



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

LABORATÓRIO DE IMUNPATOLOGIA KEIZO ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

NEYLA MARIA PEREIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE ATIVAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM
CÉLULAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO**

1

Recife

2019

NEYLA MARIA PEREIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE ATIVAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM
CÉLULAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO**

1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Alves, Neyla Maria Pereira

Avaliação de mecanismos de ativação celular e apoptose em células infectadas pelo vírus da imunodeficiência tipo 1 /Neyla Maria Pereira Alves. – 2019.

131 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão.

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. HIV (Vírus). 2. Doenças autoimunes. 3. Genética. I. Brandão, Lucas André Cavalcanti (Orientador). II. Silva, Ronaldo Celerino (Coorientador). III. Título.

616.9792

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 117

NEYLA MARIA PEREIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE ATIVAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM
CÉLULAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO**

1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 11/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profª Dra. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Profª Dra. Maria de Mascena Diniz Maia (Examinadora Externa)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife

2019

À minha família, em especial à minha mãe Eliane, pelo incentivo e apoio,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, agradeço por me guiar em todos os momentos desafiadores da vida.

À minha mãe, Eliane, pelo exemplo incansável de determinação, coragem e força no desenvolvimento dos papéis de professora, mulher, mãe e pai. Meu orgulho eterno e meu muitíssimo obrigado.

À minha família pelo apoio e incentivo em todas as decisões e por mostrar que o estudo pode nos levar mais além.

A meu namorado, Heitor, por toda paciência desenvolvida para me apoiar e acalmar durante o doutorado e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador, Lucas, pela paciência, ensinamento, direcionamento e discussões produtivas, por ter me aceitado no grupo de pesquisa e acreditado que seria possível desenvolver o projeto. Por não se opor a nenhuma decisão profissional por mim tomada neste período.

Ao meu coorientador, Ronaldo, por toda contribuição e ensinamento ao longo desses anos de convívio.

Ao Ronald, por toda discussão, paciência, conhecimento, disponibilidade e contribuição dentro e fora do laboratório. Você foi minhas mãos e minha mente no desenvolvimento de parte importante dos experimentos.

Ao grupo Patgen por todo convívio e colaboração.

Ao grupo Patgen-Patologia (Heverton, Lívia, Natália, Heitor, Giovanna, Bruno, Ana Sofia, Raul e Andréa) pelos momentos de alegria e parceria em meio a tantos apertados na reta final deste trabalho, e a Almerinda, em especial, pela colaboração em parte dos experimentos e descontração no dia-a-dia.

Às amigas “kekês” pela força, coragem, apoio e amizade. Vocês me incentivaram a seguir esse caminho estressante e realizador que é o de fazer ciência.

Aos pacientes e funcionários dos serviços de referência em tratamento para HIV (IMIP e Hospital Correia Picanço) pela colaboração. Sem suas participações esse trabalho não seria realizado.

À Aleide, Gabi e Carol pela colaboração na rotina das atividades do laboratório que possibilitaram a finalização do doutorado.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

A Deus novamente, pela sorte de encontrar todos vocês nesse caminho breve, enriquecedor e feliz que é a vida.

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas (SAGAN, 2019).

RESUMO

A patogenicidade do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) é caracterizada, principalmente, pela perda gradativa de células T CD4⁺ a partir da modulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro induzindo a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e ativando vias extracelulares de morte. O estudo objetivou analisar os mecanismos de ativação das vias extrínsecas da apoptose (TNFR1, TNFR2 e Fas) e suas correlações com mecanismos de inflamação durante a infecção pelo HIV-1. Amostras de 102 pacientes em sucesso imunológico e 53 pacientes em falha imunológica foram genotipadas por PCR em Tempo Real. Indivíduos em falha imunológica foram em maioria homens (60.4%, $p=0.002$), com média de idade de início de tratamento alta (34.8 anos, $p=0.034$), e com maior tempo até a supressão virológica (6 meses, $p=0.035$). Regime de terapia antirretroviral contendo AZT foi associada com sucesso imunológico ($p=0.029$). O rs767455 (genótipo T/T) foi mais frequente em indivíduos com falha imunológica ($p=0.022$) enquanto o rs8904 (genótipo A/G, $p=0.02$) e o rs1800629 (genótipo G/A, $p=0.024$) foram mais frequentes em indivíduos com sucesso imunológico. A análise dos 29 estudos incluídos na revisão sistemática da literatura mostrou que múltiplas alterações imunológicas como pobre função tímica, falta de acesso à interleucina 7 e expressão de proteína de morte celular programada 1 na superfície celular foram os mecanismos mais frequentes que resultaram na perda de linfócitos por apoptose, ativação celular, inflamação e imunosenescência. Concluímos que a morte celular nos grupos de indivíduos estudados foi induzida através da via extrínseca da apoptose e que a gp120 é capaz de agir sinergicamente com interleucinas e modular vias críticas de ativação de proteínas envolvidas no normal funcionamento do sistema imunológico (Jak 3 e STAT 5). Ensaios envolvendo Docking e Dinâmica Molecular mostraram interação estável entre os receptores e seus ligantes de referência e também a capacidade de a molécula gp120 viral interagir significativamente com o TNFR2 indicando uma possível competição entre gp120 e TNF- α por esse receptor. Essa interação pode influenciar o desencadeamento de inflamação, ativação e proliferação de células T estimuladas pela presença de antígenos virais em grupos de indivíduos infectados por HIV-1 com pobre recuperação imunológica.

Palavras-chave: HIV-1. Inflamação. Apoptose. SNPs. Interações moleculares. Recuperação imunológica. Ativação celular.

ABSTRACT

The pathogenicity of the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is characterized mainly by the gradual loss of CD4 + T cells from the modulation of host defense mechanisms inducing the production and secretion of proinflammatory cytokines and activating extracellular death pathways. The aim of this study was to analyze mechanisms of apoptosis extrinsic pathways activation (TNFR1, TNFR2 and Fas) and their correlations with inflammation mechanisms during HIV-1 infection. Samples of 102 patients on immune success and 53 patients on immunological failure were genotyped by Real-Time PCR. Individuals in immunological failure were mostly male (60.4%, $p=0.002$), with a higher median of age at treatment onset (34.8 years, $p=0.034$) and a higher time until virological suppression (6 months, $p=0.035$). In addition, ART containing AZT was associated with immune success ($p=0.029$). The rs767455 (T/T genotype) was more frequent in immunological failure individuals ($p=0.022$) and both rs8904 (A/G genotype, $p=0.02$) and rs1800629 (G/A genotype, $p=0.024$) in immunological success individuals. The analysis of the 29 studies included in the systematic review of literature showed that multiple immunological changes such as poor thymic function, lack of access to interleukin 7 and expression of programmed cell death protein 1 on the cell surface were the most frequent mechanisms that resulted in the loss of lymphocytes by apoptosis, cellular activation, inflammation and immunosenescence. We conclude that cell death in the groups of individuals studied was induced through the extrinsic pathway of apoptosis and that gp120 is able to act synergistically with interleukins and modulate critical pathways of activation of proteins involved in the normal functioning of the immune system (Jak 3 and STAT 5). Assays involving Docking and Molecular Dynamics showed stable interaction between the receptors and their reference ligands and also the ability of the viral gp120 molecule to interact significantly with TNFR2 indicating a possible competition between gp120 and TNF- α by that receptor. This interaction may influence the triggering of inflammation, activation and proliferation of T cells stimulated by the presence of viral antigens in HIV-1 infected individuals with poor immune recovery.

Keywords: HIV-1. Inflammation. Apoptosis. SNPs. Molecular interactions. Immune Reconstitution. Cell activation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição das novas infecções por HIV em países da América Latina e Caribe em 2015. Adaptado de: UNAIDS, 2016	21
Figura 2 -	Distribuição das novas infecções por HIV entre grupos populacionais da América Latina e Caribe em 2014. Adaptado de: UNAIDS, 2016	22
Figura 3 -	Estado de de conhecimento e lacunas de tratamento e supressão viral no mundo, em 2017. Adaptado de: UNAIDS, 2018	23
Figura 4 -	Composição e genoma do HIV. Estrutura de um vírion maduro de HIV, apresentando as proteínas no nucleocapsídeo (p6 e p7), protease (PR), transcriptase reversa (RT), integrase (IN), glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41) e proteína da matriz (p17). Adaptado de: BARMANIA & PEPPER, 2013	26
Figura 5 -	Esquema do genoma do HIV-1 mostrando as regiões de codificação das proteínas virais em cinza, junções de domínio de poliproteína em barras verticais, proteínas acessórias e regulatórias, envelope (Env), capsídeo (CA), integrase (IN), matriz (MA), nucleocapsídeo (NC), protease (PR), transcriptase reversa (RT) e as repetições terminais longas flanqueando os genes (5'LTR e 3'LTR). Modificado de: WATTS et al., 2009	27
Figura 6 -	Tropismo do HIV: M-trópico – monócito/macrófago trópico; T-trópico – linfócito T trópico. Adaptado de: FANALES-BELASIO, et al., 2010	31

