 1 (Sp1/Egr-1) e proteína de ligação GA (GABP); de regulação negativa: proteína de ligação/proteína moduladora ao elemento de resposta cAMP (CREB/CREM), proteína dedo de zinco (Nil-2a), proteína de ligação a sequência especial rica em AT (SATB1), proteína *foxhead box* P3 (Foxp3), Aiolos (proteína dedo de zinco da família *Ikaros-3*) e proteína de maturação induzida por linfócitos B-1 (BLIMP-1); e o fator nuclear kappa B (NF- κ B) composto por subunidades (NFKB1 (p50), NFKB2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel) que permite a esse complexo proteico, através de interações entre suas subunidades, regular o gene *IL2* de forma negativa e positiva (Figura 13). Esses fatores de transcrição são induzidos ou reprimidos pela sinalização dos receptores TCR ou outros que atuam nas vias de regulação da IL-2 (KIM; IMBERT; LEONARD, 2006; LIAO; LIN; LEONARD, 2013; TENBROCK; TSOKOS, 2004).

Figura 13 – Localização dos sítios de ligação e seus correspondentes fatores de transcrição do gene *IL2*.



Fonte: Adaptado de Liao et al. (2013).

Além disso, tem sido proposto também que modificações epigenéticas e remodelagem da cromatina estejam envolvidos no controle transcricional do *IL2*, assim como fatores de regulação pós-transcricional. Interessantemente, têm sido descritos na literatura microRNAs (miRNAs) que também modulam a expressão gênica da IL-2. Por exemplo, o miRNA146a, que é induzido pelos receptores TCR das células T, pode diminuir a produção do fator AP-1, e conseqüentemente, afetar a expressão da IL-2, enquanto que o miR9, também induzido pelos TCR, tem sido associado com o aumento da produção de IL-2 por suprimir a expressão do *PRDM1*, um fator de regulação negativa. Com isso, a expressão do gene *IL2* é regulada tanto positivamente quanto negativamente (CRISPÍN; TSOKOS, 2009; KIM; IMBERT; LEONARD, 2006; TENBROCK; TSOKOS, 2004).

Acredita-se que todos os sítios de ligação na região promotora do *IL2* precisam ser ocupados pelos fatores de regulação positiva para que ocorra uma transcrição gênica em níveis ótimos (KIM; IMBERT; LEONARD, 2006).

2.4.4.2 Regulação da expressão do *IL2R α*

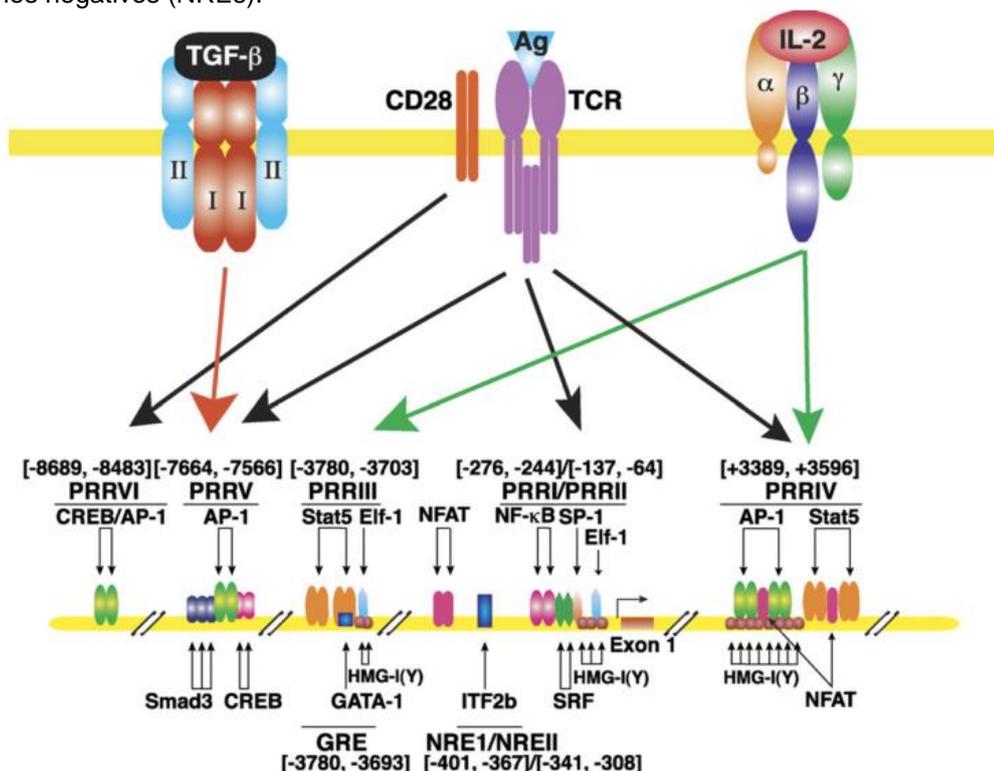
A expressão da cadeia alfa do receptor da IL-2 (CD25 ou IL-2R α) é fortemente regulada a nível transcricional, e independe das outras duas cadeias (IL2R β e IL2R γ) do IL-2R, que inclusive contêm poucos elementos de regulação transcricional. O gene *IL2R α* é induzido não só pelo reconhecimento de antígeno, mas também por mitógeno e lectinas que mimetizam o estímulo antigênico, bem como outros estímulos. Dentre esses, destacam-se as citocinas IL-1, IL-7, IL-15, TNF- α (fator de necrose tumoral- α), TGF- β (fator de transformação do crescimento- β), e principalmente a IL-2, que também é estimulada por antígenos. Em menor escala, IFN- α (interferons- α) e IL-16, que são produzidas em respostas imune às infecções virais, também podem estimular IL-2R α nos linfócitos T. Após o estímulo, a expressão do gene *IL2R α* é induzido por sinalização via TCRs, proteínas trans-ativadoras Tax 1 e 2 (proteínas virais presentes nos HTLV-1 e 2, respectivamente) e pelo próprio IL-2R (KIM; IMBERT; LEONARD, 2006; READ et al., 2016; ROCHMAN; SPOLSKI; LEONARD, 2009).

Assim, como na expressão da IL-2, o IL-2R α não é geralmente expresso em células T naive, pois é necessária a exposição dessas células a antígenos, que conseqüentemente, ativam-nas e induz a produção de IL-2R α . Além disso, a expressão de IL-2R α é diferencialmente regulada nos órgãos linfoides primários e

secundários, e além dos linfócitos T, células NK, monócitos e células B maduras também podem expressar CD25 (AKDIS et al., 2011; ARENAS-RAMIREZ; WOYTSCHAK; BOYMAN, 2015; BOYMAN; KOLIOS; RAEBER, 2015).

Até o momento já foram identificados um total de seis regiões regulatórias positivas (PRRs) que, em conjunto, regulam o *IL2R α* (um gene dependente de *TATA box*) em resposta aos estímulos. Os fatores de transcrição que se ligam as regiões PRR I, PRR II, PRR III, PRR V e PRR VI são estimulados por antígenos e/ou mitógenos via TCR ou CD28 (no caso da PRR VI), sendo que a região PRR V contém também elementos de resposta à estímulos de TGF- β via proteínas Tax1 e 2. Já as regiões PRR III e PRR IV medeiam respostas oriundas dos estímulos da IL-2 via receptor IL-2R. Além dessas regiões de regulação do gene *IL2R α* , foram descritos dois elementos regulatórios negativos, NRE-1 e NRE-2, que estão localizados em uma região de aproximadamente 100pb do gene (-308 a -401). Assim, esses elementos controlam a expressão do gene *IL2R α* também de forma negativa e positiva, como evidenciado no gene da IL-2. A Figura 14 ilustra as regiões regulatórias e a ligação de seus respectivos fatores de transcrição (KIM; IMBERT; LEONARD, 2006; LIAO; LIN; LEONARD, 2013; LU et al., 2005).

Figura 14 – Os elementos regulatórios e seus correspondentes fatores de transcrição identificados no gene *IL2R α* . Em destaque estão a localização as regiões regulatórias positivas (PRRs) e os elementos regulatórios negativos (NREs).

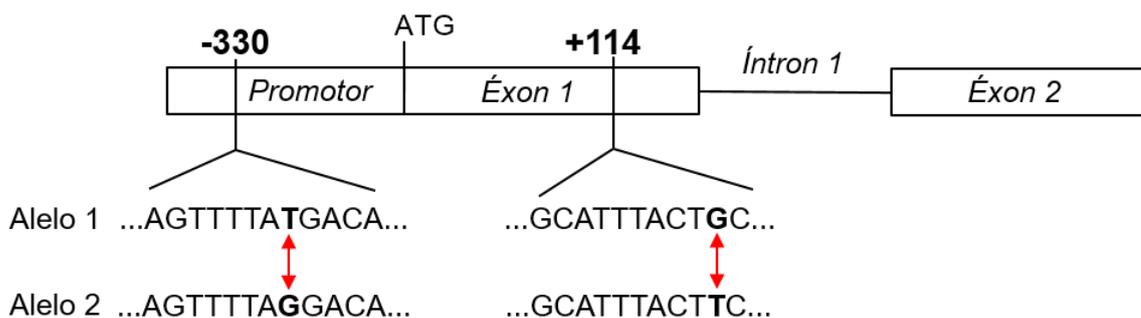


Fonte: Adaptado de Kim et al. (2006).

2.4.4.3 Polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2R α*

Após o sequenciamento completo do gene da IL-2, muitos polimorfismos já foram identificados e estudados a nível molecular. Entre eles podemos destacar os polimorfismos de base única (SNPs): rs2069762 (-330 T>G) e rs2069763 (+114 G>T). O SNP rs2069762 é uma alteração nucleotídica (timina para guanina, T>G) que ocorre dentro da região promotora do gene *IL2*, na posição -330. Essa variante genética tem sido associada com altos níveis na produção de IL-2, devido ao aumento na expressão de seu gene. Já o polimorfismo rs2069763 é uma mudança de nucleotídeo (guanina para timina, G>T) na posição 114 a partir do códon de início da região codificante, localizado no primeiro éxon do gene *IL2*. Esse SNP é uma alteração silenciosa do DNA no qual produz nenhuma mudança na sequência de aminoácidos da proteína. Ocorre uma alteração no códon de CTG para CTT, mas o aminoácido continua sendo o mesmo, Leucina (Figura 15). Contudo, acredita-se que o polimorfismo rs2069763 esteja em desequilíbrio de ligação com o rs2069762, podendo formar, assim, um haplótipo funcional GT. Porém, essa formação haplotípica ainda é incerta (FUJITA et al., 1983; HOFFMANN et al., 2001; JOHN et al., 1998; LIN et al., 2008; MATESANZ et al., 2000).

Figura 15 – Polimorfismos do gene *IL2*. Esquema representando parte do gene da IL-2 com a localização dos SNPs rs2069762 (-330, T>G) e rs2069763 (+114, G>T).

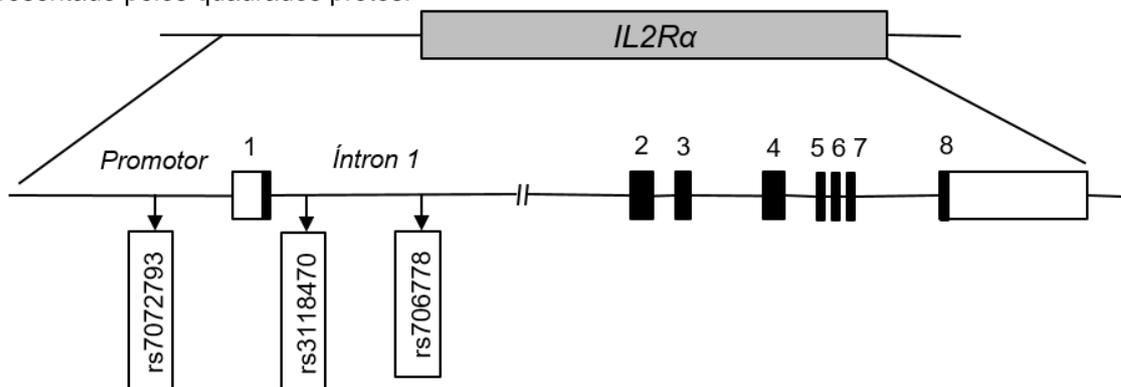


Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido sua importância na regulação dos linfócitos T CD4, e consequentemente nas respostas imunológicas, o *IL2R α* se tornou um forte candidato nos estudos com doenças autoimunes. Como resultado, muitos polimorfismos do gene *IL2R α* vem sendo investigados em estudos funcionais e de associação, principalmente com o advento do GWAS (estudos de associação genômica ampla). Muitos desses polimorfismos formam blocos haplotípicos em regiões de regulação

gênica do *IL2R α* , e por essa razão, Tag SNPs são os selecionados para os estudos de associação genética. Pode-se dizer que Tag SNP é um polimorfismo representativo de um bloco haplotípico (uma região gênica com alto desequilíbrio de ligação). Desses polimorfismos já descritos e bastante estudados na literatura, vale destacar o rs7072793C>T (localizado na região promotora) e dois Tag SNPs (rs3118470 T>C e o rs706778 T>C) que mapeiam o éxon 1 e a região 5' do íntron 1 no gene *IL2R α* , respectivamente (Figura 16). Além disso, esses polimorfismos estão situados em regiões de ligação a elementos regulatórios do *IL2R α* , e assim, tem sido reportado por influenciar a expressão gênica (BABRON et al., 2011; CHEN et al., 2017; FICHNA et al., 2012; KAWASAKI et al., 2009; KIM; IMBERT; LEONARD, 2006; QU et al., 2007, 2009a; STAHL et al., 2010; TANG et al., 2015).