- Figura 7 - Etapas do ciclo replicativo do HIV. 1 - Ligação, fusão e entrada; 2 - Desnudamento; 3 - Retrotranscrição; 4 - Integração do provírus; 5 - Síntese e montagem de proteínas virais; 6 - Brotamento. Adaptado de: FANALES-BELASIO, 2010 32
- Figura 8 - Componentes proximais das vias de transdução de sinal do Fator de Necrose Tumoral (TNF), TNF Receptor do tipo 1 (TNFR1), TNF Receptor do tipo 2 (TNFR2) e Fas e as suas relações com a ativação e a inibição da morte celular programada e inflamação. Adaptado de: BAUD & KARIN, 2001 37
- Figura 9 - Resumo das vias de sinalização da superfamília de receptores de TNF. Após a ligação do TNF com TNFR1, ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras (TRADD, TRAF2 e RIP1). A formação do complexo de moléculas adaptadoras recruta proteínas inibidoras de apoptose (IAP1/2) que agem formando cadeias de ubiquitina ativando NF- κ B. A quebra das cadeias de poliubiquitina induz a ativação de outras moléculas adaptadoras (FADD, RIP3) e caspases estimulando mecanismos pró-apoptóticos. Modificada de: LI et al., 2013 38
- Figura 10 - Patogênese do HIV-1 baseada na interação entre macrófagos e células T. Observa-se a modulação das vias de sinalização por fatores virais (Tat, Nef e gp120) em macrófagos e a formação de reservatórios virais. A gp120 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem células para a periferia dos macrófagos aumentando o número de células alvo para futuras infecções enquanto Nef, Tat, Nef e Vpr ativam mecanismos anti-apoptóticos favorecendo a persistência do vírus e contribuindo para a formação de reservatórios virais. Por outro lado, Tat induz a secreção de ligantes de morte (TRAIL) e a gp120 aumenta a produção de TNF- α e receptores de morte (TNFR2 e Fas) conduzindo as células vizinhas à apoptose, aumentando a supressão

imunológica. Modificado de: HERBEIN et al., 2010
..... 42

Figura 11 - Fluxograma e critérios de inclusão para a seleção de pacientes do
estudo 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aspectos clínicos e epidemiológicos da depleção de células T CD4+ na infecção por HIV-1 e HIV-2 (VIDYA VIJAYAN et al., 2017)	29
Tabela 2 - Aspectos da resposta celular de linfócitos T CD4+ na infecção por HIV-1 e HIV-2. (VIDYA VIJAYAN et al., 2017)	30
Tabela 3 - Regimes de primeira e segunda linhas de TARV para adultos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013)	35
Tabela 4 - Caracterização dos SNPs selecionados para o estudo	50
Tabela 5 - Cadeias de Pesquisa usadas para pesquisa de dados com base nos tipos de morte celular	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A20	Proteína A20
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1 (Quinase 1 reguladora do sinal de apoptose)
AZT	Azidotimidina
CA	Capsídeo
CCR5	C-C chemokine receptor type 5 (Receptor de quimiocina tipo 5)
CDC	Centro de Controle de Doenças
CRF	Forma recombinante circulante
CV	Carga viral
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4 (C-X-C Receptor de quimiocina tipo 4)
DDAHV	Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais
E3	Ubiquitina ligase
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
Env	Envelope
FADD	Fas-associated death domain (Proteína domínio de morte associada ao Fas)
Fas	Fas Receptor
FasL	Fas Ligante
HSH	Homem que faz sexo com homem
IAC	Inibidores antagonistas do CCR5
IF	Inibidores de fusão
IFN- γ	Interferon gama
I κ B	Subunidade inibidora NF- κ B
IL	Interleucina
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
IN	Integrase
INNTR	Inibidores de transcriptase reversa não análogos a nucleosídeos
INSTI	Integrase strans transfer inhibitor (Inibidores de integrase)
INTR	Inibidores de transcriptase reversa análogos a nucleosídeos
IP	Inibidores de protease

IP3	Inositol trifosfato
LPS	Lipopolisacarídeo
LTR	Long Terminal Repeats (Repetições terminais longas)
MA	Matriz
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NC	Nucleocapsídeo
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B (Fator Nuclear kappa B)
p50, p52, RelA, RelB, c-Rel	Membros da família NF- κ B
PDB	Protein Data Bank (Banco de dados de proteína)
PR	Protease
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/Aids
RIP1	Proteína 1 de Interação com o Receptor
RMN	Ressonância magnética nuclear
RT	Transcriptase Reversa
Siclom	Sistema de Controle e Logística de Medicamentos
SIV	Simian Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência de Símios)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de Base Única)
TARV	Terapia antirretroviral
TasP	Treatment as Prevention (Tratamento como Prevenção)
TLR	Receptor do tipo Toll
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor Alpha -Induced Protein 3 (Proteína 3 induzida pelo TNF- α)
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α (Fator de Necrose Tumoral alfa)
TRADD	TNFR1-associated death domain protein (Proteína DD associada ao receptor TNFR1)
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2 (Fator 2 associado ao Receptor TNF)

TRAIL	Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-Inducing Ligand (Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF)
UBS	Unidade Básica de Saúde
UNAIDS	Joint United Nations Program on HIV/AIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids)
URF	Forma recombinante única
VS	Sinapses virológicas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	47
1.1.1	Objetivo Geral	47
1.1.2	Objetivos Específicos	47
2	MÉTODO	48
2.1	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE VARIAÇÕES GENÉTICAS NA VIA DO TNF-A/TNFR1	48
2.1.1	População de Estudo	48
2.1.2	Extração de DNA Genômico	49
2.1.3	Seleção de Polimorfismos e Genotipagem	49
2.1.4	Análises dos Dados	50
2.2	BUSCA DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR RELACIONADOS À FALHA IMUNOLÓGICA	51
2.3	DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS CELULARES DAS VIAS DE INFLAMAÇÃO/APOPTOSE E GP120	52
2.3.1	Download e Edição das Estruturas Proteicas	52
2.3.2	Docking Molecular	53
2.3.3	Dinâmica Molecular (DM)	53
3	RESULTADOS	54
3.1	ARTIGO 1 – POLYMORPHISMS ON TNF-A/TNFR1 PATHWAY GENES IN IMMUNOLOGICAL RECOVERY OF HIV-1- INFECTED INDIVIDUALS ON ANTIRETROVIRAL THERAPY	54
3.2	ARTIGO 2 – CELL DEATH AND IMMUNE FAILURE CORRELATION IN GLOBAL HIV-INFECTED PATIENTS: A SYSTEMATIC REVIEW	78
3.3	ARTIGO 3 – MOLECULAR INTERACTION BETWEEN HIV-1 GP120 PROTEIN AND CELL ACTIVATION RECEPTOR: A POSSIBLE MECHANISM OF IMMUNE SUPPRESSION	104

4	CONCLUSÕES	116
	REFERÊNCIAS	118
	APÊNDICE A – PROTOCOLO DE ESTUDO – REVISÃO	
	SISTEMÁTICA DA LITERATURA	125
	ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E	
	ESCLARECIDO (TCLE)	127
	ANEXO B - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM	
	PESQUISA EM SERES HUMANOS DO IMIP – PE	130
	PERSPECTIVAS	131

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), infecções pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1) tem se propagado de forma acelerada atingindo até o ano de 2017, em média, 37 milhões de pessoas em todo o mundo, as quais são em sua maioria de países de média e/ou baixa rendas como a África Subsaariana. No Brasil, já foram registrados mais de 830 mil casos de pessoas vivendo com HIV/AIDS e 15 mil mortes por causas relacionadas, sendo o país ainda responsável por cerca de 40% das novas infecções no mundo.

O HIV-1 infecta, preferencialmente, linfócitos T CD4⁺ e linhagens de monócitos/macrófagos (menor preferência). A principal característica de sua patogenicidade reside na depleção de células T CD4⁺, via apoptose, o que resulta na perda da imunidade mediada por célula. Os complexos detalhes que envolvem a transmissão desse vírus, permanecem ainda não completamente compreendidos. Sabe-se que a disseminação do HIV-1 ocorre entre células T suscetíveis através de dois processos: 1) infecção de célula livre; e 2) propagação direta célula-célula através de sinapses virológicas (VS), preferencialmente utilizada pelo vírus devido ao acúmulo de proteínas.

A modulação das vias e dos mecanismos comuns de apoptose na infecção pelo HIV-1, resultam no aumento da viremia e na formação de reservatórios virais por linfócitos T CD4⁺ de memória e, principalmente, macrófagos, por esses serem mais resistentes à morte celular programada induzida por vírus, aumentando a infectividade. Esses mecanismos envolvem células adjacentes não infectadas que ajudam na supressão do sistema imune.

Quanto à imunidade inata, as células dendríticas apresentam um papel importante contra o HIV-1 por apresentarem receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que ativam mecanismos pró-inflamatórios a partir da transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B), condição dada possivelmente como caminho alternativo ao do interferon tipo 1, que reconhece ácidos nucleicos e partículas virais intracelulares. Ademais, essas células podem não apenas atuar para a imunidade antiviral, mas também para a disseminação do patógeno e evasão imune, já que são capazes de se ligar, preservar e transferir partículas virais completas aos linfócitos T CD4⁺.

O controle da epidemia de HIV/Aids no Brasil é baseado no diagnóstico precoce, em intervenções de prevenção combinada e no tratamento. A terapia antirretroviral (TARV) visa diminuir a morbimortalidade das pessoas que vivem com HIV/Aids, controlar a doença e diminuir a transmissão do vírus pela diminuição da carga viral. Alguns indivíduos, mesmo apresentando boa adesão ao tratamento e carga viral indetectável, não alcancem níveis de células T CD4+ satisfatórios, caracterizando a falha imunológica.

Estudos têm sugerido que a falha imunológica pode ser decorrente de mecanismos apoptóticos. Diversos mecanismos intracelulares e extracelulares encontram-se envolvidos na morte celular programada por apoptose e na ativação inflamatória de células específicas. Durante a ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8+), auxiliares (CD4+) e macrófagos, tais células podem entrar em estágio de ativação inflamatória ou podem ser conduzidas a um processo apoptótico como a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias ou ativação de vias intracelulares que conduzem a célula ao suicídio quando expostas a infecção pelo HIV-1. Embora esses mecanismos sejam conhecidos, ainda não se encontram completamente esclarecidos como ou por quê células de indivíduos infectados por HIV-1 escolhem uma via principal de ativação molecular da morte ou da via inflamatória.

Neste sentido, esse trabalho teve como intuito analisar a influência das vias extrínsecas da apoptose ativadas a partir de TNF- α /TNFR1, TNF- α /TNFR2 e FasL/Fas no aumento da morte celular por apoptose de células infectadas por HIV-1 ou de células adjacentes às infectadas, e a relação entre os receptores de morte, ligantes e moléculas intracelulares específicas dessas vias visto que estudos envolvendo esse tema são importantes para descrição da patogênese viral e, conseqüentemente, para o possível direcionamento de tratamentos antirretrovirais.

VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1)

- Epidemiologia

O HIV é amplamente distribuído na população mundial. Dados recentes, indicam que mais 37 milhões de pessoas vivem com o vírus em todo o mundo, sendo a epidemia mais concentradas em países de média e/ou baixa rendas como a África Subsaariana (UNAIDS, 2016; VALDIVIA et al., 2017).

Na América Latina, a taxa anual de novas infecções em adultos encontra-se em lento crescimento com cerca de 91.000 casos até 2015. Em alguns países da América Central essa taxa teve crescimento significativo em torno de 20% entre 2010 e 2015 quando comparado ao Brasil que apresentou um aumento de 4% nesse mesmo período. Ainda assim, o Brasil engloba a maior parte das novas infecções entre países da América Latina e Caribe (Figura 1) (UNAIDS, 2016).

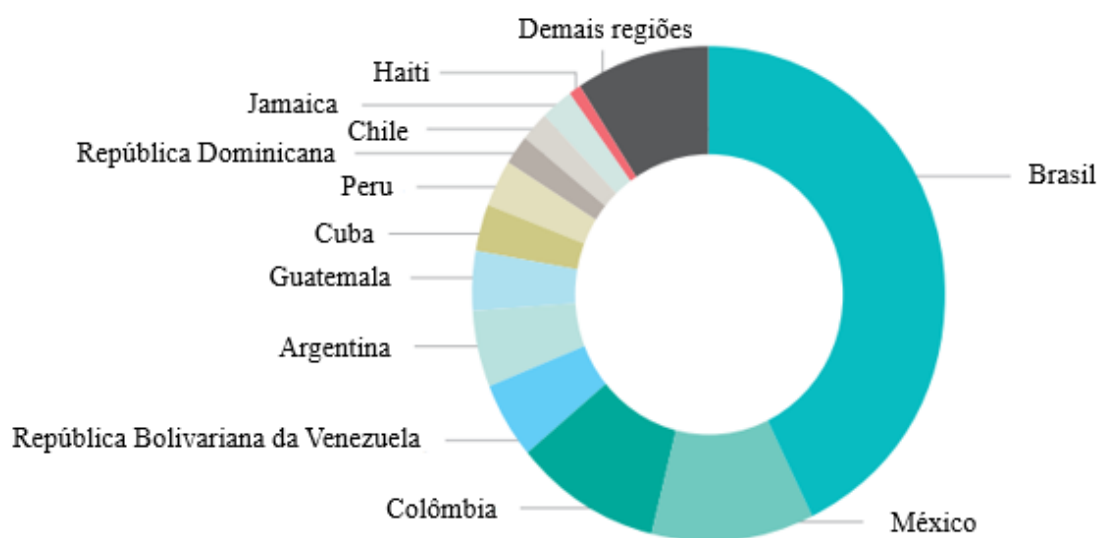


Figura 1. Distribuição das novas infecções por HIV em países da América Latina e Caribe em 2015. Adaptado de: UNAIDS, 2016.

Em 2014, os grupos populacionais de adultos mais afetados por novas infecções por HIV, na América Latina e Caribe, englobaram os clientes de profissionais do sexo e outros parceiros sexuais das populações chave, homem gay e homem que faz sexo com homem (HSH) em relação aos grupos de transgênero, pessoas que fazem uso de drogas injetáveis e profissionais do sexo (UNAIDS, 2016), como mostra a Figura 2.

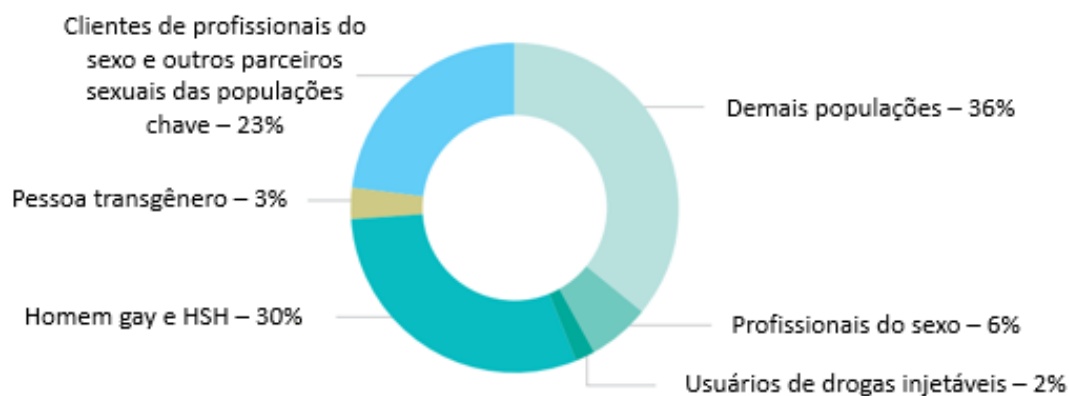


Figura 2. Distribuição das novas infecções por HIV entre grupos populacionais da América Latina e Caribe em 2014. Adaptado de: UNAIDS, 2016.

O Programa Conjunto das Nações Unidas para HIV/Aids (UNAIDS) sugeriu que o número de mortes decorrentes da aids diminuiu 40% no período de 2004 até 2015 (cerca de 15,8 milhões de pessoas), possivelmente devido ao aumento do acesso da população ao tratamento e à eficácia da TARV. Essa redução na mortalidade pelo HIV/Aids ocorreu principalmente pela redução de novas infecções em crianças menores de 15 anos e a administração da TARV em gestantes (UNAIDS, 2015).

No Brasil, desde o início da epidemia até março de 2016, foram notificadas mais de 830 mil pessoas vivendo com HIV e mais de 15 mil mortes com causa base relacionada à aids (UNAIDS, 2016).

Dados mais atuais, publicados no Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do ano de 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018), indicam o diagnóstico de 42.420 novos casos de HIV e 37.791 casos de aids no Brasil. Entre os anos de 2007 até junho de 2018 foram observados 247.795 casos de infecção em todo o país distribuídos da seguinte maneira entre as regiões: 47,4% (117.415 casos) na

região Sudeste, 20,5% (50.890 casos) na região Sul, 17% (42.215 casos) na região Nordeste, 8% (19.781 casos) na região Norte e 7,1% (17.494 casos) na região Centro-Oeste. Quanto ao sexo, 68,6% dos casos ocorreram em homens e 31,4% em mulheres, com uma razão entre os sexos de 2,6 (H:M), para o ano de 2017.