Figura 16 – Ilustração esquemática do gene *IL2R α* mostrando a posição dos Tag SNPs rs7072793 (C>T), rs3118470 (T>C) e o rs706778 (T>C). Os quadrados juntamente com a numeração (1-8) representam os éxons em sua respectiva ordem no gene. A região codificante do *IL2R α* está representado pelos quadrados pretos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez presentes em regiões de regulação gênica ou de sequências codificadoras nos genes *IL2* e *IL2R α* , esses polimorfismos podem levar a alterações nos níveis de expressão da IL-2 e de seu receptor IL-2R α . Como resultado, esses SNPs podem influenciar o nível de ativação e proliferação de linfócitos T CD4+, e assim, a reconstituição do sistema imune dos indivíduos HIV-positivos em ART (DO et al., 2006; GOUDY et al., 2013; HAAS et al., 2006; LI et al., 2013; PENG et al., 2014; SCHWARTZ et al., 2017; WEI et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O tipo de estudo realizado foi o de caso-controle, um estudo observacional, onde se compara dois grupos amostrais. Em um, os indivíduos apresentam o status clínico de interesse (caso), falha imunológica, e no outro os indivíduos não apresentam (controle), sucesso imunológico (GRIMES; SCHULZ, 2002).

Foram recrutados 248 pacientes HIV-positivos sob ART (entre 2011 e 2015, e recoletados entre 2017 e 2018) residentes no estado de Pernambuco e atendidos no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os sexos com idade ≥ 18 anos, submetidos a tratamento antirretroviral por pelo menos um ano, sem histórico de uso de droga injetáveis, com boa adesão à terapia, e que apresentaram redução da carga viral a níveis indetectáveis (<50 cópias/mL) após um ano de ART. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido acompanhado por um questionário de abordagem clínica e sociodemográfica (Anexo A e B) para participar do estudo, autorizando a coleta amostral de sangue periférico. Além disso, outras informações clínicas e laboratoriais também foram coletadas a partir de registros médicos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP (Anexo C). O processamento laboratorial das amostras biológicas foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES

Foram incluídos no grupo caso os indivíduos HIV-positivos que apresentaram níveis de células T CD4+ abaixo de 30% em relação a contagem total de linfócitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013) ou ganho abaixo de 200 células/ μ L (LI et al., 2011) com base nos exames pré-tratamento após um ano de ART, estando assim em falha imunológica. Dessa forma, o grupo controle (definido como sucesso imunológico) foi composto pelos indivíduos que apresentarem reconstituição imunológica adequada (níveis de LT-CD4+ $\geq 30\%$ ou ganho ≥ 200 cels/ μ L após um ano de tratamento).

3.3 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS

A lista dos SNPs selecionados foi feita com base na literatura, a partir de estudos de associação e características funcionais, e em banco de dados como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/SNP>) e o Projeto 1000 Genomas (<http://www.1000genomes.org>) com o auxílio de ferramentas de busca online e softwares especializados, como o dbSNP e o 1000 *Genomes Selection Browser*, respectivamente. Com base nisso, foram selecionados cinco polimorfismos: rs2069762 (-330T>G, região promotora, MAF = 0,27) e rs2069763 (+114G>T, sinônimo: Leu38, MAF = 0,30) no *IL2*; rs7072793 (C>T, região promotora, MAF = 0,45), rs3118470 (T>C, íntron 1, MAF = 0,32) e rs706778 (T>C, íntron 1, MAF = 0,50) no *IL2R α* .

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Amostras de sangue periférico (8 mL) dos pacientes HIV-positivos foram coletadas em tubos de EDTA. Com 500 μ L desse sangue periférico amostral foi realizada a extração de DNA com o protocolo *mini salting out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988), com modificações *in house*. O DNA genômico extraído foi armazenado a - 20°C em tubos Eppendorfs de 1,5 mL e identificados com códigos para manter em sigilo da identidade dos indivíduos.

3.5 GENOTIPAGEM

Para os polimorfismos rs2069762 e rs2069763 a genotipagem foi por PCR convencional seguida de RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*). As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*), usando os seguintes primers: 5'-ATTCACATGTTTCAGTGTAGTTCT-3' (forward) e 5'-GTGATAGCTCTAATTCATGC-3' (reverse) para o SNP rs2069762; 5'-ATGTACAGGATGCAACTCCT-3' (forward) e 5'- TGGTGAGTTTGGGATTCTTG -3' (reverse) para rs2069763. As PCRs foram conduzidas em volume de 25 μ L contendo: 2 μ L de DNA genômico (50ng/ μ L); 2,5 μ L de buffer PCR 10x; 1,0 μ L de dNTPS (2 mM); 0,4 μ L do primer forward (10 μ M); 0,4 μ L do primer reverse (10 μ M); 0,2 μ L da Taq polimerase (5U/ μ L, *Uniscience Co.*) e 18,5 μ L de água Milli-Q. As reações tiveram os seguintes protocolos: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 56°C (rs2069762) e 54°C (rs2069763) por 45 s, e extensão a 72°C por 50 s), e extensão final a 72°C por 7 min.

Após confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose 2%, os produtos de PCR foram então submetidos a digestão em volume final de 10µL contendo: 3U da enzima de restrição (Bfal ou MwoI, *New England BioLabs*), 5µL do produto de PCR e 10X *CutSmart Buffer*. As reações de digestão foram a 37°C por 60 min com inativação a 80°C por 20 min (Bfal) para o polimorfismo rs2069762, e a 60°C por 15 min (MwoI) para o rs2069763. Em seguida, os fragmentos de DNA clivados foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta. A Tabela 3 resume os padrões de bandas gerados.

Tabela 3 – Padrões de bandas da genotipagem dos polimorfismos do gene *IL2*.

Polimorfismos (<i>IL2</i>)	Enzima de Restrição	Genótipos
rs2069762 (-330, T>G)	Bfal	TT: 131pb
		TG: 131pb + 110pb + 21pb
		GG: 110pb + 21pb
rs2069763 (+114, G>T)	MwoI	GG: 151pb + 111pb
		GT: 262pb + 151pb + 111pb
		TT: 262pb

Fonte: Elaborada pelo autor.

A enzima de restrição Bfal, utilizada para genotipagem do polimorfismo rs2069762 (-330 T>G), cliva o sítio contendo o alelo variante G. Ou seja, o SNP cria um sítio de restrição (C^ATAG) (JOHN et al., 1998) para a enzima Bfal, permitindo que a mesma corte a respectiva região do DNA (Figura 17).

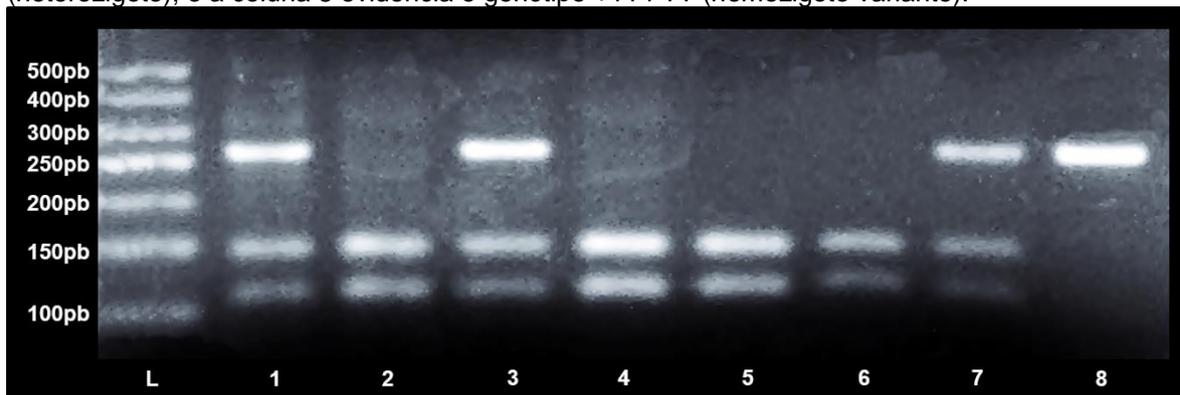
Figura 17 – Padrões de bandas de DNA gerados pela enzima de restrição Bfal para o polimorfismo rs2069762 (-330 T>G). Coluna L: marcador molecular (*Ladder* de 50pb); colunas 1, 3, 4 e 6 evidenciam o genótipo -330 TT (homozigoto ancestral); colunas 6 e 7 mostram o genótipo -330 TG (heterozigoto); e as colunas 2 e 5 evidenciam o genótipo -330 GG (homozigoto variante).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Já a enzima de restrição *MwoI* foi utilizada para o polimorfismo rs2069763 (+114 G>T). Neste caso, a mudança de nucleotídeo resulta na perda de sensibilidade da enzima *MwoI*, que não consegue clivar o sítio modificado (sítio ancestral: A[^]CTG – permite a clivagem, Figura 18) (MATESANZ et al., 2000).

Figura 18 – Padrões de bandas de DNA gerados pela enzima de restrição *MwoI* para o polimorfismo rs2069763 (+114 G>T). Coluna L: marcador molecular (*Ladder* de 50pb); colunas 2, 4 e 5 e 6 evidenciam o genótipo +114 GG (homozigoto ancestral); colunas 1, 3 e 7 mostram o genótipo +114 GT (heterozigoto); e a coluna 8 evidencia o genótipo +114 TT (homozigoto variante).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os SNPs do gene *IL2R α* (rs7072793, rs3118470 e rs706778), a genotipagem foi por meio da tecnologia de sondas TaqMan na plataforma de PCR em tempo real ABI 7500 (*Applied Biosystems*), seguindo o protocolo: desnaturação inicial a 95 C por 10 min, seguida por 50 ciclos de amplifica o (desnatura o a 95 C por 30 s e anelamento/extensão a 60 C por 1:30 min), e extensão final a 60 C a 10 min.

3.6 ISOLAMENTO DE PBMC

A partir de 4 mL de sangue amostral, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por Ficoll-Paque PLUS (*GE Healthcare*), lavadas duas vezes com soluço PBS 1x (salina tamponada com fosfato) e ressuspensas em tampão FACS (3% BSA; 0,01% NaN₃ – Azida de Sódio; PBS 1 x). Em seguida, antes da marca o para citometria, foi realizada a contagem de células em Câmera de Neubauer (1). A contagem de células das amostras de sangue periférico apresentou uma média de 4.5 x 10⁶ céls/mL.

$$\text{Concentra o (cels/mL)} = \frac{\text{Número de células} \times 10.000}{\text{Número de quadrantes} \times \text{dilui o}} \quad (1)$$

O número total de leucócitos viáveis foi determinado pelo teste de exclusão com Azul de Trypan (0,4%), utilizando o fator de diluição 1:10. A viabilidade celular foi >90% ($95 \pm 5\%$ das células são mononucleadas (PHILLIPS, 1973)).

3.7 IMUNOFENOTIPAGEM

Para imunofenotipagem dos linfócitos T CD4 por citometria de fluxo, foram separadas 300-500 mil células por painel de marcação. Esses painéis possuíam os marcadores específicos para detecção das populações de linfócitos T CD4 recém emigrados do timo e naive. Sendo assim, as PBMCs foram expostas aos marcadores e incubadas por 30 min em temperatura ambiente protegidas da luz. Depois de devidamente marcadas, as células foram lavadas com tampão FACS e fixadas em PBS-Formol 1% para posteriormente serem analisadas no citômetro BD Accuri C6 (*BD Biosciences*) e no software FCS Express 6 Plus, versão 6.05. Foi possível detectar os níveis de linfócitos T CD4 naive (CD4+ CD45RA+ CD62L+) (GOLUBOVSKAYA; WU, 2016) e as células T CD4 recém-emigrados do timo (CD4+ CD31+) (ZAKHOUR et al., 2016). Os anticorpos monoclonais imunofluorescentes APC-CD4, BB515-CD4, PE-CD31, PerCP-Cy5.5-CD45RA e APC-CD62L foram adquiridos da *BD Biosciences*.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos genotipados foram obtidas por contagem direta. A conformidade ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada por meio do teste de χ^2 .

Nas análises univariadas foi utilizado o teste exato de Fisher para verificar a associação das variáveis genéticas e clínicas com a ocorrência de falha imunológica. No entanto, para as variáveis contínuas, que não apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Foi aplicado o teste t para as variáveis contínuas em normalidade. O teste de Cochran-Armitage foi utilizado para avaliar a tendência na distribuição dos pacientes HIV-positivos em relação a contagem de linfócitos T CD4+ pré-tratamento.

Além disso, para os genes *IL2* e *IL2R α* foi calculado o desequilíbrio de ligação (LD), por meio dos coeficientes D' (variação entre -1 e 1) e r^2 (variação entre 0 e 1)

usando o programa Haploview versão 4.2 (*Broad Institute of Harvard and MIT Cambridge*), para verificar a formação de haplótipos entre os SNPs de cada gene.

As variáveis de importância clínica ou cujos testes obtiveram um p-value menor do que 0,20 foram pré-selecionadas para inclusão nas análises multivariadas de regressão logística. Os modelos de regressão logística foram realizados para explicar a ocorrência da falha imunológica, considerando os fatores genéticos e as variáveis clínicas. As análises estatísticas foram realizadas no programa R, versão 3.4.0 (*R Development Core Team*). O grau de significância (α) para os testes foi 0,05, com intervalo de confiança de 95%.

O poder estatístico das análises para detectar uma associação ao nível de significância de 0,05 foi calculado com o G*Power, versão 3.1 (*Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*). Assumindo uma OR <1 ou >1, o poder das análises do estudo foi > 90%.

4 RESULTADOS

4.1 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

Após classificação dos 248 pacientes (107 homens e 141 mulheres) HIV-positivos sob ART com base na contagem de células T CD4+, 122 indivíduos (45 homens e 77 mulheres) compuseram o grupo controle (sucesso imunológico) e 126 (62 homens e 64 mulheres) o grupo caso (falha imunológica). Apesar da frequência de mulheres ter sido maior no grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à proporção dos sexos nos grupos estudados (OR=1,65; IC-95%=0,97-2,84; $p=0,06$), contudo, mostrou-se uma tendência. Devido a isso, a variável sexo foi incluída na análise de regressão logística. A Tabela 4 sumariza as características sociodemográficas da população de estudo.

Tabela 4 – Dados sociodemográficas da população de estudo.