Baseado nos dados epidemiológicos, o Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV) do Ministério da Saúde entende que a melhoria da qualidade de vida e redução da transmissão do HIV estão atreladas a iniciativas que visem intensificar as ações de diagnóstico e acesso ao teste de HIV no intuito de administrar precocemente as TARVs (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Neste sentido, o UNAIDS definiu como meta global até o ano de 2020 diagnosticar 90% de toda população infectada, desta 90% deve receber a TARV, e desta 90% deve ter carga viral suprimida, meta essa denominada como 90-90-90 (UNAIDS, 2016). Globalmente, no ano de 2017, 75% das pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) tinham conhecimento do seu status de infecção, das quais 79% faziam uso da TARV, e 81% das que tinham acesso à terapia alcançaram a supressão da carga viral. Porém, apesar do progresso observado, apenas um percentual de aproximadamente 47% das PVHA suprimiram a carga viral até o final do ano de 2017 (Figura 3) (UNAIDS, 2018).

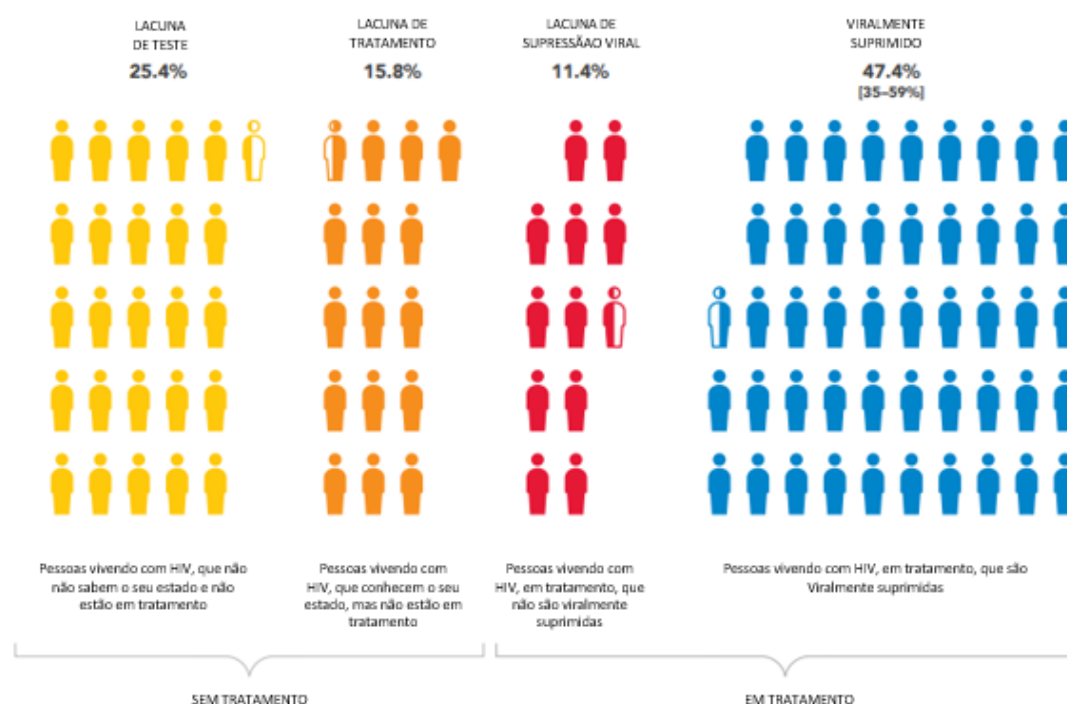


Figura 3. Estado de conhecimento e lacunas de tratamento e supressão viral no mundo, em 2017. Adaptado de: UNAIDS, 2018.

- Histórico da Infecção

Registros do Centro de Controle de Doenças (CDC) atestam a presença da HIV-1, em amostras sorológicas de indivíduos com hepatite, desde o ano de 1979, em Los Angeles, embora os surgimento dos primeiros casos e a descoberta do vírus tenha acontecido apenas em 1983. O diagnóstico mais antigo que se tem registro ocorreu em Kishna, capital da República Democrática do Congo, através de uma amostra de soro coletada em 1959 (DE COCK; JAFFE; CURRAN, 2011).

No início dos anos 80 começaram a ser feitos os registros dos primeiros casos da deficiência imune, mas o conhecimento sobre a nova doença ainda era escasso. Inicialmente, o que se sabia sobre a doença que posteriormente seria chamada de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, Acquired Immunodeficiency Syndrome – aids), era que estava relacionada ao comportamento sexual masculino e usuários de drogas injetáveis, sendo assim determinado os primeiros grupos de risco. Posteriormente, hemofílicos, receptores de transfusão sanguínea e heterossexuais também foram incluídos como de risco (DE COCK; JAFFE; CURRAN, 2011).

Na Califórnia, em 1981, casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* e, posteriormente, outras doenças oportunistas além de sarcoma de Kaposi em homossexuais foram os primeiros casos registrados da doença publicados pelo CDC (DE COCK; JAFFE; CURRAN, 2011).

Em 1983, o número de casos de aids já era superior a 1000, estando distribuídos em vários países do mundo. Com isso, o CDC concluiu que o agente etiológico, dessa síndrome, tinha capacidade de ser transmitido e apresentava um período de latência clínica antes de desenvolver a doença. O agente podia ser transmitido por seu portador sem que o mesmo apresentasse os sintomas, sugerindo que o número de infecções pelo HIV e dos casos de aids eram subestimados. Ainda nesse ano, o patógeno foi isolado, por dois grupos de estudo independentes, a partir de células do sistema imune de pacientes que apresentavam os sintomas da aids (BARRE-SINOUSSE et al., 1983; COELHO, 2013; VALERIANO, 2016).

Luc Montagnier auxiliou Françoise Barré-Sinoussi e colaboradores na descrição de um tipo viral presente em indivíduos com linfadenopatia, que foi denominado de Vírus associado à Linfadenopatia (LAV). No mesmo período, Robert Gallo e colaboradores descreveram outro tipo viral ao qual denominaram de Vírus Linfotrópico Humano tipo

III (HLTV-III) como causa da deficiência imune. Posteriormente, a realização de clonagem e sequenciamento do material genético dos vírus mostraram ser uma única espécie causadora da aids. Tratava-se então de um retrovírus denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em 1986 (SILVA, 2015).

A partir de 1984, os primeiros testes sorológicos para diagnóstico do HIV foram disponibilizados. Três anos depois a primeira droga antirretroviral foi apresentada, chamada azidotimidina (AZT) ou zidovudina (ZDV), porém com resultados insatisfatórios, impulsionando o desenvolvimento de outras drogas. Em 1996, a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (do inglês *highly active antiretroviral therapy* – HAART), baseada na combinação de três drogas antirretrovirais, mudou o panorama do tratamento anti-HIV por reduzir a carga viral e consequentemente possibilitar a recuperação imunológica da maioria dos pacientes (SILVA, 2015).

- Aspectos Morfológicos, Genômicos, Filogenéticos e Clínicos da infecção pelo HIV

O HIV se apresenta como uma partícula esférica com diâmetro entre 100 e 120 nanômetros (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), envolvido por uma bicamada lipídica de origem hospedeira, formando o envelope viral. A região central é composta por uma estrutura cônica, chamada de capsídeo, o qual abriga duas moléculas de RNA de fita simples, além das enzimas fundamentais ao ciclo viral: transcriptase reversa, integrase e protease (Figura 4) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018; HUTCHINSON, 2001; WATTS et al., 2009).

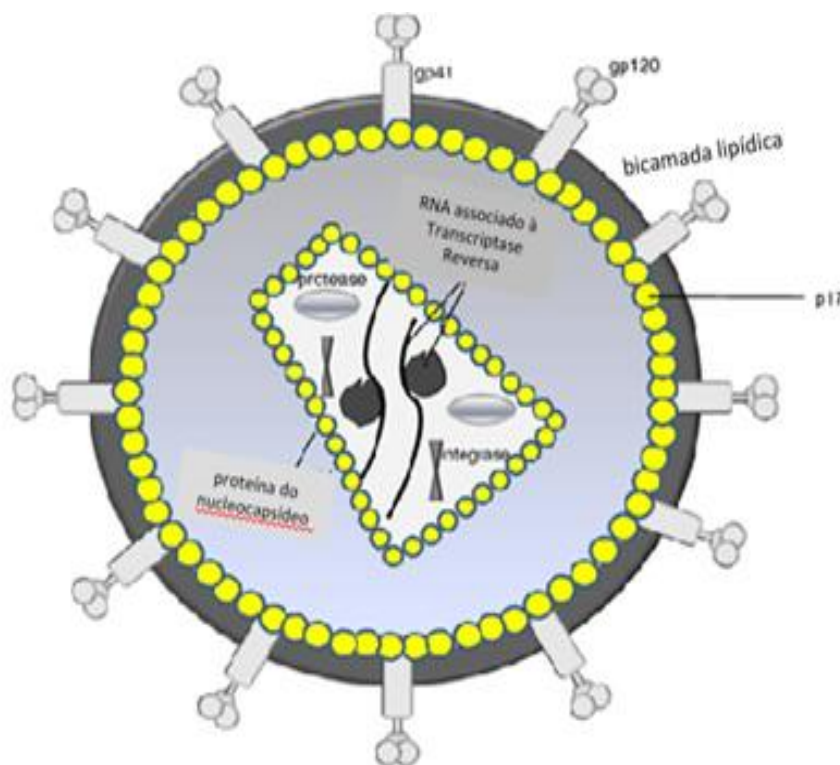


Figura 4. Composição e genoma do HIV. Estrutura de um vírion maduro de HIV, apresentando as proteínas no nucleocapsídeo, protease (PR), transcriptase reversa (RT), integrase (IN), glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41) e proteína da matriz (p17). Adaptado de: BARMANIA & PEPPER, 2013.