Variável		Caso n=126 (%)	Controle n=122 (%)
Sexo (n=248/248)*	Masculino	62 (49,2)	45 (36,9)
	Feminino	64 (50,8)	77 (63,1)
Etnia (n=248/248)	Branca	29 (23,0)	36 (29,5)
	Parda	59 (46,8)	53 (43,5)
	Negra	37 (29,4)	33 (27,0)
Fumante (n=98/248)	Indígena	1 (0,8)	0 (0,0)
	Sim	4 (8,2)	11 (22,4)
	Não	45 (91,8)	38 (77,6)
Etilismo (n=98/248)	Sim	11 (22,4)	19 (38,8)
	Não	38 (77,6)	30 (61,2)

*Variável pré-selecionada para compor o modelo de regressão logística.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação as análises univariadas com os dados clínicos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados para as variáveis: idade e peso no início do tratamento, esquemas terapêuticos com AZT ou IP/r, troca de esquema durante o tratamento, tempo para início da terapia após diagnóstico e coinfeções (sífilis, hepatites B e C, citomegalovírus e toxoplasmose). Isso mostra que os dois grupos estudados apresentaram perfis clínicos pré-tratamento semelhantes (Tabelas 5 e 6).

Porém, indivíduos que iniciaram ART com a contagem de linfócitos T CD4+ <500 células/ μ L apresentaram risco de falha imunológica quase seis vezes maior em

comparação a indivíduos que iniciaram o tratamento com contagens de LT CD4+ ≥ 500 células/ μL (OR=5,95; IC-95%=2,38-17,04; $p < 0,001$; Tabela 5).

Tabela 5 – Testes de associação com as variáveis clínicas (teste Exato de Fisher, exceto para peso, idade e tempo de início da terapia).

Variável		Caso n=126 (%)	Controle n=122 (%)	p-value
Peso no início do tratamento (IIQ) (n=239/248)**		61,5 (55-70,5)	64 (54-75)	0,29
Tempo para início da terapia, semanas (IIQ) (n=202/248)**		12 (4-74)	32 (6-108)	0,05*
Idade no início do tratamento (IIQ) (n=238/248)**		32(29-39)	32(28-36)	0,21
Esquema com IP/r (n=196/248)	Sim	34 (34,0)	44 (45,8)	0,11*
	Não (uso de INNTR)	66 (66,0)	52 (54,2)	
Esquema com AZT (n=195/248)	Sim	88 (88,9)	82 (85,4)	0,52*
	Não (uso de TDF)	11 (11,1)	14 (14,6)	
Troca de esquema (n=212/248)	Sim	12 (10,7)	4 (4,0)	0,07*
	Não	100 (89,3)	96 (96,0)	
Contagem de células T CD4+ pré- tratamento (n=205/248)	<500 cels/ μL	100 (93,5)	69 (70,4)	<0,001*
	≥ 500 cels/ μL	7 (6,5)	29 (29,6)	

*Variáveis pré-selecionadas para compor o modelo de regressão logística.

**Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (teste de Shapiro-Wilk: $p < 0,001$). IIQ = intervalo interquartis.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6 – Testes de associação com as coinfeções ao longo da terapia (teste Exato de Fisher).

Sorologias – Status de coinfeções		Caso n=126 (%)	Controle n=122 (%)	p-value
Sífilis (teste VDRL) (n=152/248)	Positivo	13 (16,9)	10 (13,3)	0,65
	Negativo	64 (83,1)	65 (86,7)	
Toxoplasmose IgG (n=36/248)	Positivo	10 (62,5)	15 (75,0)	0,48
	Negativo	6 (37,5)	5 (25,0)	
CMV IgG (n=35/248)	Positivo	14 (87,5)	19 (100,0)	0,20
	Negativo	2 (12,5)	0 (0,0)	
Hepatite C (n=87/248)	Positivo	0 (0,0)	2 (5,4)	0,18
	Negativo	50 (100,0)	35 (94,6)	
Hepatite B (n=118/248)	Imune** (“Positivo”)	32 (53,3)	40 (69,0)	0,09*
	Suscetível (Negativo)	28 (46,7)	18 ((31,0)	

*Variáveis pré-selecionadas para compor o modelo de regressão logística.

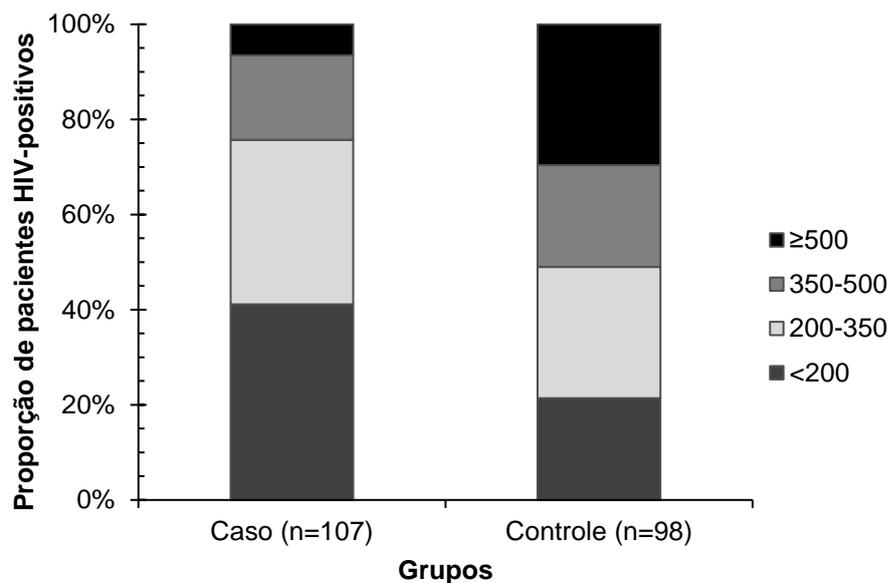
**Imune por infecção natural ou vacinação – “presença de anticorpos”.

CMV = citomegalovírus; VDRL = *Venereal Disease Research Laboratory*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, foi observado uma tendência estatisticamente significativa entre a contagem baixa pré-tratamento de células T CD4+ e a falha imunológica de acordo com o teste de Cochran-Armitage ($X^2=21,136$; $p<0,001$), onde quanto menor a contagem de células T CD4+ pré-tratamento maior a probabilidade de o indivíduo apresentar falha imunológica. Cerca de 40% dos pacientes do grupo caso apresentaram contagem muito baixa de linfócitos T CD4+ (<200 céls/ μ L), enquanto que no grupo controle foram 20% (Figura 17). Assim, contagem baixa de linfócitos T CD4+ no início da terapia mostrou-se ser um fator de risco para falha imunológica nos indivíduos HIV-positivos.

Figura 19 – Comparação da contagem de células T CD4+ pré-tratamento entre os grupos. A proporção de pacientes de cada grupo (caso e controle) estratificados em relação a contagem de linfócitos T CD4+ (cels/ μ L). Pode-se observar uma tendência em relação a contagem de linfócitos T CD4+ pré-tratamento, quanto menor os níveis dessas células no início da terapia maior a probabilidade de falha imunológica (teste de Cochran-Armitage, $p<0,001$).



Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 VARIÁVEIS GENÉTICAS

4.2.1 Polimorfismos do gene *IL2*

As distribuições genóticas do gene *IL2* se apresentaram em conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos estudados.

Dos indivíduos genotipados para o polimorfismo rs2069762, apenas três foram homozigotos para o alelo variante e 43 heterozigotos. Com isso, as frequências do alelo G foram 20,8% (grupo caso) e 29,4% (grupo controle). Apesar do alelo variante

se mostrar levemente mais frequente no grupo controle, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados para o SNP rs2069762 ($p=0,18$) (Tabela 7).

Quanto ao polimorfismo rs2069763 foram observados 15 indivíduos homocigotos para o alelo T e 71 heterocigotos. Sendo assim, sua frequência alélica no grupo caso foi de 29,8% e 25,5% no grupo controle. Não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa para o SNP rs2069763 ($p=0,41$).

Assim, nenhuma associação estatística com a falha imunológica foi encontrada nas análises univariadas para os polimorfismos do gene da IL2 (-330 T>G e o +114 G>T). O mesmo foi observado em relação aos genótipos na população de estudo para ambos os SNPs (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do gene *IL2* nos grupos estudados e teste de associação com ocorrência de falha imunológica à ART nos indivíduos HIV-positivos.

<i>IL2</i> (SNPs)	Frequências		Associação Genética		
	Caso n = 126 (%)	Controle n = 122 (%)	OR [IC-95%]	p-value	
	Alelos				
	T	84 (79,2)	65 (70,6)	0,63	0,18*
	G	22 (20,8)	27 (29,4)	[0,31 – 1,27]	
	Genótipos				
rs2069762* (99/248)	TT	31 (58,5)	22 (47,8)	Referência	0,08*
	TG	22 (41,5)	21 (45,7)	0,75 [0,31 – 1,81]	
	GG	0 (0,0)	3 (6,5)	0,00 [0,00 – 1,89]	
	Modelo Dominante				
	TT	31 (58,5)	22 (47,8)	0,65	0,32
	TG + GG	22 (41,5)	24 (52,2)	[0,27 – 1,55]	
	Alelos				
	G	125 (70,2)	140 (74,5)	1,23	0,41
	T	53 (29,8)	48 (25,5)	[0,76 – 2,01]	
	Genótipos				
rs2069763 (183/248)	GG	45 (50,6)	52 (55,3)	Referência	0,41
	GT	35 (39,3)	36 (38,3)	1,12 [0,58 – 2,17]	
	TT	9 (10,1)	6 (6,4)	1,72 [0,50 – 6,38]	
	Modelo Dominante				
	GG	45 (50,6)	52 (55,3)	1,21	0,56
	GT + TT	44 (49,4)	42 (44,7)	[0,65 – 2,26]	

*Polimorfismo incluído nas análises de regressão logística.

IC = Intervalo de confiança; OR = Razão de chances (do inglês, *Odds Ratio*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Polimorfismos do gene *IL2R α* (CD25)

Não houve diferenças estatisticamente significativas das frequências alélicas ou genótípicas dos polimorfismos rs7072793 (C>T), rs3118470 (T>C) e rs706778 (T>C) entre os grupos estudados. Mostrando que esses SNPs do gene *IL2Rα* não foram associados com a falha imunológica. Todas as frequências observadas do gene *IL2Rα* estiveram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas e genótípicas para todos os loci, bem como as medidas de associação (OR, IC de 95%) e seus p-values correspondentes estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do gene *IL2Rα* nos grupos estudados e teste de associação com ocorrência de falha imunológica à ART nos indivíduos HIV-positivos.

<i>IL2Rα</i> (SNPs)	Frequências		Associação Genética		
	Caso n = 126 (%)	Controle n = 122 (%)	OR [IC-95%]	p-value	
	Alelos				
	C	73 (37,2)	72 (36,7)	0,98	1,0
	T	123 (62,8)	124 (63,3)	[0,64 – 1,51]	
	Genótipos				
rs7072793 (196/248)	CC	14 (14,3)	13 (13,3)	Referência	1,0
	CT	45 (45,9)	46 (46,9)	0,91 [0,35 – 2,35]	
	TT	39 (39,8)	39 (39,8)	0,93 [0,35 – 2,44]	
	Modelo Dominante				
	CC	14 (14,3)	13 (13,3)	1,09	1,0
	CT + TT	84 (85,7)	85 (86,7)	[0,44 – 2,68]	
	Alelos				
	T	171 (80,7)	162 (76,4)	0,78	0,34
	C	41 (19,3)	50 (23,6)	[0,47 – 1,27]	
	Genótipos				
rs3118470* (212/248)	TT	69 (65,1)	65 (61,3)	Referência	0,24*
	TC	33 (31,1)	32 (30,2)	0,97 [0,52 – 1,84]	
	CC	4 (3,8)	9 (8,5)	0,42 [0,09 – 1,60]	
	Modelo Dominante				
	TT	69 (65,1)	65 (61,3)	0,85	0,67
	TC + CC	37 (34,9)	41 (38,7)	[0,47 – 1,54]	
	Alelos				
	T	65 (42,8)	62 (44,3)	1,06	0,81
	C	87 (57,2)	78 (55,7)	[0,65 – 1,74]	
	Genótipos				
rs706778* (146/248)	TT	10 (13,2)	14 (20,0)	Referência	0,24*
	TC	45 (59,2)	34 (48,6)	1,84 [0,67 – 5,26]	
	CC	21 (27,6)	22 (31,4)	1,33 [0,44 – 4,16]	
	Modelo Dominante				
	TT	10 (13,2)	14 (20,0)	1,96	0,18*
	TC + CC	66 (86,8)	47 (80,0)	[0,74 – 5,38]	

*Polimorfismo incluído nas análises de regressão logística.

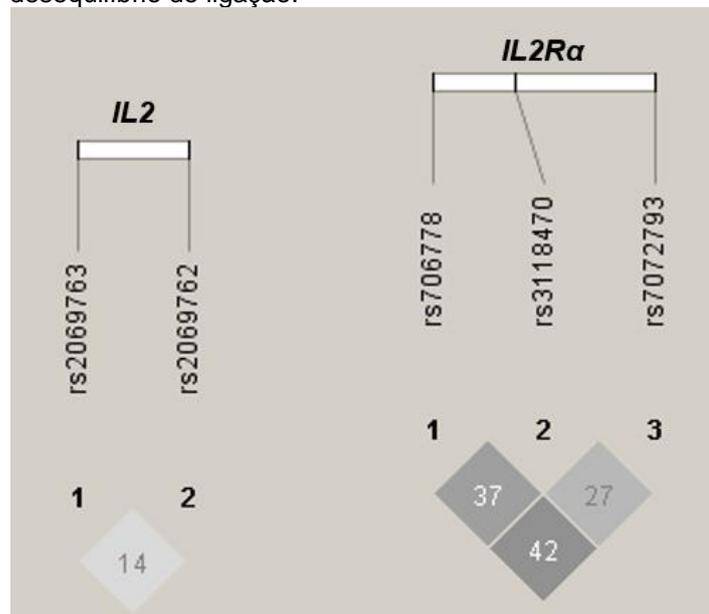
IC = Intervalo de confiança; OR = Razão de chances (do inglês, *Odds Ratio*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.3 Haplótipos dos genes *IL2* e *IL2R α*

O coeficiente r^2 de LD para os dois polimorfismos do gene *IL2* (rs206962-rs2068763) foi de 0,14, indicando um desequilíbrio de ligação muito baixo entre esses SNPs. Para os três polimorfismos do gene *IL2R α* , as medidas de LD mostraram valores para D' de 0,77 (bloco com os três SNPs: rs7072793-rs3118470-rs706778), 0,93 (rs706778-rs3118470) e 0,78 (rs3118470-rs707678). Contudo, os valores do coeficiente r^2 foram: 0,42; 0,37 e 0,27; respectivamente, evidenciando apenas um desequilíbrio de ligação fraco ou parcial para formação de haplótipos entre esses polimorfismos na população de estudo (Figura 20).