A estrutura genética do HIV-1 é composta por um genoma de mais de 9 mil pares de bases (pb) de nucleotídeos. Apresentam-se em toda a extensão cerca de nove genes, a partir dos quais são sintetizadas 15 proteínas, podendo ser classificadas em proteínas estruturais e proteínas não-estruturais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018; WATTS et al., 2009).

O genoma viral é parcialmente semelhante entre os tipos virais 1 e 2 e engloba os principais genes codificadores de proteínas estruturais e enzimas virais (*gag*, *env* e *pol*), além de genes que controlam as funções acessórias e regulatórias (*tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vpr*, *vif*) (Figura 5). Os genes *gag*, *env* e *pol* codificam, respectivamente, a proteína p55, a partir da qual ocorre a formação de proteínas estruturais do capsídeo contendo protease, transcriptase reversa e integrase; a glicoproteína precursora gp160 cujas glicoproteínas originadas atuam na fusão e ligação aos receptores virais do hospedeiro gp41 e gp120; e as enzimas estruturais p66 e p51 que formam a Transcriptase Reversa (RT) envolvida na replicação do HIV (WERSOM et al., 2013). O precursor de *gag* gera, proteoliticamente,

a matriz, o capsídeo, a proteína p6 e o nucleocapsídeo, cujas proteínas ajudam no dobramento do RNA viral (WATTS et al., 2009).

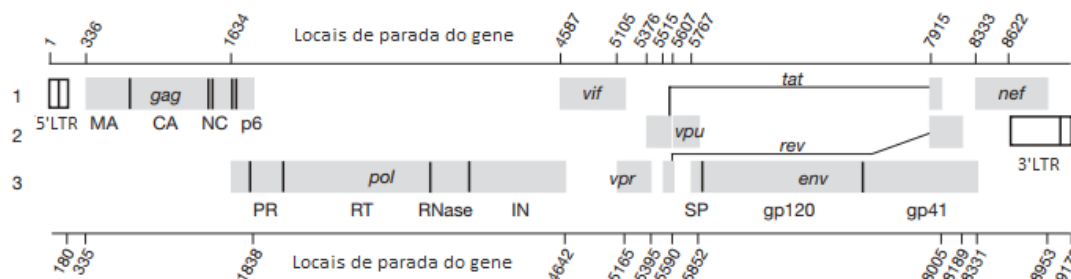


Figura 5. Esquema do genoma do HIV-1 mostrando as regiões de codificação das proteínas virais em cinza, junções de domínio de poliproteína em barras verticais, proteínas acessórias e regulatórias, envelope (Env), capsídeo (CA), integrase (IN), matriz (MA), nucleocapsídeo (NC), protease (PR), transcriptase reversa (RT) e as repetições terminais longas flanqueando os genes (5'LTR e 3'LTR). Modificado de: WATTS et al., 2009.

O “botão” viral é formado por três proteínas gp120 ligadas por ligações não covalentes a três proteínas transmembranas gp41. A gp120 sofre modificação conformacional após ligação com o receptor CD4 celular, a qual é necessária para facilitar a entrada do vírus na célula alvo, garantir a continuidade da interação entre gp120 e gp41 e a intermediação deste processo pela gp41 (PANCERA et al., 2010).

O núcleo viral apresenta as proteínas p17 da matriz, p24 do capsídeo e, p6 e p7 do nucleocapsídeo. A proteína do capsídeo é responsável por formar uma capa protetora em volta do material genômico. As proteínas p6 e p7 são responsáveis pela estabilização do RNA, montagem de nucleocapsídeos e do vírus, bem como a participação do processo de brotamento viral (BARMANIA; PEPPER, 2013).

Tat é uma proteína regulatória que ativa a transcrição viral no núcleo das células hospedeiras, além de estimular a expressão dos co-receptores virais CCR5 e CXCR4 (HERBEIN et al., 2010; VALERIANO, 2016). Já a Rev regula o processo de remoção dos íntrons, união entre os éxons após a transcrição do RNA (splicing) e o transporte do RNA formado (BATTISTE et al., 1996).

Em conjunto com a Tat, as proteínas Nef e Vpr também participam da ativação da transcrição viral, embora Nef isoladamente desempenhe um papel importante na modulação de diversas vias de sinalização, na síntese e na liberação de citocinas pró-inflamatórias (HERBEIN et al., 2010). Vpu e Vif atuam no escape viral posterior ao brotamento e na formação da estrutura do capsídeo, respectivamente (STANLEY et al., 2008; VALERIANO, 2016).

Nas extremidades 5' e 3' do genoma existem repetições terminais longas (LTRs) que apresentam as seguintes funções: regular a expressão dos seus próprios genes e inserir o genoma do vírus no hospedeiro (WATTS et al., 2009).

O HIV-1 pertence ao gênero *Lentivirus* e família *Retroviridae* (FANALES-BELASIO et al., 2010). Sua origem tem sido relacionado ao Vírus da Imunodeficiência de Símios (SIV), o qual após sofrer inúmeras mutações, passou a infectar humanos que se alimentavam da carne desses animais, entrando em contato com o vírus. Já o HIV-2, possivelmente surgiu na África ocidental a partir de outro SIV que infectava primatas mangabeis (VALERIANO, 2016).

O HIV-1 apresenta alta capacidade de mutação, atribuídas à transcriptase reversa e à sua alta taxa de replicação, mais propensa a erros (NOMAGUCHI et al., 2017). É um vírus bastante diversificado e por isso é classificado em grupos e subgrupos conhecidos por: grupos M (Main), O (Outlier), N (non-M e non-O) e P. Incluídos no grupo M encontram-se os subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K, quatro sub-subtipos do subtipo A (A1, A2, A3, e a4) e dois sub-subtipos do subtipo F (F1 e F2), 51 formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs) (VALERIANO, 2016).

Além de semelhanças genéticas, os dois tipos virais compartilham semelhanças biológicas como a depleção de linfócitos T CD4⁺ e mecanismos para transativação. Em contrapartida, o período de latência clínica na infecção por HIV-2 é mais extenso e a progressão e transmissão da doença são expressivamente menores com carga viral mais baixa no período assintomático quando comparados ao HIV-1 (VIJAYAN et al., 2017). As tabelas 1 e 2 mostram as comparações entre as infecções por HIV-1 e HIV-2 em relação às características clínicas e epidemiológicas e às respostas das células T CD4⁺.

Tabela 1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da depleção de células T CD4+ na infecção por HIV-1 e HIV-2.

Aspectos Clínico-epidemiológicas do HIV-1 e HIV-2	HIV-1	HIV-2
Distribuição geográfica	Global	Restrito à África Ocidental com propagação limitada. Também relatado em antigas colônias portuguesas, como Angola, Moçambique e Brasil, e em partes da Índia
Transmissão heterossexual	A forma de transmissão sexual é maior	Cinco vezes menor do que HIV-1
Transmissão vertical	A transmissão de mãe para filho é maior	20 a 30 vezes menor do que HIV-1
Duração do estágio assintomático	O tempo para desenvolver AIDS varia de alguns meses a muitos anos, com um tempo médio estimado de 9,8 anos	Duração mais longa, variando de 10 a 25 anos
Doença clínica	Se não tratadas, cerca de metade das pessoas infectadas com HIV-1 desenvolverá AIDS dentro de 10 anos	86-95% das pessoas infectadas com HIV-2 são não-progressores lentos
Carga de DNA pró-viral	Semelhante	Semelhante
Carga de RNA plasmático	Alta	Alta
Cinética da replicação viral	Maior replicação e 100 vezes mais apto	Replicação transitória e menos apto
Aptidão de infecção e transmissão	Semelhante e 100 vezes mais apto	Similar e menos apto
Uso de co-receptor	CXCR4 e CCR5	Vários co-receptores como CCR1, CCR2, CCR3, CXCR6, BOB, CCR5 e CXCR4

Fonte: VIDYA VIJAYAN et al., 2017.

Tabela 2. Aspectos da resposta celular de linfócitos T CD4+ na infecção por HIV-1 e HIV-2.

Respostas das células T CD4 + entre infecções por HIV-1 e HIV-2	HIV-1	HIV-2
Contagem de células T CD4+	Menor comparado ao HIV-2 com carga viral indetectável, mas semelhante ao HIV-2 com maior carga viral	Mais alto em HIV-2 com carga viral indetectável e semelhante ao HIV-1 com maior carga viral
Resposta de células T CD4+	Menor capacidade proliferativa e multifuncionalidade, e maior diferenciação	Melhor capacidade proliferativa, multifuncionalidade maior e menor diferenciação
Função tímica	O HIV-1 pode replicar-se eficientemente no tecido tímico. Não há correlação com a taxa de perda de células T CD4+	O HIV-2 é capaz de infectar o timo humano, mas isso está associado à replicação viral limitada. Correlata com menores taxas de células T CD4+
Produção de citocinas	As células produtoras de interleucina (IL) -2 e IL-4 diminuem com a progressão da doença	As células produtoras de IL-2- e IL-4 são melhor preservadas. A expressão de células produtoras de IL-2 e Interferon (IFN) - γ é maior
Expressão de CD57 em células T CD4+	Visto em menor frequência	Visto em maior frequência
Nível de ativação de células T CD4+	Correlação positiva entre o nível de lipopolisacárideo (LPS) e citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IFN- γ	Correlação negativa entre o nível de LPS e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos HIV-2 com carga viral indetectável
Suscetibilidade a Domínio SAM e Proteína 1 contendo domínio HD (SAMHD1)	As células mielóides são resistentes à infecção viral	A presença de Vpx** permite a infecção viral de células mieloides através da degradação de SAMHD1
Ativação imune e apoptose de células T	Maior ativação imune e mais apoptose	Menor ativação imune e menos apoptose de célula T
Nef	Não diminui a modulação do complexo CD3-Receptor de células T (TCR)	Diminui a modulação do complexo CD3-TCR

Fonte: VIDYA VIJAYAN et al., 2017. **Proteína acessória do HIV-2 e SIV.

- Ciclo Replicativo

São alvos do HIV-1 os tipos celulares que expressam em sua superfície os receptores CD4 e de quimiocinas, CCR5 (vírus M-trópico) e CXCR4 (vírus T-trópico) (Figura 6), como exemplo os linfócitos T CD4+, monócitos, macrófagos e células dendríticas presentes em linfonodos, baço, medula óssea, pulmão, cérebro, fígado e vagina, amídalas e reto (centros germinativos linfoides e superfícies linfoepiteliais) (LUCAS; NELSON, 2015). A transmissão pode ocorrer pela liberação de vírions no plasma sanguíneo (transfusão sanguínea, compartilhamento de seringa contaminada) ou fluidos corporais como sêmen, fluido vaginal e leite materno, a partir de contato sexual sem uso de preservativo, amamentação ou durante o período gestacional e no momento do parto (KILMARX, 2009; KOURTIS; BULTERYS, 2010).

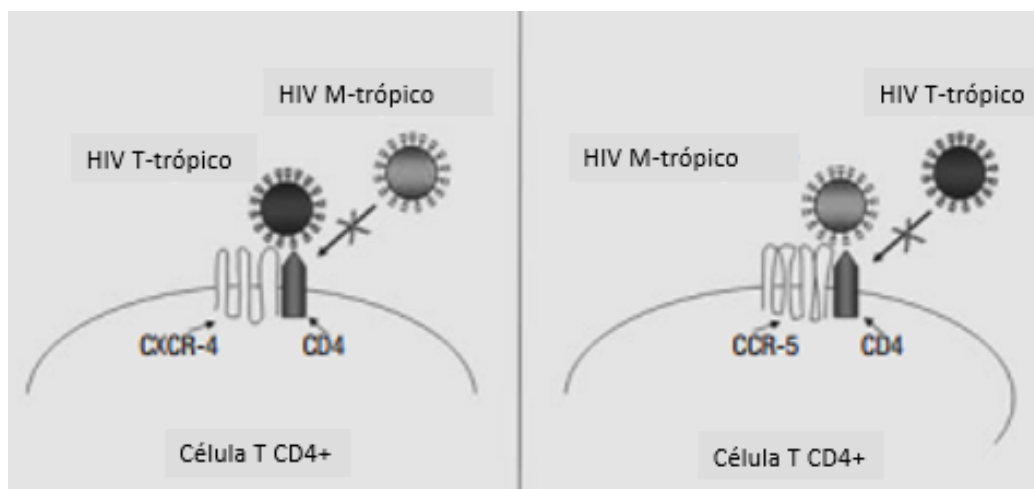


Figura 6. Tropismo do HIV: M-trópico – monócito/macrófago trópico; T-trópico – linfócito T trópico. Adaptado de: FANALES-BELASIO, et al., 2010.

A replicação do HIV-1 exige sua entrada na célula hospedeira e o uso da maquinaria dessa célula para sua propagação (BARMANIA; PEPPER, 2013). Seu ciclo replicativo compreende as etapas de ligação, fusão, desnudamento, retrotranscrição, integração do provírus, síntese e montagem de proteínas virais e brotamento (Figura 7).

A entrada viral na célula alvo envolve sua ligação à célula e, posteriormente, ativação e fusão, processos que dependem das proteínas do envelope, gp41 e gp120, por apresentarem peptídeo fusogênico e capacidade de ligação com o receptor CD4 celular. A ligação a gp120 possibilita uma mudança estrutural do envelope viral, permitindo a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira, liberando para o citoplasma o capsídeo viral. O capsídeo

viral sofre um processo de desmonte, chamado desnudamento, e dessa forma o RNA viral é revelado e liberado dentro do citoplasma. Neste processo se encontram envolvidas as proteínas p17, Vif e Nef (BARMANIA; PEPPER, 2013; FANALES-BELASIO et al., 2010).

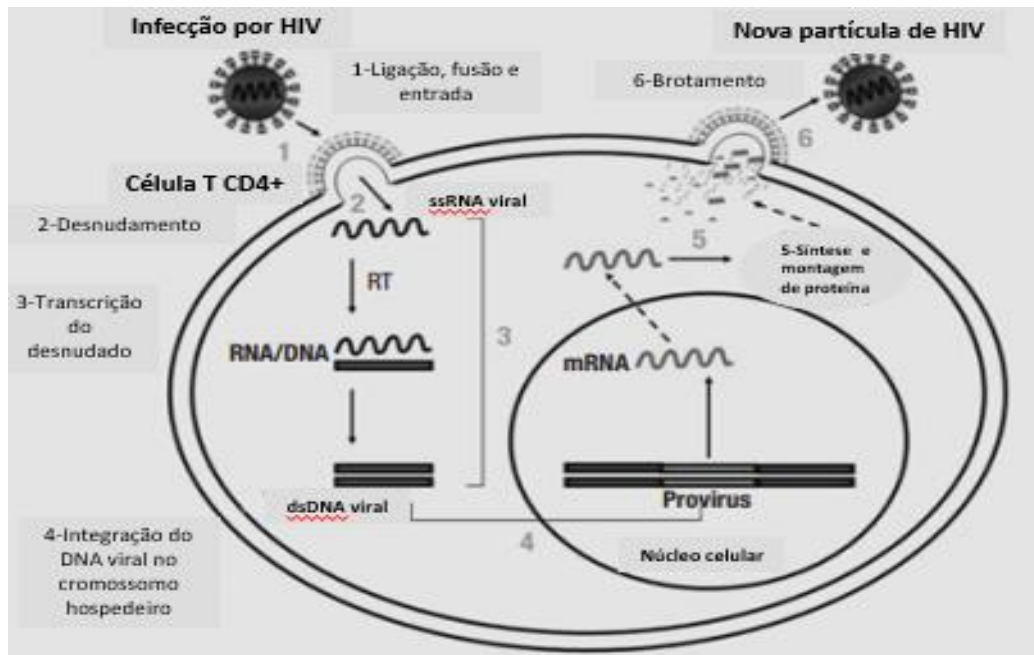


Figura 7. Etapas do ciclo replicativo do HIV. 1 – Ligação, fusão e entrada; 2 – Desnudamento; 3 – Retrotranscrição; 4 – Integração do provírus; 5 - Síntese e montagem de proteínas virais; 6 – Brotamento. Adaptado de: Fanales-belasio, 2010.

O RNA liberado é então transcrito em uma cadeia dupla de DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa e, posteriormente, incorporado a um complexo pré-integração e transportado para o núcleo da célula pela Vpr. Nesta etapa, a enzima integrase promove a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, gerando um provírus. Após a integração, a RNA polimerase hospedeira estimula a transcrição e a produção de Nef, Rev e Tat, responsáveis, dentre outras funções, pela promoção da transcrição e facilitação do movimento do mRNA para o citoplasma (BARMANIA; PEPPER, 2013), onde ocorre a síntese e a montagem das proteínas virais.