Figura 20 – Ilustração esquemática da formação de haplótipos entre os SNPs dos locos *IL2* e *IL2R α* . Nos quadrados são evidenciados os valores de r^2 para desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados. O degrade de cores entre branco e preto exhibe a medida de r^2 , onde os quadrados mais escuros indicam alto desequilíbrio de ligação.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA

Embora algumas variáveis clínicas não tenham sido associadas com a falha imunológica, elas foram incluídas no modelo de regressão logística juntamente com alguns polimorfismos dos genes *IL2* e *IL2R α* , devido às suas importâncias clínicas. Além disso, a variável contagem de células CD4+ pré-tratamento (<500 células/ μ L)

também foi incluída na análise por ter se mostrado previamente associada com a ocorrência de falha imunológica.

Os resultados da regressão logística mantiveram a associação significativa da contagem de células T CD4+ pré-tratamento (<500 céls/ μ L), com um risco seis vezes maior para ocorrência de falha imunológica (OR=6,526; $p=0,009$). Ademais, nesse modelo de regressão logística a variável sexo passou a ser estatisticamente associada com a falha imunológica. Com base no modelo, o sexo masculino mostrou-se associado com risco mais de duas vezes maior para falha em relação ao sexo feminino (OR=2,502; $p=0,027$; Tabela 9).

Tabela 9 – Variáveis incluídas no modelo de regressão logística para explicar a ocorrência de falha imunológica.

Variáveis	Estimativa(β)	OR	IC de 95%	<i>p</i> -value
rs2069762 (<i>IL2</i>) TT	-0,423	0,655	0,216 – 1,989	0,456
rs2069762 (<i>IL2</i>) TG	-0,395	0,673	0,175 – 2,597	0,566
rs2069762 (<i>IL2</i>) GG	-5,544	0,004	0,0003 – 0,052	0,987
rs3118470 (<i>IL2Rα</i>) TT	0,739	2,094	0,634 – 6,919	0,226
rs3118470 (<i>IL2Rα</i>) TC	-0,556	0,574	0,210 – 1,571	0,914
rs3118470 (<i>IL2Rα</i>) CC	-0,677	0,508	0,029 – 8,962	0,963
rs706778 (<i>IL2Rα</i>) TT	0,179	1,196	0,243 – 5,889	0,825
rs706778 (<i>IL2Rα</i>) TC	0,366	1,442	0,332 – 6,269	0,625
rs706778 (<i>IL2Rα</i>) CC	-0,031	0,969	0,160 – 5,863	0,973
Sexo masculino	0,917	2,502	1,109 – 5,643	0,027
Tempo de início da terapia após diagnóstico	0,003	1,003	0,990 – 1,017	0,619
Esquema ART com AZT	1,048	2,851	0,592 – 13,735	0,192
Esquemas ART com IP/r	-0,697	0,498	0,231 – 1,075	0,076
Contagem de células T CD4+ <500 céls/μL	1,876	6,526	1,611 – 26,446	0,009
(Intercept)	-2,572	-	-	0,052

IC = intervalo de confiança; IP/r = inibidor de protease com ritonavir; OR = *Odds Ratio*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como nas análises univariadas de associação genética, os genótipos dos polimorfismos rs2069762 (*IL2*+114 G>T), rs3118470 (*IL2R α* T>C) e rs706778 (*IL2R α* T>C) não foram associados com a ocorrência de falha imunológica nas análises multivariadas.

A validação interna do modelo (ou seja, a medição de quão bem o modelo explica os dados) indicou que a análise apresentou boa aderência ($Z=0,534$; $p=0,593$),

significando que o modelo de regressão logística foi adequado para fazer previsões de ocorrência de falha imunológica com base nas variáveis incluídas.

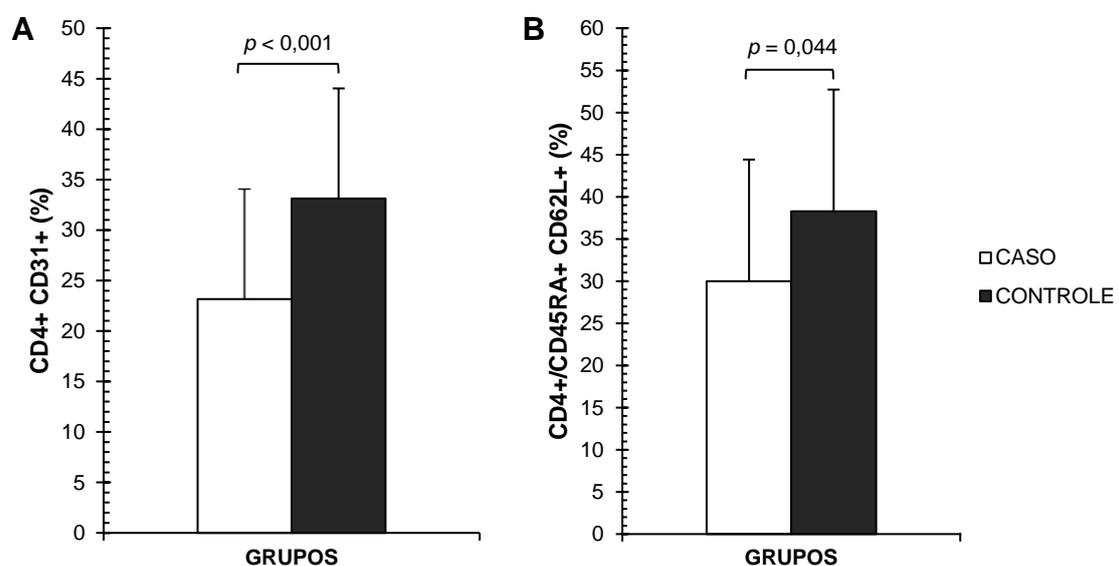
4.4 PRODUÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+

Devido à indisponibilidade de amostras de todos os indivíduos do estudo, apenas 57 pacientes HIV-positivos em ART (29 do grupo caso e 28 do grupo controle) foram incluídos nas análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

A produção tímica dos pacientes em terapia foi analisada pelas células T CD4+ recém emigradas do timo usando a porcentagem do marcador CD31 (CD4+ CD31+) e pelos linfócitos T CD4+ naïve através dos marcadores CD45RA e CD62L (CD4+>CD45RA+CD62L+).

Na imunofenotipagem dos linfócitos T CD4+ recém emigradas do timo foi possível observar que a porcentagem de CD31+ mostrou-se significativamente menor no grupo caso que no controle ($p < 0,001$; Figura 21). O mesmo foi observado na análise dos linfócitos T CD4+ naïve (CD45RA+CD62L+) que foi também estatisticamente menor nos pacientes do grupo caso ($p = 0,044$). Ou seja, esses resultados evidenciam que a produção de linfócitos T CD4+ pelo timo mostrou-se consideravelmente menor nos indivíduos em falha imunológica do que aqueles em sucesso imunológico.

Figura 21 – Produção de linfócitos T CD4+ em relação a expressão do CD31+ (A) e dos marcadores CD45RA+ e CD62L+ (B) nos grupos de sucesso (controle) e falha (caso) imunológica. Valores de média, desvio padrão e *p-value* (teste *t*) são mostrados nos gráficos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A fim de evitar o viés da idade e do sexo na análise, pois são fatores que podem influenciar na produção de linfócitos T CD4+, foi necessário realizar uma correção com estas variáveis através de estatística univariada (Tabela 10). Com base nessa análise, houve uma diferença estatisticamente significativa quanto ao sexo nos grupos estudados ($p=0,03$), onde as mulheres foram mais frequentes no grupo controle que no caso. Dessa forma, o sexo mostrou-se ser um fator de confusão na análise de expressão dos marcadores de produção tímica CD31+ e CD45RA+CD62L+.

Tabela 10 – Testes univariados para os fatores de confusão da análise de produção tímica dos pacientes HIV-positivos em ART.

Variável		Caso n=29 (%)	Controle n=28 (%)	p-value
Sexo	Masculino	17 (58,6)	8 (28,6)	0,03*
	Feminino	12 (41,4)	20 (71,4)	
Idade (Média ± DP)		42 ± 8,86	40 ± 9,02	0,20**

*Teste Exato de Fisher. **Teste *t* (teste de Shapiro-Wilk: $p=0,278$). DP = Desvio padrão.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido a isso, foi realizado uma análise multivariada por regressão logística com sexo, CD31% e CD45RA CD62L% para confirmação da influência desses fatores da recuperação imunológica. A expressão do CD31 manteve-se mais frequente nos indivíduos do grupo de sucesso que no de falha imunológica, com uma diferença estatisticamente significativa ($\beta=-0,094$; $p=0,004$). O mesmo foi observado também para o sexo masculino que se mostrou como um fator de risco ($\beta=1,494$; $p=0,024$), e evidenciando uma maior produção tímica em mulheres e nos pacientes HIV-positivos em sucesso imunológico à terapia antirretroviral. Contudo, a expressão CD45RA+CD62L+ perdeu associação no modelo da regressão logística, mantendo-se apenas como uma tendência ($\beta=-0,033$; $p=0,083$). A validação interna do modelo indicou boa aderência na análise ($z=1,108$; $p=0,268$).

5 DISCUSSÃO

Desde a introdução da ART na prática clínica, a qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes HIV-positivos melhorou consideravelmente (PINZONE et al., 2012; WHO, 2016). Contudo, apesar da eficiência da terapia, um número significativo de indivíduos apresenta reconstituição insuficiente de linfócitos T CD4+ mesmo conseguindo suprimir a carga viral a níveis indetectáveis (CORBEAU; REYNES, 2011; OKOYE; PICKER, 2013; TINCATI et al., 2018). Tendo isso em vista, o presente estudo avaliou a influência de polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2R α* , codificadores de proteínas envolvidas nas vias de proliferação dos linfócitos T CD4, na recuperação imunológica dos pacientes HIV-positivos sob ART. Além disso, verificou os níveis de produção e migração das células T CD4 nesses indivíduos.

Levando em consideração os dados sociodemográficos, o sexo foi associado com a falha imunológica na análise de regressão logística, neste caso o sexo masculino mostrou-se ter maior risco de recuperação imunológica insuficiente quando em terapia antirretroviral. O mesmo foi observado nas análises de linfócitos T CD4 recém emigrados do timo, onde os indivíduos do sexo masculino apresentaram menor porcentagem de CD31, um marcador de função tímica, mostrando assim uma menor produção tímica sob ART. Apesar de alguns estudos demonstrarem resultados controversos (LI et al., 2011; MOORE et al., 2001), acredita-se que o sexo possa influenciar no resultado terapêutico quanto à reconstituição do sistema imune (CASTILHO; MELEKHIN; STERLING, 2014; PIDO-LOPEZ; IMAMI; ASPINALL, 2001). Hunt et al. (2003) observaram em seus estudos que mulheres sob ART obtinham mais linfócitos T CD4+ que homens, e de uma forma mais rápida, sugerindo que o sexo feminino poderia ser um fator de proteção contra a falha imunológica. As razões para isso ainda não estão claras. Acredita-se que mulheres tendem a ter uma melhor resposta tímica à terapia em comparação aos homens, levando a uma maior produção de células T naíve, melhor resposta imune e taxas de mortalidade reduzida (PIDO-LOPEZ; IMAMI; ASPINALL, 2001; TEIXEIRA et al., 2001). Além disso, tem sido observado que indivíduos do sexo feminino tem uma melhor imunidade adaptativa por apresentarem maior contagem de linfócitos T CD4 e maiores taxas de proliferação das células T (KLEIN; FLANAGAN, 2016). Outra explicação plausível poderia ser o efeito antiapoptótico dos esteroides femininos nos linfócitos T CD4+ como evidenciado em outras células do sistema imune, os linfócitos B e neutrófilos (GRIMALDI et al., 2002;

MOLLOY et al., 2003). Mais estudos ainda são necessários para uma melhor compreensão de como o sexo influencia na resposta imunológica dos pacientes HIV-positivos à terapia antirretroviral.

Com relação às variáveis clínicas, nossos resultados evidenciaram a associação da contagem baixa (<500 céls/ μ L) de células T CD4+ no início da terapia com a ocorrência de falha imunológica em ambas as análises (univariada e multivariada por regressão logística), assim como encontrado em outros trabalhos (AIUTI; MEZZAROMA, 2006; HUNT et al., 2003; JEVTOVIĆ et al., 2005; KELLEY et al., 2009; LI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2001). Foi devido a esses tipos de estudos, que em 2015, a WHO passou a recomendar o início da ART assim que os indivíduos são diagnosticados com HIV/AIDS, independentemente da sua contagem de células T CD4 (WHO, 2015). Essa estratégia de intervenção ficou conhecida como “*test and treat*” (testar e tratar), que objetiva eliminar o HIV de circulação, uma vez que reduz a taxa de propagação do vírus para outras pessoas, além de diminuir as taxas de progressão da doença e melhorar os resultados terapêuticos dos pacientes em ART. O *test-and-treat* foi primeiramente sugerido por Granich e colaboradores em 2009, propondo aos países mundiais, através de um modelo matemático, rastrear os indivíduos infectados pelo HIV na população e promover seu tratamento precoce. Um benefício tanto para o indivíduo HIV-positivo quanto para a população geral (GRANICH et al., 2009; NAH et al., 2017).

Além disso, foi observado uma tendência estatisticamente significativa dos indivíduos HIV-positivos com baixa contagem de células T CD4+ pré-tratamento estarem em maior número no grupo caso que no grupo controle. Ou seja, quanto menor a contagem de linfócitos T CD4+ no início da terapia, maior a probabilidade de o indivíduo ter falha imunológica. Da mesma forma foi observado nos estudos de Kelley et al. (2009), que evidenciaram uma correlação negativa na recuperação do sistema imune nos pacientes em ART. Eles observaram que quanto menor o nível de células T CD4+ pré-terapia maior será o tempo de recuperação imunológica, podendo variar de 6 meses até 7 anos. Em outro trabalho, pesquisadores demonstraram que a recuperação imune é menos evidente em pacientes que iniciam ART com imunodeficiência severa (ISGRÒ et al., 2000).