A cadeia de RNA, que não foi traduzida, se junta com as enzimas virais e são envolvidos pelas proteínas do núcleo, formando o capsídeo viral de uma partícula, ainda imatura, que migra para periferia celular. Logo após, várias proteínas virais são clivadas pela protease, permitindo a formação de partículas virais infecciosas. O processo de brotamento das partículas virais engloba a incorporação de proteínas da membrana celular hospedeira (HLA de classes I e II e

proteínas de adesão) para que ocorra a adesão do vírus a outras células alvo de forma facilitada (FANALES-BELASIO et al., 2010).

DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 pode ser feito por testes biológicos que detectem a presença de anticorpos anti-HIV em amostras de sangue, saliva e secreções vaginais, em um intervalo de tempo entre três e seis semanas, em média, após a infecção, ou também a partir do aparecimento de infecções oportunistas, que caracterizam um sinal evidente dessa doença (LAXMINARAYAN et al., 2006; WERSOM et al., 2013).

No Brasil, o diagnóstico por esse tipo de infecção é regulamentado pela Portaria 29, de 17 de dezembro de 2013, e realizado em laboratórios a partir de testes sorológicos e moleculares, ou ainda por testes rápidos durante o acompanhamento médico, seja domiciliar ou em centros de testagem e aconselhamento. A partir da confirmação, o indivíduo é direcionado a uma Unidade Básica de Saúde (UBS) do Sistema Único de Saúde (SUS) ou a um serviço especializado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

No intuito de obter uma resposta efetiva no controle da epidemia, estudos mostram que é necessária a identificação do perfil epidemiológico para que haja a priorização de estratégias de prevenção (LAXMINARAYAN et al., 2006). Dessa forma, o Ministério da Saúde (MS) tem priorizado uma combinação de fatores incluindo diagnóstico precoce, tratamento e intervenções de prevenção combinada, visando a contínua melhoria do cuidado dos indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O Brasil, desde 2013, é pioneiro, entre os países em desenvolvimento, na adoção de medidas que visam o tratamento como prevenção (do inglês Treatment as Prevention - TasP). Essas medidas estabelecem o tratamento imediato após o fechamento diagnóstico, independente da contagem de CD4, visando a melhoria da qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) e a redução da transmissão viral. Para tanto, os pacientes são acompanhados pelos serviços de saúde, em média, a cada três meses para avaliação das dosagens de carga viral (CV), contagem de células T CD4+ e dosagens laboratoriais de rotina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Com o surgimento da Terapia Antirretroviral (TARV), que atua eficientemente na supressão da replicação viral, o número de casos de morbimortalidade associados à aids diminuiu significativamente, tornando crônica uma doença que antes era considerada fatal

(BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; COELHO, 2013; CORBEAU; REYNES, 2011; TOZZI, 2010).

Inicialmente adotou-se a monoterapia, com o uso do primeiro medicamento anti-HIV, a azidotimidina (AZT) (VELLA et al., 2012), no entanto, com o passar do tempo, essa droga se mostrou ineficiente quanto à promoção da supressão da replicação viral devido à resistência adquirida decorrente das altas taxas de mutações no genoma do HIV-1 ocasionadas pela Transcriptase Reversa (TR) (TANG; SHAFER, 2012). Novos ensaios clínicos direcionaram a terapia para a utilização da combinação de mais de um antirretroviral, atuando em sítios distintos na replicação viral, diminuindo as chances de resistência simultânea e aumentando o êxito no combate do vírus (CRESSEY; LALLEMANT, 2007; HAMMER, et al., 1996).

Os principais antirretrovirais que integram a TARV são classificados de acordo com os seguintes regimes a depender do sítio ativo e modo de ação: Inibidores da TR Análogos a Nucleosídeos (INTR), Inibidores da TR não Análogos a Nucleosídeos (INNTR), Inibidores de Protease (IP), Inibidores de Integrase (do inglês integrase strand transfer inhibitor, INSTI), Inibidores de Fusão (IF) e Inibidores antagonistas do CCR5 (IAC) (BARREIRO et al., 2014; COELHO, 2013; CRESSEY; LALLEMANT, 2007; MICHAUD et al., 2012; TOZZI, 2010).

Os INTRs são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos que interrompem a síntese do material genético do vírus, sendo os primeiros medicamentos antirretrovirais disponíveis. Os INNTRs também impedem a síntese do material genético do vírus através ligação aos sítios alostéricos da transcriptase reversa, impedindo sua atividade. Os IPs interagem com a protease viral impedindo o processamento correto das proteínas, abolindo sua infectividade, mas seu efeito antirretroviral é também dependente da sua farmacocinética (COELHO, 2013; CRESSEY; LALLEMANT, 2007). Os INSTI atuam diretamente na integração do DNA viral ao genoma hospedeiro. Já os IAC impedem a utilização dos receptores CCR5 e CXCR4 pelo HIV-1 para entrar na célula alvo, através do bloqueio antagonista desses receptores (MICHAUD et al., 2012). Já os IF impedem a fusão entre o envelope viral e a membrana celular (VALERIANO, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza o uso de regimes como primeira linha por serem mais simplificados, menos tóxicos e mais convenientes como combinações de dose fixa. Nesse regime se encaixam as classes de INTR e INNTR. Como segunda linha, são utilizadas as classes INTR e IP. É recomendado o uso de esquemas com três drogas combinadas (duas drogas INTR e uma INNTR ou IP) embora sejam também administrados esquemas com

quatro ou cinco drogas em casos de falha virológica ou cepas resistentes a alguns antirretrovirais (ALVES et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A OMS classifica sumariamente o regime de primeira e segunda linhas de tratamento para adultos como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Regimes de primeira e segunda linhas de TARV para adultos.

Regimes principais

Até dezembro de 2018

Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) ou *Emtricitabina* (FTC) + *Efavirenz* (EFV)

A partir de dezembro de 2018

Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) + *Dolutegravir* (DTG)

Regimes secundários

Até dezembro de 2018

Zidovudina (AZT) + Lamivudina (3TC) + *Efavirenz* (EFV) ou *Nevirapina* (NVP)

A partir de dezembro de 2018

Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) ou *Emtricitabina* (FTC) + *Nevirapina* (NVP)

Zidovudina (AZT) + Lamivudina (3TC) + *Dolutegravir* (DTG) ou Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) + *Atazanavir/Ritonavir* (ATV/r) ou Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) + *Darunavir/Ritonavir* (DRV/r)

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2013; Ministério da Saúde, 2018.

No Brasil, o acesso ao tratamento é universal, gratuito e garantido por lei, o que tem reduzido notavelmente a incidência de infecções oportunistas (EGGERS et al., 2017). No entanto, cerca de 25% dos pacientes interrompem a TARV por condições relevantes como toxicidade medicamentosa, efeitos colaterais frequentes e/ou severos, incapacidade de suprimir a carga viral a níveis indetectáveis (falha virológica) e resistência adquirida ou cruzada de um medicamento sobre o outro (MICHAUD et al., 2012; MONTESSORI et al., 2004).

IMUNOPATOGENESE DO HIV-1, MECANISMOS DE ATIVAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EXTRÍNSECA

- Receptores de Morte e seus Ligantes

O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) é representante de uma família de citocinas e proteínas de superfície celular, como o Ligante do Fas (FasL/CD95L), que apresentam semelhanças em sequências de resíduos responsáveis por sua trimerização. É produzida por diversos tipos celulares como linfócitos, macrófagos e monócitos em resposta à inflamação, infecção e outras influências ambientais induzindo, por exemplo, respostas celulares como ativação e migração de leucocitárias, febre, respostas de fase aguda, proliferação e diferenciação celulares e apoptose (BAUD; KARIN, 2001). Essa citocina é capaz de induzir diversas repostas imunológicas através da sinalização por dois tipos de receptores ligados à membrana, os do tipo I (CD120a/TNFR1 - TNFRSF1A gene) expressos em todos os tipos celulares, e os do tipo II (CD120b/TNFR2 - TNFRSF1B gene) expressos principalmente em células do sistema imune (SENNIKOV et al., 2014).

Condições patológicas estimulam a clivagem do precursor do TNF- α em duas formas funcionais: uma forma associada à membrana plasmática, que se liga preferencialmente ao TNFR2, e uma forma solúvel, que se liga de maneira mais específica ao TNFR1 (PASQUEREAU; KUMAR; HERBEIN, 2017).

Os receptores TNFR1 correspondem a um grupo da família dos receptores de morte encontrados nos seres humanos, sendo classificados de acordo com a diversificação estrutural, o que caracteriza a especificação das funções de cada grupo (SESSLER et al., 2013). Já o TNFR2 desempenha papel importante na proliferação celular e ativação celular estimulada por antígeno (MUKAI et al., 2013).

Os receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR) apresentam em sua estrutura um domínio extracelular, de ligação com o ligante, e um domínio intracelular, que atua como mediador das vias de sinalização celular e onde se localiza uma porção de interação proteica chamada domínio de morte (DD), podendo ser classificados como: ativadores (incluindo CD40 ou TNFR2) ou de morte (incluindo TNFR1 e Fas) (Figura 8) (LI; YIN; WU, 2013).