Essa baixa taxa de recuperação imunológica parece ser oriundo de um processo induzido pela infecção do HIV-1 que limita a produção de linfócitos T pelo

timo, devido à exaustão tímica, e aumenta a destruição de células T na circulação, e quando em terapia os indivíduos não conseguem apresentar reconstituição imunológica adequada (CORBEAU; REYNES, 2011; GAARDBO et al., 2012; OKOYE; PICKER, 2013; TEIXEIRA et al., 2001). Isso pôde ser confirmado nas análises de produção tímica por imunofenotipagem, onde os indivíduos em falha imunológica apresentaram uma menor função tímica comparados aos pacientes em sucesso imunológico, como demonstrado pela baixa porcentagem de células T CD4 recém emigradas do timo (CD31%). Esses resultados sugerem que a produção de linfócitos T CD4+ pelo timo pode ser um importante mecanismo de recuperação imunológica dos pacientes HIV-positivos em ART, assim como observado também em outros estudos (KOLTE, 2013; LI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2001). Segundo Li et al. (2011), a exaustão tímica é o principal mecanismo de falha na reconstituição imunológica durante a terapia antirretroviral.

Apesar de não ter sido encontrada associação entre as coinfeções e a ocorrência de falha imunológica, provavelmente devido ao tamanho amostral para essas variáveis, muitos estudos têm reportado que a presença de coinfeções com outros vírus durante a terapia pode retardar a recuperação imunológica (BATTEGAY et al., 2006; JEVTÓVIĆ et al., 2005; KELLEY et al., 2009; MANZARDO et al., 2015).

Quanto às variáveis genéticas, foram analisados cinco polimorfismos: rs2069762 (-330 T>G) e rs2069763 (+114 G>T) no gene *IL2*, rs7072793 (C>T), rs706778 (T>C) e rs3118470 (T>C) no *IL2R α* , selecionados de acordo com critérios funcionais. O polimorfismo rs2069762 é uma alteração nucleotídica que ocorre dentro da região promotora do gene *IL2* e tem sido associado com os altos níveis plasmático da interleucina-2 (AMIRZARGAR et al., 2008; HOFFMANN et al., 2001). Segundo Hoffmann et al. (2001), o polimorfismo na posição -330 interfere na ligação de algum elemento silenciador do gene *IL2*, e como consequência o gene é constantemente expresso resultando no aumento da produção de IL-2. Contudo, nenhum fator de transcrição até o momento foi descrito na região -330 do gene. O mesmo tem se observado para SNP rs2069763, que apesar de ser uma alteração silenciosa, e consequentemente, produzir nenhuma mudança de aminoácido na cadeia polipeptídica da interleucina-2, tem sido também associado em alguns estudos com o aumento da expressão de IL-2 no indivíduo (LIN et al., 2008; PENG et al., 2014). Com isso, esses polimorfismos têm sido reportado como fatores de risco para várias

doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e artrite crônica juvenil, e cânceres (HARSINI et al., 2016; LIN et al., 2008; MADDAH et al., 2016; PARK et al., 2011; WEI et al., 2010; ZHANG et al., 2016a), e como fatores de proteção para algumas doenças infecciosas, como exemplo hepatites B e C (GAO et al., 2009; PENG et al., 2014). No presente trabalho, não houve associação dos alelos nem genótipos do gene *IL2* com a falha imunológica na população de estudo.

Esses estudos que reportaram associação do rs2069763 (T) com essas doenças citadas anteriormente sempre ligavam esse polimorfismo ao SNP rs2069762 (G) da região promotora do *IL2*, sugerindo a formação de haplótipos entre eles, onde o rs2069763 refletia nesses estudos o papel funcional do polimorfismo rs2069762. O mesmo também foi observado em outros trabalhos de associação, que tem reportado a formação do haplótipo GT entre esses SNPs, rs2069762 (G) e rs2069763 (T) (HARSINI et al., 2016; LIN et al., 2008; MADDAH et al., 2016). Contudo, esses estudos foram conduzidos em populações asiáticas, que apresentam um background genético diferente da população brasileira. E isso possa ter refletido nos resultados desse estudo, onde não foi observado formação haplotípica entre esses polimorfismos de acordo com o coeficiente r^2 , mostrando que esses SNPs nessa população analisada não se apresentam como haplótipos.

Alguns estudos têm evidenciado a associação dos polimorfismos rs7072793, rs3118470 e o rs706778 (*IL2R α*) com a alteração na expressão do receptor IL-2R α (CD25). Segundo Li et al. (2013) indivíduos com o alelo rs7072793-T apresentam maiores expressões de CD25 devido ao aumento da atividade do promotor, comparado com os que apresentam rs7072793-C. Acredita-se que a transição alélica de C para T do polimorfismo dentro da região promotora do *IL2R α* ocasiona uma nova combinação no fator de transcrição GATA-1, aumentando a atividade transcricional do gene, e conseqüentemente, levando a uma maior produção do receptor CD25 (CHEN et al., 2017; LI et al., 2013; QU et al., 2009a). Com isso, teríamos um aumento na proliferação das células T CD4, resultando em uma melhor reconstituição imunológica nos pacientes em ART. Porém, nossos resultados não demonstraram um papel desse polimorfismo na recuperação imunológica à terapia anti-HIV.

Os outros dois polimorfismos do gene *IL2R α* (rs3118470 e o rs706778) tem sido associados com a menor expressão gênica, levando a diminuição na produção da proteína CD25, e conseqüentemente, influenciando na sinalização e função da IL-2

nas células T CD4 ativados (OLIVEIRA et al., 2015; QU et al., 2007; SCHWARTZ et al., 2017; STAHL et al., 2010; TANG et al., 2015). Esses polimorfismos mapeiam o primeiro éxon e a região 5' do primeiro íntron do gene *IL2R α* , situados em regiões de ligação à elementos de regulação gênica. Além disso, eles são Tag SNPs de outros polimorfismos que possam também influenciar a expressão do gene (FICHNA et al., 2012; QU et al., 2009a, 2009b). Existem pelo menos seis regiões regulatórias positivas e duas negativas que foram identificadas na regulação da expressão do *IL2R α* , que localizam-se desde a região promotora até o íntron 1 do gene (KAWASAKI et al., 2009; KIM; IMBERT; LEONARD, 2006). De acordo com Kawasaki et al. (2009), os polimorfismos rs3118470T>C e rs706778T>C encontram-se em regiões importantes de ligação a esses elementos reguladores. Sendo assim, é possível que esses SNPs possam estar envolvidos na regulação transcricional do *IL2R α* , podendo afetar na produção do CD25 e conduzindo à uma proliferação reduzida dos linfócitos T CD4+. Como consequência, os indivíduos poderiam apresentar uma recuperação imunológica insuficiente à terapia antirretroviral. Contudo, o presente estudo não evidenciou um papel desses Tag SNPs na falha imunológica da ART.

Ademais, não foi observado na população estudada formação haplotípica entre os polimorfismos do gene *IL2R α* (rs7072793, rs3118470 e rs706778). Nesta análise foi utilizado como base o coeficiente r^2 de LD por ser uma medida consideravelmente mais robusta para análise haplotípica que o D' , que é um coeficiente pouco recomendado para estudos de associação devido sua limitação para análises com tamanho amostral pequeno e baixa frequência alélica (DU; CLUTTER; LOHUIS, 2007; HEDRICK; KUMAR, 2001; MUELLER, 2004). Com isso, devido os valores de r^2 serem baixos, esses polimorfismos não poderiam ser Tag SNPs um do outro por não fornecerem a mesma informação. Ou seja, para fins de mapeamento gênico ou associação torna-se necessário a utilização de ambos os polimorfismos no estudo.

Existem diversos fatores envolvidos na reconstituição imunológica dos pacientes HIV-positivos em ART (CORBEAU; REYNES, 2011; OKOYE; PICKER, 2013; PINZONE et al., 2012). No presente estudo, foi possível observar que os polimorfismos analisados nos genes da via de ativação e proliferação dos linfócitos T CD4 (*IL2/IL2R α*) não foram fatores determinantes para a recuperação imunológica na população estudada pois a produção tímica mostrou-se influenciar mais na reconstituição imune dos pacientes em terapia anti-HIV. Ainda assim, não se pode

excluir os mecanismos genéticos envolvidos na recuperação imunológica desses pacientes. Podem haver outras alterações genéticas, como polimorfismos em outros genes, ou outras variações nos mesmos genes estudados, que possam influenciar na reconstituição imunológica dos indivíduos HIV-positivos em ART, ou até mesmo, na produção dos linfócitos T CD4, visto que foram observadas diferenças no fenótipo desses indivíduos.

Em resumo, os presentes resultados mostram que, das variáveis sociodemográficas e clínicas analisadas, apenas o sexo masculino e o início da ART com contagem de células T CD4+ <500 céls/ μ l estiveram associados com a maior probabilidade de falha imunológica. Além disso, a produção tímica (linfócitos naive e recém emigrados do timo) foi um importante mecanismo de reconstituição imunológica dos pacientes em terapia, que foi influenciada também pelo sexo. É provável que esses fatores afetem a produção e proliferação dos linfócitos T CD4+ e, com isso, influenciem na resposta imunológica dos pacientes HIV-positivos em terapia antirretroviral.

6 CONCLUSÕES

- Dos aspectos sociodemográficos e clínicos, o sexo masculino e o início da ART com contagem de células T CD4+ <500 céls/ μ l mostraram-se influenciar na recuperação imunológica dos pacientes em terapia anti-HIV, sendo fatores de risco para falha imunológica.
- A produção de linfócitos T CD4 pelo timo (linfócitos T CD4 naive e recém emigrados do timo) foi um mecanismo importante para reconstituição imune, onde a função tímica mostrou-se ser maior nos indivíduos do grupo sucesso imunológico do que nos do grupo falha imunológica.
- Não houve evidência na população estudada de que os polimorfismos nos genes *IL2* e *IL2R α* possuam influência na resposta imunológica dos indivíduos infectados pelo HIV em ART.

O presente estudo também apresentou algumas limitações, tais com tamanho amostral nas análises de imunofenotipagem e informações incompletas dos prontuários médicos. Apesar das limitações, o estudo permitiu entender melhor alguns dos fatores e mecanismos envolvidos na recuperação imunológica dos pacientes HIV-positivos submetidos ao tratamento antirretroviral. Contudo, mais estudos ainda são necessários para que os mecanismos envolvidos na resposta imune à ART possam ser elucidados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. CITOCINAS. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 268–301.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND THE ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 9th editio ed. Philadelphia: Elsevier, 2018a. p. 475–87.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Activation of T Lymphocytes. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 9th editio ed. Philadelphia: Elsevier, 2018b. p. 209–223.
- ABRAMS, D. et al. Interleukin-2 Therapy in Patients with HIV Infection. *N Engl J Med*, v. 361, n. 16, p. 1548–59, 2009.
- ACETI, A. et al. Pharmacogenetics as a tool to tailor antiretroviral therapy: a review. *World Journal of Virology*, v. 4, n. 3, p. 198–208, 2015.
- AIUTI, F.; MEZZAROMA, I. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS Rev*, v. 8, p. 88–97, 2006.
- AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 127, n. 3, p. 701–721, 2011.
- ALDOUS, J. L.; HAUBRICH, R. H. Defining treatment failure in resource-rich settings. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 4, n. 6, p. 459–66, nov. 2009.
- ALKHATIB, G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 4, n. 2, p. 96–103, 2009.
- AMIRZARGAR, A. A. et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian populations. *European Cytokine Network*, v. 19, n. 2, p. 104–112, 2008.
- ARAÚJO, L.; ALMEIDA, S. HIV-1 Diversity in the Envelope Glycoproteins: Implications for Viral Entry Inhibition. *Viruses*, v. 5, n. 2, p. 595–604, 2013.
- ARENAS-RAMIREZ, N.; WOYTSCHAK, J.; BOYMAN, O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends in Immunology*, v. 36, n. 12, p. 763–777, 2015.
- ASENSI, V.; COLLAZOS, J.; VALLE-GARAY, E. Can antiretroviral therapy be tailored to each human immunodeficiency virus-infected individual? Role of pharmacogenomics. *World Journal of Virology*, v. 4, n. 3, p. 169–177, 2015.
- BABRON, M.-C. et al. Determination of the real effect of genes identified in GWAS: the example of IL2RA in multiple sclerosis. *European Journal of Human Genetics*, p. 1–5, 2011.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p.

868–871, jan. 1983.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Micro.*, v. 11, n. 12, p. 877–883, 2013.

BATTEGAY, M. et al. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet. Infectious diseases*, v. 6, n. 5, p. 280–7, 1 maio 2006.

BLUMENTHAL, R.; DURELL, S.; VIARD, M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J Biol Chem*, v. 287, n. 49, p. 40841–40849, 2012.

BOYMAN, O.; KOLIOS, A. G. A.; RAEBER, M. E. Modulation of T cell responses by IL-2 and IL-2 complexes. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 33, n. Suppl. 92, p. 54–57, 2015.

BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 3, p. 180–190, 2012.

BRANDENBERG, O. F. et al. The HIV-1 Entry Process: A Stoichiometric View. *Trends in Microbiology*, v. 23, n. 12, p. 763–774, 2015.

BRIGGS, J. A. G.; KRÄUSSLICH, H.-G. The Molecular Architecture of HIV. *Journal of Molecular Biology*, v. 410, p. 491–500, 2011.

BROCKER, C. et al. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human Genomics*, v. 5, n. 1, p. 30, 2010.

BUNTING, K.; WANG, J.; SHANNON, M. F. Control of Interleukin-2 Gene Transcription: A Paradigm for Inducible, Tissue-Specific Gene Expression. *Vitamins and Hormones*, v. 74, n. 06, p. 105–145, 2006.

CARTER, C. A.; EHRLICH, L. S. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annual Review of Microbiology*, v. 62, p. 425–43, 11 jan. 2008.

CASTILHO, J. L.; MELEKHIN, V. V; STERLING, T. R. Sex differences in HIV outcomes in the highly active antiretroviral therapy era: a systematic review. *AIDS research and human retroviruses*, v. 30, n. 5, p. 446–56, maio 2014.

CDC. Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 31, p. 1–3, 1981.

CDC. Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS): Precautions for Clinical and Laboratory Staffs. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 31, n. 37, p. 507–508, 1982.

CDC. Current Trends Prevention of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS): Report of Inter-Agency Recommendations. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 32, p. 101–103, 1983.

- CHEN, J. et al. Genome-wide association study identifies MAPT locus influencing human plasma tau levels. *Neurology*, v. 88, n. 7, p. 669–676, 2017.
- COHEN, M. S. et al. Acute HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*, v. 364, n. 20, p. 1943–1954, 2013.
- CORBEAU, P.; REYNES, J. Immune reconstitution under antiretroviral therapy : the new challenge in HIV-1 infection. *BLOOD*, v. 117, n. 21, p. 5582–90, 2011.
- CORY, T.; SCHACKER, T. Overcoming pharmacologic sanctuaries. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 8, n. 3, p. 190–195, 2013.
- CRISPÍN, J. C.; TSOKOS, G. C. Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, v. 8, n. 3, p. 190–195, 2009.
- DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 3, p. 695–747, 2016.
- DEEKS, S. G. et al. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nature Medicine*, v. 22, n. 8, 11 jul. 2016.
- DO, H. et al. Associations of the IL2Ralpha, IL4Ralpha, IL10Ralpha, and IFN (gamma) R1 cytokine receptor genes with AIDS progression in a French AIDS cohort. *Immunogenetics*, v. 58, n. 2–3, p. 89–98, 2006.
- DOITSH, G.; GREENE, W. C. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost during HIV Infection. *Cell Host and Microbe*, v. 19, n. 3, p. 280–291, 2016.
- DONNELLY, M. R.; CIBOROWSKI, P. Proteomics, biomarkers, and HIV-1: A current perspective. *Proteomics - Clinical Applications*, v. 10, n. 2, p. 110–125, 2016.
- DU, F.-X.; CLUTTER, A. C.; LOHUIS, M. M. Characterizing linkage disequilibrium in pig populations. *International journal of biological sciences*, v. 3, n. 3, p. 166–78, 10 fev. 2007.
- DUMAS, F.; PREIRA, P.; SALOME, L. Membrane organization of virus and target cell plays a role in HIV entry. *Biochimie*, v. 107, p. 22–27, 2014.
- ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, p. 279–90, 2012.
- FANALES-BELASIO, E. et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, v. 46, n. 1, p. 5–14, 2010.
- FESSEL, W. J. et al. Dissociation of Immunologic and Virologic Responses to Highly Active Antiretroviral Therapy. *JAIDS*, v. 23, p. 314–320, 2000.
- FICHNA, M. et al. Polymorphic variants of the IL2RA gene and susceptibility to type 1 diabetes in the Polish population. *Tissue Antigens*, v. 79, n. 3, p. 198–203, 2012.

FIETTA, P.; COSTA, E.; DELSANTE, G. Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part I: ILs from IL-1 to IL-19. *Theoretical biology forum*, v. 107, n. 1–2, p. 13–45, 2014.

FIETTA, P.; COSTA, E.; DELSANTE, G. Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part II: ILs from IL-20 to IL-38. *Theoretical biology forum*, v. 107, n. 1–2, p. 19–40, 2015.

FRASER, C. et al. Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: an evolutionary perspective. *Science (New York, N.Y.)*, v. 343, n. 6177, p. 1243727, 2014.

FUJITA, T. et al. Structure of the human interleukin 2 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 80, n. 24, p. 7437–41, 1983.

GAARDBO, J. C. et al. Incomplete immune recovery in HIV infection: Mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, v. 28, n. 3, p. 109–123, 2004.

GALLO, R. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 865–867, 1983.

GAO, Q.-J. et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, v. 15, n. 44, p. 5610–9, 28 nov. 2009.

GOLDSTEIN, D. B. Genomics meets HIV-1. *Nat. Rev. Micro.*, v. 4, n. 11, p. 865–873, 2006.

GOLUBOVSKAYA, V.; WU, L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers*, v. 8, n. 3, 2016.

GOUDY, K. et al. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clinical Immunology*, v. 146, n. 3, p. 248–261, 2013.

GRANICH, R. M. et al. Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model. *The Lancet*, v. 373, n. 9657, p. 48–57, 2009.

GRIMALDI, C. M. et al. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *The Journal of clinical investigation*, v. 109, n. 12, p. 1625–33, jun. 2002.

GRIMES, D. A.; SCHULZ, K. F. An overview of clinical research: the lay of the land. *Lancet (London, England)*, v. 359, n. 9300, p. 57–61, 2002.

GUIHOT, A.; TUBIANA, R.; BRETON, G. ET AL. Immune and virological benefits of

10 years of permanent viral control with antiretroviral therapy. *AIDS*, v. 24, p. 614–17, 2010.

HAAS, D. W. et al. Immunogenetics of CD4 lymphocyte count recovery during antiretroviral therapy: An AIDS Clinical Trials Group study. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 194, n. 8, p. 1098–107, 15 out. 2006.

HARSINI, S. et al. Association of interleukin-2 and interferon- γ single nucleotide polymorphisms with Juvenile systemic lupus erythematosus. *Allergologia et Immunopathologia*, v. 44, n. 5, p. 422–426, 2016.

HEDRICK, P.; KUMAR, S. Mutation and linkage disequilibrium in human mtDNA. *European Journal of Human Genetics*, v. 9, n. 12, p. 969–972, 2001.

HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, n. 3, p. 182–192, 2012.

HILL, A.; POZNIAK, A. HIV treatment cascades : how can all countries reach the UNAIDS 90 – 90 – 90 target ? *AIDS*, v. 29, n. 18, p. 2523–25, 2015.

HOFFMANN, S. C. et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*, v. 72, n. 8, p. 1444–1450, 2001.

HUNT, P. W. et al. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. *AIDS*, v. 17, n. 13, p. 1907–1915, 2003.

HUTCHINSON, J. F. The Biology and Evolution of HIV. *Annual Review of Anthropology*, v. 30, n. May, p. 85–108, 2001.

HYMES, K. B. ET AL. Kaposi's sarcoma in homosexual man: A report of eight cases. *Lancet*, v. 2, n. 8247, p. 598–600, 1981.

ISGRÒ, A. et al. Recovery of hematopoietic activity in bone marrow from human immunodeficiency virus type 1-infected patients during highly active antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses*, v. 16, n. 15, p. 1471–9, 10 out. 2000.

JAFFAR, S. et al. The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 82, n. 6, p. 462–469, 2004.

JEVTOVIĆ, D. et al. The dissociation between virological and immunological responses to HAART. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 59, n. 8, p. 446–451, 2005.

JOHN, S. et al. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. *European Journal of Immunogenetics*, v. 25, n. 6, p. 419–420, 1998.

- KAWASAKI, E. et al. Genetic association between the interleukin-2 receptor-alpha gene and mode of onset of type 1 diabetes in the Japanese population. *Endocrine research*, v. 94, n. 3, p. 947–52, 2009.
- KELLEY, C. F. et al. Incomplete Peripheral CD4+ Cell Count Restoration in HIV-Infected Patients Receiving Long-Term Antiretroviral Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, n. 6, p. 787–794, 15 mar. 2009.
- KIM, H. P.; IMBERT, J.; LEONARD, W. J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 17, n. 5, p. 349–366, 1 out. 2006.
- KLATZMANN, D.; ABBAS, A. K. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 5, p. 283–294, 2015.
- KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 10, p. 626–638, 2016.
- KOLTE, L. Thymic function in HIV-infection. *Danish Medical Journal*, v. 60, n. 4, p. 44–52, 2013.
- LE MOING, V. et al. Predictors of long-term increase in CD4(+) cell counts in human immunodeficiency virus-infected patients receiving a protease inhibitor-containing antiretroviral regimen. *J Infect Dis*, v. 185, n. 4, p. 471–480, 2002.
- LEDERGERBER, B. et al. Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. *Lancet*, v. 353, n. 9156, p. 863–68, 1999.
- LEONARD, W. J. CYTOKINES AND IMMUNODEFICIENCY DISEASES. *Nature Reviews Immunology*, v. 1, p. 200–208, 2001.
- LI, G.; DE CLERCQ, E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR)*, v. 80, n. 3, p. 679–731, 2016.
- LI, H. et al. Functional polymorphism rs7072793 C>T affect individual susceptibility to breast cancer by modulating CD25 transcription activity. *Molecular Carcinogenesis*, v. 52, n. 5, p. 370–376, 2013.
- LI, T. et al. Reduced thymic output is a major mechanism of immune reconstitution failure in HIV-infected patients after long-term antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 53, n. 9, p. 944–51, nov. 2011.
- LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, v. 23, n. 5, p. 598–604, 2011.
- LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*, v. 38, n. 1, p. 13–25, 2013.

- LIHANA, R. W. et al. Update on HIV-1 diversity in Africa: A decade in review. *AIDS Reviews*, v. 14, n. 2, p. 83–100, 2012.
- LIMA, V. D. et al. Continued improvement in survival among HIV-infected individuals with newer forms of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, v. 21, n. 6, p. 685–692, 2007.
- LIN, Y. J. et al. G/T polymorphism in the interleukin-2 exon 1 region among Han Chinese systemic lupus erythematosus patients in Taiwan. *Clinical Immunology*, v. 129, n. 1, p. 36–39, 2008.
- LIU, C. et al. HIV-1 functional cure: will the dream come true? *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 284, 2015.
- LÓPEZ-ABENTE, J.; CORREA-ROCHA, R.; PION, M. Functional Mechanisms of Treg in the Context of HIV Infection and the Janus Face of Immune Suppression. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. May, p. 1–14, 2016.
- LU, Y. et al. A negative regulatory element-dependent inhibitory role of ITF2B on IL-2 receptor α gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 336, n. 1, p. 142–149, 2005.
- MA, A.; KOKA, R.; BURKETT, P. Diverse Functions of Il-2, Il-15, and Il-7 in Lymphoid Homeostasis. *Annual Review of Immunology*, v. 24, n. 1, p. 657–679, 2006.
- MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 2014.
- MADDAH, M. et al. Association of Interleukin-2, but not Interferon-Gamma, single nucleotide polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis. *Allergologia et Immunopathologia*, p. 2–5, 2016.
- MAHNKE, Y. D. et al. Early immunologic and virologic predictors of clinical HIV-1 disease progression. *AIDS*, v. 27, n. 5, p. 697–706, 2013.
- MALEK, T. R. The Biology of Interleukin-2. *Annual Review of Immunology*, v. 26, n. 1, p. 453–479, 2008.
- MALEK, T. R.; BAYER, A. L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature reviews. Immunology*, v. 4, n. September, p. 665–674, 2004.
- MANN, J. M.; CHIN, J. AIDS: a global perspective. *New England Journal of Medicine*, v. 319, n. 5, p. 302–3, 4 ago. 1988.
- MANZARDO, C. et al. Opportunistic infections and immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1-infected adults in the combined antiretroviral therapy era: a comprehensive review. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 13, n. 6, p. 751–67, 2015.

MASUR, H. . ET AL. An Outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *New England Journal of Medicine*, v. 305, n. 24, p. 1431–1438, 1981.

MATESANZ, F. et al. Allelic selection of human IL-2 gene. *European Journal of Immunology*, v. 30, n. 12, p. 3516–3521, 2000.

MICHAUD, V. et al. The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition. *Pharmacological Reviews*, v. 64, n. 3, p. 803–33, jul. 2012.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v. 16, n. 3, p. 1215, 11 fev. 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV: Tratamento e prevenção Ministério da Saúde. [s.l: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes tereapêuticas para profilaxia antirretroviral pós-exposição de risco à infecção pelo HIV Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l: s.n.].

MIZEL, S. B.; FARRAR, J. J. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors. *The Journal of Immunology*, v. 48, n. 2, p. 433–36, dez. 1979.

MOLLOY, E. J. et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood*, v. 102, n. 7, p. 2653–59, 2003.

MOORE, A. T. et al. Gender Differences in Virologic Response to Treatment in an HIV-Positive Population: A Cohort Study. *JAIDS*, v. 26, n. 2, p. 159–163, 2001.

MORGAN, D. A.; RUSCETTI, F. W.; GALLO, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science (New York, N.Y.)*, v. 193, n. 4257, p. 1007–8, 10 set. 1976.

MORRIS, J. C.; WALDMANN, T. A. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 59, n. suppl I, p. 109–114, 2000.

MOUREZ, T.; SIMON, F.; PLANTIER, J.-C. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 3, p. 448–61, 2013.

MUELLER, J. C. Linkage disequilibrium for different scales and applications.

Briefings in bioinformatics, v. 5, n. 4, p. 355–364, 2004.

NAH, K. et al. Test-and-treat approach to HIV/AIDS: A primer for mathematical modeling. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2017.

NAIF, H. M. Pathogenesis of HIV infection. *Infectious Disease Reports*, v. 5, n. supl.1, p. 26–30, 2013.

OKOYE, A. A.; PICKER, L. J. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunological reviews*, v. 254, n. 1, p. 54–64, 2013.

OLIVEIRA, P. R. S. et al. IL2RA Genetic Variants Reduce IL-2–Dependent Responses and Aggravate Human Cutaneous Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 6, p. 2664–2672, 2015.

ONWUMEH, J.; CI, O.; KREDO, T. Interleukin-2 as an adjunct to antiretroviral therapy for HIV- positive adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 5, 2017.

PARK, S. J. et al. Impact of IL2 and IL2RB genetic polymorphisms in kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, v. 43, n. 6, p. 2383–2387, 2011.

PAU, A. K.; GEORGE, J. M. Antiretroviral Therapy: Current Drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 28, n. 3, p. 371–402, 2014.

PEETERS, M.; JUNG, M.; AYOUBA, A. The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 11, n. 9, p. 885–896, 2013.

PENG, Q. et al. Association of IL-2 polymorphisms and IL-2 serum levels with susceptibility to HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese Zhuang population. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 27, p. 375–381, 2014.

PESSÔA, R.; SABINO, E. C.; SANABANI, S. S. Frequency of coreceptor tropism in PBMC samples from HIV-1 recently infected blood donors by massively parallel sequencing: the REDS II study. *Virology Journal*, v. 12, n. 74, p. 1–7, 2015.

PHILLIPS, H. J. Dye Exclusion Tests for Cell Viability. In: *Tissue Culture*. [s.l.] Elsevier, 1973. p. 406–408.

PIDO-LOPEZ, J.; IMAMI, N.; ASPINALL, R. Both age and gender affect thymic output: More recent thymic migrants in females than males as they age. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 125, n. 3, p. 409–413, 2001.

PINZONE, M. R. et al. HIV RNA suppression and immune restoration: Can we do better? *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.

QU, H.-Q. et al. Toward Further Mapping of the Association Between the IL2RA Locus and Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 56, p. 1174–76, 2007.

QU, H.-Q. et al. The type I diabetes association of the IL2RA locus. *Genes and*

Immunity, v. 10, p. S42–S48, 2009a.

QU, H.-Q. et al. A cis-Acting Regulatory Variant in the IL2RA Locus. *The Journal of Immunology*, v. 183, p. 5158–62, 2009b.

READ, K. A. et al. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4+ T helper cell differentiation. *Experimental Hematology*, v. 44, n. 9, p. 799–808, 2016.

ROCHMAN, Y.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, 2009.

SALEMI, M.; RIFE, B. Phylogenetics and Phyloanatomy of HIV / SIV Intra-Host Compartments and Reservoirs : The Key Role of the Central Nervous System. *Current HIV Research*, v. 14, p. 110–120, 2016.

SCHLUNS, K. S.; LEFRANÇOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature reviews. Immunology*, v. 3, n. 4, p. 269–279, 2003.

SCHWARTZ, A. M. et al. Multiple single nucleotide polymorphisms in the first intron of the IL2RA gene affect transcription factor binding and enhancer activity. *Gene*, v. 602, p. 50–56, 2017.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 1, n. 1, p. 1–22, 2011.

SMITH, C. J. et al. The potential for CD4 cell increases in HIV-positive individuals who control viraemia with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, v. 17, n. 7, p. 963–969, 2003.

SPANGLER, J. B. et al. Insights into Cytokine–Receptor Interactions from Cytokine Engineering. *Annual Review of Immunology*, v. 33, n. 1, p. 139–167, 2015.

STAHL, E. A. et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature Genetics*, v. 42, n. 6, p. 508–514, 2010.

STEVENSON, M. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*, v. 9, n. 7, p. 853–60, 2003.

SWANSTROM, R.; COFFIN, J. HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 12, p. a007443, dez. 2012.

TANG, W. et al. Association of common polymorphisms in the IL2RA gene with type 1 diabetes: Evidence of 32,646 individuals from 10 independent studies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 19, n. 10, p. 2481–2488, 2015.

TANIGUCHI, T. et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, v. 302, p. 305–310, 1983.

TEIXEIRA, L. et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS*, v. 15, n. 14, p. 1749–56, 2001.

TENBROCK, K.; TSOKOS, G. C. Transcriptional regulation of interleukin 2 in SLE T

cells. *International reviews of immunology*, v. 23, p. 333–345, 2004.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. *Nature*, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.

TINCATI, C. et al. Is weak CD4+ gain in the course of suppressive combination antiretroviral therapy for HIV infection a current clinical challenge? A case report and brief review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. 8, 2018.

TOZZI, V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Research*, v. 85, n. 1, p. 190–200, jan. 2010.

TSENG, A.; SEET, J.; PHILLIPS, E. J. The Evolution of Three Decades of Antiretroviral Therapy: Challenges, Triumphs and the Promise of the Future. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2014.

TURNER, B. J.; HECHT, F. M.; ISMAIL, R. B. CD4+ T-lymphocyte measures in the treatment of individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. A review for clinical practitioners. *Arch. Intern Med.*, v. 154, n. 14, p. 1561–73, 1994.

UNAIDS. Global AIDS UPDATE. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-15080170>>.

UNAIDS. Fact sheet - Latest statistics on the status of the AIDS epidemic. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf>. Acesso em: 17 maio. 2018a.

UNAIDS. Ending AIDS: Progress towards the 90-90-90 targets. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), p. 1–198, 2017b.

UNAIDS. UNAIDS DATA 2017. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2017_data-book_en.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2017c.

VAILLANT, A. A. J.; QURIE, A. Interleukin. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763015>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

VUILLEUMIER, S.; BONHOEFFER, S. Contribution of recombination to the evolutionary history of HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 10, n. 2, p. 84–89, 2015.

WALDMANN, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 8, p. 595–601, 2006.

WATTS, J. M. et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, v. 460, n. 7256, p. 711–6, 6 ago. 2009.

WEI, Y.-S. et al. Association of the interleukin-2 polymorphisms with interleukin-2 serum levels and risk of nasopharyngeal carcinoma. *DNA and Cell Biology*, v. 29, n. 7, p. 363–368, 2010.

WHO. Guidelines Guideline on When To Start Antiretroviral Therapy and on Pre-Exposure Prophylaxis for HivWorld Health Organization. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/earlyrelease-arv/en/>>.

WHO. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health ApproachWorld Health Organization. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208825/1/9789241549684_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 22 ago. 2017.

WHO. Number of people (all ages) living with HIV. Disponível em: <http://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/cases_all/en/>. Acesso em: 16 ago. 2017a.

WHO. Transition to new antiretrovirals in HIV programmesWorld Health Organization. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/pub/toolkits/transition-to-new-arv/en/>>.

WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 8, 2012.

WOLFF, M. J. et al. A decade of HAART in Latin America: Long term outcomes among the first wave of HIV patients to receive combination therapy. *PLoS ONE*, v. 12, n. 6, p. 1–15, 2017.

YUZHALIN, A. E.; KUTIKHIN, A. G. List of Human Interleukins. In: *Interleukins in Cancer Biology*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 331–344.

ZAKHOUR, R. et al. CD31 expression on CD4+cells: A simple method for quantitation of recent thymus emigrant CD4 cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 4, p. 970–972, 2016.

ZHANG, M. et al. Association between two interleukin-2 gene polymorphisms and cancer susceptibility: a meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*, v. 9, p. 2181–92, jan. 2016a.

ZHANG, Y. et al. HIV-1 Infection-Induced Suppression of the Let-7i/IL-2 Axis Contributes to CD4(+) T Cell Death. *Scientific reports*, v. 6, n. 25341, jan. 2016b.

ZYL, G. VAN; BALE, M. J.; KEARNEY, M. F. HIV evolution and diversity in ART-treated patients. *Retrovirology*, v. 15, n. 14, 30 dez. 2018.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Fatores Genéticos Humanos Envolvidos no Curso da Infecção pelo HIV: Transmissão Vertical, Imunidade e Resposta à Terapia Antirretroviral

Pesquisador responsável

Antonio Victor Campos Coelho

Local de trabalho: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE. CEP: 50670-901. Telefone: 2101-2542

antonio.victor@ufpe.br

Médico supervisor da pesquisa

Luiz Cláudio Arraes de Alencar (IMIP)

lularraes@hotmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa

Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, Recife, PE.

Diretoria de Pesquisa, Prédio Orlando Onofre, 1º Andar.

Funcionamento: 2ª a 6ª feira, 7h às 11h30/13h30 às 16h.

Telefone: 2122-4756

comitedeetica@imip.org.br

Convidamos você a participar de uma pesquisa que estamos realizando sobre diferenças genéticas envolvidas no comportamento do HIV no organismo. Algumas pessoas combatem melhor o vírus que outras durante a infecção; outras respondem melhor à terapia com os antirretrovirais. Além disso, algumas crianças adquirem o vírus durante o parto ou amamentação (transmissão vertical), enquanto outras não. Estamos fazendo essa pesquisa para tentar descobrir se diferenças genéticas expliquem essa diferença entre as pessoas convivendo com o HIV e pretendemos recrutar 400 voluntários ao todo. Essa pesquisa é importante porque poderá contribuir para que no futuro os médicos melhorem os tratamentos contra o HIV. Além disso, você poderá solicitar aos pesquisadores que comuniquem os resultados a você e a seu médico para que ele avalie se você obteria benefícios com as descobertas.

Com sua autorização, gostaríamos de realizarmos entre uma e cinco coletas de pequenas quantidades do seu sangue (no máximo 8 mL por coleta), colhidas durante os exames de rotina de acompanhamento da infecção pelo HIV. Caso sejam necessárias mais de uma coleta, elas serão feitas a cada três ou quatro meses, de acordo com a rotina de suas consultas. Solicitamos também a sua autorização para utilizar dados do prontuário, como idade que iniciou o acompanhamento médico e os resultados dos seus últimos exames de rotina para avaliar o controle do HIV. Como a Genética está em constante evolução, é possível que novas pesquisas além desta sejam realizadas com suas informações e material biológico armazenados. Caso isso

ocorra, os pesquisadores entrarão em contato com o comitê de ética e com você para solicitar nova autorização.

Informamos que o material contribuído por você será armazenado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), que fica na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Seu material não será enviado a outros pesquisadores brasileiros ou estrangeiros, permanecendo apenas no LIKA. O endereço do LIKA e as formas de contato com os pesquisadores estão no começo desse documento.

Informamos que os riscos que você corre ao participar da pesquisa são apenas sintomas provocados pela coleta do sangue como: vermelhidão e dor no braço no local da coleta e enjoo. Além disso, todas as suas informações pessoais estarão seguras. Nenhuma pessoa fora da pesquisa terá acesso a elas.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária. Não haverá nenhum gasto pela sua participação, não recebendo cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento ou benefício financeiro pela sua participação. Da mesma forma, não haverá nenhum prejuízo a você caso não queira participar ou desistir de participar desta pesquisa.

Caso você se sinta prejudicado (a) pelo andamento da pesquisa, asseguramos que você receberá todas as assistências cabíveis neste hospital, incluindo o direito de solicitar indenização aos pesquisadores por eventuais danos. Caso você possua alguma dúvida acerca dos objetivos do estudo, por favor, entre em contato com os responsáveis pela pesquisa. Além disso, se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, também pode entrar em contato com o comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP), que objetiva defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas.

Eu, _____

(nome completo) compreendi as informações repassadas e autorizo que seja realizada a avaliação genética da amostra de sangue coletada, e concordo que os dados obtidos sejam utilizados para pesquisa. Declaro que fui informado (a) pela equipe do pesquisador Sergio Crovella sobre os objetivos da pesquisa e estou consciente de que:

1. Concordei em participar da pesquisa sem nenhum tipo de pressão;

2. Posso a qualquer momento entrar em contato por telefone com o pesquisador se tiver qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa;
3. Posso a qualquer momento desistir de participar da pesquisa, sem que isso prejudique meu atendimento no hospital;
4. O pesquisador poderá ter acesso ao meu prontuário e que minhas informações pessoais serão mantidas em sigilo;
5. Recebi uma cópia deste documento.

Assinatura do Voluntário	
Assinatura da Testemunha	Assinatura da Testemunha
Assinatura do Pesquisador Responsável	
Número do prontuário	Código de amostra
Inclusão no Braço (Transmissão vertical do HIV) C do estudo?	
SIM ()	NÃO ()
Se SIM, aplicar o termo de assentimento para a coleta do (a) filho (a) da paciente.	

ANEXO B – QUESTIONÁRIOS E FORMULÁRIOS DE ACOMPANHAMENTO

FORMULÁRIO A – RECRUTAMENTO: COLETA DE DADOS CLÍNICOS

1. Dados pessoais (apenas para identificação, NÃO serão divulgados)

Nome do Paciente			
Data de Nascimento	Naturalidade	Cidade de residência	Sexo
			M () F ()

2. Informações clínicas e epidemiológicas

Etnia (segundo classificação do IBGE)		Escolaridade (anos)	Renda mensal (reais)
() Branca	() Indígena		
() Negra	() Amarela		
() Parda	() Ignorado		
Peso (kg)		Altura (m)	
Fumo		Etilismo	
SIM ()		SIM ()	
Se SIM, quantos cigarros por dia? _____		Se SIM, quantas un. por semana? _____	
NÃO ()		NÃO ()	
Se NÃO, parou de fumar? SIM () NÃO ()		Se NÃO, parou de beber? SIM () NÃO ()	
Comorbidades pré-existentes			
Desordem Psiquiátricas	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença autoimune	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença cardiovascular	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Diabetes	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença renal	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Doença de fígado	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Osteoporose	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Se SIM, houve fratura?	SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()
Local da fratura:			

3. Infecção pelo HIV

Modo de transmissão (marcar todos que se aplicarem)		
() Transmissão vertical	() Relação sexual heterossexual	
() Relação sexual homossexual	() Transfusão sanguínea	
() Durante tratamento para hemofilia	() Acidente com material biológico	
() Uso de drogas injetáveis	() IGNORADO	
Idade de Início da vida sexual	Data de diagnóstico de infecção pelo HIV	
Possui parceiro(a) fixo(a)?		
SIM ()	NÃO (SOLTEIRO(A)) ()	MÚLTIPLOS PARCEIROS(AS) ()
O paciente é usuário de drogas?	SIM () Qual? _____ NÃO ()	

Se a paciente for mulher, ela está atualmente grávida?				
SIM ()		Mês de gestação: _____		NÃO ()
O(a) paciente tem filhos?				
Nº	Idade	Sexo	Tipo de parto	Status de HIV
1		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
2		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
3		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
4		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()
5		M () F ()	normal () cesariana ()	POS () NEG ()

4. Perspectivas do paciente acerca do acompanhamento médico

O paciente concorda com a seguinte frase: "Posso ter uma vida normal se for acompanhado(a) pelo médico e seguir suas orientações"?				
SIM ()		NÃO ()		
Como o paciente considera as consultas médicas?				
Muito importantes ()	Importantes ()	Indiferente ()	Pouca importância ()	Sem importância ()
O que o paciente acha do atendimento no hospital?				
Bom ()	Regular ()		Ruim ()	
Com relação às consultas, o quão frequentemente o paciente falta a elas?				
Muitas vezes ()	Algumas vezes ()	Ocasionalmente ()	Raramente ()	Nunca ()
Considerando as condições financeiras, de transporte, de trabalho, dentre outras, do paciente, como ele(ela) diria o quão fácil é chegar no hospital?				
Muito fácil ()	Fácil ()	Normal ()	Difícil ()	Muito difícil ()
Considerando as visitas anteriores ao hospital, o(a) paciente estaria disposto(a) a continuar o tratamento no hospital, ou seja, voltaria nas próximas consultas?				
SIM ()		NÃO ()		

5. Coinfecções, infecções oportunistas e doenças definidoras de AIDS (ver no prontuário)

				Datas
Sorologia para Hepatite B?	POS ()	NEG ()	IGN ()	
Sorologia para Hepatite C?	POS ()	NEG ()	IGN ()	
Se SIM, tratamento para Hepatite C?	SIM ()	NÃO ()	IGN ()	
Qual esquema?				

				Datas
Tuberculose?	POS ()	NEG ()	IGN ()	
Se SIM, estado da infecção:	ATIVA ()	LATENTE ()	IGN ()	
Está em tratamento?	SIM ()	NÃO ()	IGN ()	
Qual esquema?				

Doenças definidora de AIDS?	
() Candidíase oral	() Candidíase do esôfago
() Febre ou diarreia por 1 mês ou mais	() Demência pela AIDS
() Herpes simples por 1 mês ou mais	() Herpes zoster
() Infecção pelo CMV	() Perda de peso acentuada
() Pneumonia	() Toxoplasmose

FORMULÁRIO B – ACOMPANHAMENTO: REVISÃO DE DADOS CLÍNICOS

NOME	CÓDIGO	PÁGINA

1. Informações clínicas e epidemiológicas

1.1 Peso e altura

	Datas	Peso (kg)	Altura (m)
1			
2			
3			
4			

1.2 Fumo e etilismo

	Datas	Fumo	Etilismo
1		SIM () NÃO ()	SIM () NÃO ()
2		SIM () NÃO ()	SIM () NÃO ()
3		SIM () NÃO ()	SIM () NÃO ()
4		SIM () NÃO ()	SIM () NÃO ()

Se **SIM**, indique quantas unidades são consumidas:

	Datas	Fumo (cigarros por dia)	Etilismo (unidades por semana)
1			
2			
3			
4			

1.3.1 Comorbidades. Se houver mudança de status, indicar a data

Comorbidade	Status	Datas
Desordem Psiquiátricas		
Doença autoimune		
Doença cardiovascular		
Diabetes		
Doença renal		
Doença de fígado		
Osteoporose		

2. Infecção pelo HIV

2.1 Parceiros sexuais

Possui parceiro(a) fixo(a)?		
SIM ()	NÃO (SOLTEIRO(A)) ()	MÚLTIPLAS PARCEIROS(AS) ()

2.2 Gravidez e HIV

	Datas	Se a paciente for mulher, ela está atualmente grávida?	
1		SIM ()	Mês de gestação: _____ NÃO ()
2		SIM ()	Mês de gestação: _____ NÃO ()
3		SIM ()	Mês de gestação: _____ NÃO ()
4		SIM ()	Mês de gestação: _____ NÃO ()

Se alguma resposta for SIM durante o período de acompanhamento, qual o estado sorológico da(s) criança(s)?					Data de Nascimento
Filho1	Sexo M () F ()	POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()	
Filho2	Sexo M () F ()	POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()	
Filho3	Sexo M () F ()	POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()	
Filho4	Sexo M () F ()	POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()	

3. Se iniciou tratamento antirretroviral, indique a seguir, bem como eventuais efeitos adversos aos medicamentos

Esquema	Data de início

FORMULÁRIO C – ACOMPANHAMENTO DE EXAMES

NOME	CÓDIGO	PÁGINA

4. Coinfecções, infecções oportunistas e doenças definidoras de AIDS

4.1 Sorologia de hepatites virais

Sorologia para Hepatite B			Datas	
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		1
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		2
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		3
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		4

Sorologia para Hepatite C			Datas	
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		1
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		2
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		3
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		4

Se POSITIVO, está em tratamento contra a hepatite C?				
SIM ()		NÃO ()		IGNORADO ()
Esquema	Data de início	Adesão (%)	Data de troca	Motivo da troca
1				
2				
3				
4				

4.2 Infecção por Tuberculose

Infecção por tuberculose			Datas	
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		1
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		2
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		3
POSITIVO ()	NEGATIVO ()	IGNORADO ()		4

Se POSITIVO, está tratamento contra a tuberculose?				
SIM ()		NÃO ()		IGNORADO ()
Esquema	Data de início	Adesão (%)	Data de troca	Motivo da troca
1				
2				
3				

4.3 Doenças definidoras de AIDS (Se houver mudança de status, indicar a data)

Doença	Status	Data
Candidíase oral		
Febre ou diarreia por 1 mês ou mais		
Herpes simples por 1 mês ou mais		
Infecção pelo CMV		
Pneumonia		
Candidíase do esôfago		
Demência pela AIDS		
Perda de peso acentuada		
Toxoplasmose		

5. Acompanhamento de carga viral e contagem de linfócitos

Nº	DATA	CV	LOG ₁₀ (CV)	CD4+	CD4+ (%)	CD8+	CD8+ (%)	CD45+
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								

6. Medição de adesão ao tratamento anti-HIV CÓDIGO DE AMOSTRA: _____

Prescrição Nº	Esquema 1	Esquema 2	Esquema 3	Esquema 4	Esquema 5	Esquema 6
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

7. Controle de esquemas e trocas

Esquema	Data de início	Adesão (%)	Data de troca	Motivo da troca
1				
2				
3				
4				
5				
6				

ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP

Instituto de Medicina Integral
 Prof. Fernando Figueira
 Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
 Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 3629 - 13 intitulado “Fatores Genéticos humanos envolvidos no curso da Infecção pelo HIV: Transmissão vertical, imunidade e resposta à terapia antirretroviral.” apresentado pelo (a) pesquisador (a) **Antonio Victor Campos Coelhos** foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião ordinária de 13 de novembro de 2013

Recife, 18 de novembro de 2013


Dr. José Eulálio Cabral Filho
 Coordenador do Comitê de Ética
 em Pesquisa em Seres Humanos do

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei. 9851 de 08/11/67
 UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei. 5013 de 14/05/64
 UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 86238 de 30/07/81
 INSCRIÇÃO MUNICIPAL - 05.897-1
 INSCRIÇÃO ESTADUAL - Isento
 CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista
 Recife - PE - Brasil - CEP: 50.070-550
 PABX: (81) 2122.4100
 Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 1393
 e-mail: imip@imip.org.br
www.imip.org.br

ANEXO D – CURRICULUM VITAE (LATTES)

Wlisses Henrique Veloso de Carvalho da Silva

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Wlisses Henrique Veloso de Carvalho da Silva
Filiação Severino Veloso de Carvalho
 Arlete Maria da Silva
Nascimento 25/02/1992 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 7709768 SDS - PE - 08/11/2004
CPF 094.319.674-48

Formação acadêmica/titulação

- 2016** Mestrado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Orientador: Rafael Lima Guimarães
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2011 - 2016** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO CCR5 Δ 32 E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM A SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HIV-1 E A FALHA IMUNOLÓGICA DA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL
 Orientador: Rafael Lima Guimarães

Formação complementar

- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Bioinformática: Análise de dados Moleculares. (Carga horária: 90h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Academic English level 50. (Carga horária: 224h).
 University of Toronto, UTORONTO, Toronto, Canadá
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Academic English level 30. (Carga horária: 240h).
 University of Toronto, UTORONTO, Toronto, Canadá
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Procedimentos de Amostragem e Remediação dos Metais Pesados em Solos. (Carga horária: 12h).
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Plantas Medicinais e a Indústria de Fitoterápicos no Brasil. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2016 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestrando, Carga horária: 30, Regime: Dedicção exclusiva

Outras informações: Executa atividades vinculadas ao projeto "Polimorfismos nos genes IL2 e IL2R α ; e sua influência na recuperação imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral" sob orientação do Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães.

2016 - 2016

Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Monitor, Carga horária: 12, Regime: Parcial

Outras informações: Atuava como monitor na disciplina de Genética Molecular do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas em aulas práticas de bioinformática e contribui nas revisões dos assuntos da área em questão.

2015 - 2016

Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações: Executou atividades vinculadas ao projeto "Polimorfismo no gene CCR5 (delta32) e sua possível associação com a falha imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral" sob orientação do Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães.

Prêmios e títulos

- 2017** Menção Honrosa, coautor do trabalho "Frequência do polimorfismo SDF1-3'A em populações brasileiras: Uma meta-análise", II Colóquio de Biologia e Saúde - UFPE
- 2016** Segundo Lugar do Prêmio Jovem Geneticista, coautor do trabalho "Mitochondrial DNA analysis and inference of maternal ancestry in admixed individuals from Pernambuco, Brazil", XXI Encontro de Genética do Nordeste – ENGENE.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Silva-Carvalho, Wiesses Henrique Veloso**; DE MOURA, RONALD RODRIGUES; COELHO, ANTONIO VICTOR CAMPOS; CROVELLA, SERGIO; GUIMARÃES, RAFAEL LIMA.

Frequency of the CCR5-delta32 allele in Brazilian populations: A systematic literature review and meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution (Print)*., v.43, p.101 - 107, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MESQUITA, M. S.; SILVA, J. E. A.; CRUZ, H. L. A.; SILVA, H. H. S. A.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; PONTILLO, A.; CROVELLA, S.; SILVA, J. A.; GARCIA, P. S.

A 3'UTR SNP IN NLRP3 GENE IS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste - XXI ENGENE, 2016, Recife. **Anais do XXI ENGENE 2016.**, 2016.

2. SANTOS, J. L. A.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; MESQUITA, M. S.; COELHO, A. V. C.; GUIMARAES, R. L.

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO SDF - 1 3'A COM A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HIV - 1: UMA META - ANÁLISE GLOBAL In: XXI Encontro de Genética do Nordeste - XXI ENGENE, 2016, Recife. **Anais do XXI ENGENE 2016.**, 2016.

3. **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; SANTOS, J. L. A.; ARAGAO, M. A. L.; SILVA, H. H. S. A.; SILVA, J. E. A.; COELHO, A. V. C.; GUIMARAES, R. L.

ASSOCIATION STUDY OF CCR5 DELTA32 POLYMORPHISM WITH THE SUSCEPTIBILITY TO HIV - 1 INFECTION IN POPULATIONS FROM STATE OF PERNAMBUCO In: XXI Encontro de Genética do Nordeste - XXI ENGENE, 2016, Recife. **Anais do XXI ENGENE 2016.**, 2016.

4. SILVA, H. H. S. A.; ARAGAO, M. A. L.; MOURA, R. R.; BRANDAO, L. A. C.; CROVELLA, S.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**

FINDING NEW PRIMARY RESISTANCE MUTATIONS OF HIV INTEGRASE GENE ON NAIVE PATIENTS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste - XXI ENGENE, 2016, Recife. **Anais do XXI ENGENE 2016.**, 2016.

5. ARAGAO, M. A. L.; MOURA, R. R.; KAMADA, A. J.; SILVA, H. H. S. A.; OLIVEIRA, T. C.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; BRANDAO, L. A. C.; CROVELLA, S.

MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS AND INFERENCE OF MATERNAL ANCESTRY IN ADMIXED INDIVIDUALS FROM PERNAMBUCO, BRAZIL In: XXI Encontro de Genética do Nordeste - XXI ENGENE, 2016, Recife. **Anais do XXI ENGENE 2016.**, 2016.

6. SILVA, J. E. A.; LIMA, C. A. D.; SANTOS, P. D. A.; MESQUITA, M. S.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; ARAUJO, M. H. Q.; RUSHANSKY, E.; CROVELLA, S.; SILVA, J. A.; GARCIA, P. S.

MYD88 SNP RS6853 IS NOT ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS SUSCEPTIBILITY AND TNF α LEVELS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste - XXI ENGENE, 2016, Recife. **Anais do XXI ENGENE 2016.**, 2016.

Apresentação de trabalho e palestra

1. ANDRADE-SANTOS, J. L.; GUEDES, M. C. S.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; COELHO, A. V. C.; GUIMARAES, R. L.
ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO SDF1-3'A COM A FALHA IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM HIV-1 EM TERAPIA ANTIRRETROVIRAL, 2017. (Outra,Apresentação de Trabalho)
2. LIMA, G. C.; SA, R. A. Q. C.; COUTINHO, L. R. B.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; COSTA, L. E. N.
Análise do desenvolvimento ninfal de gafanhotos (*Tropidacris collaris*) de acordo com a alimentação, 2017. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
3. **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; GUEDES, M. C. S.; ANDRADE-SANTOS, J. L.; GUIMARAES, R. L.
Association of low pre-treatment CD4+ T-cell count and male gender with immunological failure during anti-HIV therapy, 2017. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
4. GUEDES, M. C. S.; ANDRADE-SANTOS, J. L.; **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; COELHO, A. V. C.; GUIMARAES, R. L.
FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO SDF1-3'A EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS: UMA META-ANÁLISE, 2017. (Outra,Apresentação de Trabalho)
5. **CARVALHO-SILVA, W. H. V.**; GUIMARAES, R. L.
Polimorfismo no gene CCR5 (delta32) e sua possível associação com a falha imunológica em pacientes HIV-positivos submetidos à terapia antirretroviral, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)
6. SILVA, H. H. S. A.; LUNA, M. A.; **SILVA-CARVALHO, W. H. V.**; MOURA, R. R.; CROVELLA, S.; BRANDAO, L. A. C.
PREDICTING THE NON-STRUCTURAL 5 PROTEIN OF ZIKA VIRUS, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

1. **Avaliador de Pôsteres do IV Congresso Internacional Multiprofissional em Saúde**, 2017
Universidade Federal de Pernambuco
 2. **Avaliador de Pôsteres do XXIII Semana de Biomedicina**, 2017
Universidade Federal de Pernambuco
 3. **Avaliador de Pôsteres do III Congresso Internacional Multiprofissional em Saúde**, 2016
Universidade Federal de Pernambuco
-

Citações

Web of Science Total de citações : 3;Total de trabalhos : 1;Data : 07/12/2017;
Fator H: 1;

Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:
Carvalho-Silva, Wlisses H.V.

SCOPUS Total de citações : 5;Total de trabalhos : 1;Data : 19/03/2018

Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:
Silva-Carvalho, Wlisses Henrique Veloso