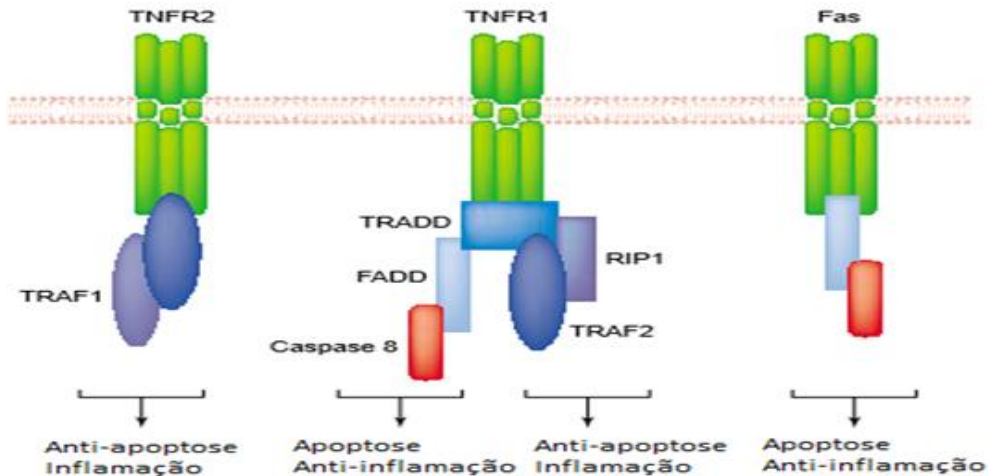


Figura 8. Componentes proximais das vias de transdução de sinal do Fator de Necrose Tumoral (TNF), TNF Receptor do tipo 1 (TNFR1), TNF Receptor do tipo 2 (TNFR2) e Fas e as suas relações com a ativação e a inibição da morte celular programada e inflamação. Adaptado de: BAUD & KARIN, 2001.

A ligação TNFR1 com o TNF- α leva a uma mudança conformacional desse receptor induzindo o recrutamento de moléculas adaptadoras culminando na ativação das vias de sinalização intracelulares (LI et al., 2010). TNFR1 e Fas, transduzem sinais apoptóticos e anti-inflamatórios através do recrutamento de proteína domínio de morte associada ao Fas (FADD) e recrutamento e subsequente ativação de caspase 8. TNFR1 medeia também as respostas anti-apoptóticas e inflamatórias através do recrutamento de Fator 2 associado ao Receptor TNF (TRAF2) e Proteína 1 de Interação com o Receptor (RIP1). Outros membros da família de receptores de TNF, tais como TNFR2, recrutam TRAF2 e TRAF1 para transmitir os seus sinais anti-apoptóticos e inflamatórios (BAUD; KARIN; KARIN, 2001).

A ativação desses sinais e consequente ativação da proteína DD associada ao receptor TNF (TRADD), a qual recruta as proteínas RIP1 (proteína cinase que interage com o receptor), cIAP1 e 2 (proteína inibidora de apoptose celular 1 e 2) e TRAF2 (fator 2 associado ao receptor TNF) (LI; YIN; WU, 2013), dispara uma cascata de sinalização, induzindo a ativação de um complexo proteico, denominado NF- κ B (fator nuclear-kappa B) (SHIBATA et al., 2012), que por sua vez, ativa genes pró-inflamatórios quando translocado para o núcleo (Figura 9) (CUBERO et al., 2013).

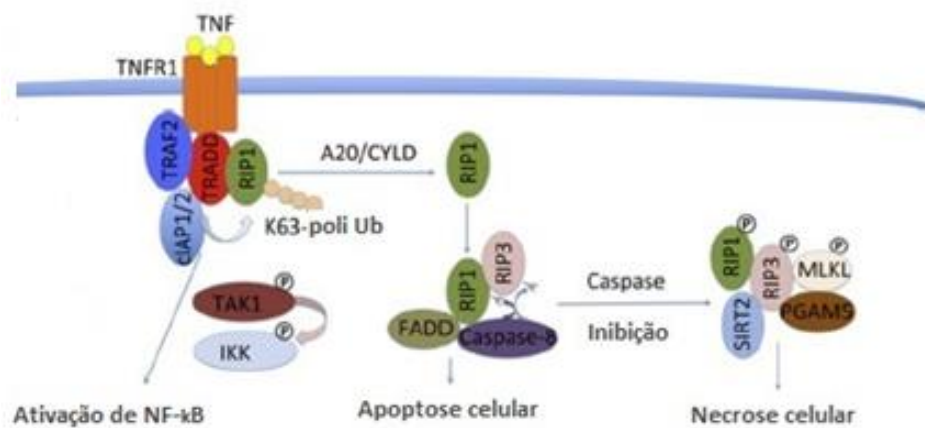


Figura 9. Resumo das vias de sinalização da superfamília de receptores de TNF. Após a ligação do TNF com TNFR1, ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras (TRADD, TRAF2 e RIP1). A formação do complexo de moléculas adaptadoras recruta proteínas inibidoras de apoptose (IAP1/2) que agem formando cadeias de ubiquitina ativando NF- κ B. A quebra das cadeias de poliubiquitina induz a ativação de outras moléculas adaptadoras (FADD, RIP3) e caspases estimulando mecanismos pró-apoptóticos. Modificada de: LI et al., 2013.

Linfócitos T CD8⁺ também desempenham papel importante no combate a infecções por HIV-1 (KUERTEN et al., 2008). A indução de morte celular por ativação de Fas/FasL, a secreção de perforina e granzimas, e também de IFN- γ , a partir desses linfócitos são mecanismos ativados no intuito de impedir a disseminação do vírus (CHORIN et al., 2014). As perforinas, juntamente com granzimas B, são armazenadas em grânulos no citoplasma dos LT CD8⁺, sendo liberadas para a célula-alvo apenas quando há reconhecimento do antígeno, o que possibilita a inserção de suas moléculas na membrana celular, ativando caspases e conduzindo à morte (KUERTEN et al., 2008).

O antígeno Fas pertence à família do TNF- α e sua ligação com o ligante, ativa mecanismos apoptóticos semelhantes àqueles induzidos pelo TNF, principalmente em células T do sangue periférico, sendo assim considerada como uma possível via para apoptose em células infectadas pelo HIV-1 devido ao alto nível de expressão detectável de FasL/Fas em macrófagos de pacientes infectados (MBITA; HULL; DLAMINI, 2014).

- Fator de Transcrição Nuclear kappa B

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) consiste em um fator dimérico composto por membros da família Rel/NF- κ B, dentre eles p50, p52, RelA, RelB e c-Rel

(SHIBATA et al., 2012), que age como um fator de transcrição essencial envolvido em respostas imunes inata e adaptativa, inflamação, adesão e sobrevivência celular (SHEMBADE; HARHAJ, 2010; TOKUNAGA et al., 2012). Tais fatores são reguladores chave da imunidade e de processos inflamatórios induzidos por lesões e infecções (NAPETSCHNIG; WU, 2013).

A região dimérica do NF- κ B, que se liga ao DNA, consiste em subunidades da família Rel onde são formados dois domínios do tipo imunoglobulina: o terminal-C e o terminal-N de contato com o DNA. Além disso, encontram-se seis proteínas inibidoras I κ B, que controlam a ativação dos dímeros e liberação do NF- κ B, através da fosforilação e degradação pelo proteassoma (NAPETSCHNIG; WU, 2013). A fosforilação desse inibidor ocorre de forma rápida e através de um complexo específico de E3 ubiquitina ligase (KARIN; DELHASE, 2000).

Sua via comum de ativação está relacionada ao TNF- α , uma citocina pleiotrópica (FRAGOSO LONA et al., 2013), pró-inflamatória e envolvida na patogênese de diversas doenças como artrite reumatoide (GARG et al., 2013), neuropatia periférica diabética (SHI et al., 2013) e psoríase (DOGRA; KHULLAR, 2013).

- A20

A molécula A20 atua de forma antagônica à via comum do NF- κ B. Trata-se de uma proteína desubiquitinadora, composta por múltiplos domínios, com função anti-inflamatória e pró-apoptótica, codificada pelo gene TNFAIP3 (GARG et al., 2013; MA; MALYNN, 2012; SHEMBADE; HARHAJ, 2010; TOKUNAGA et al., 2012). Essa proteína é induzida por TNF- α e IL-1 que regula negativamente a expressão de NF- κ B (HEYININCK et al., 1999), além de modificar ubiquitina dupla e apresentar importância terapêutica no tratamento de doenças onde haja resposta inflamatória no processo patogênico (LIN et al., 2008).

Estudos mostram que a A20, na maioria das células, é induzida pelo NF- κ B e atua num ciclo contrário a esse fator, equilibrando a transitoriedade da sua resposta, de forma que camundongos que não a apresentam sofrem, por exemplo, de inflamação de múltiplos órgãos (SHEMBADE; HARHAJ, 2010). Embora essa condição não seja bem esclarecida, outras abordagens indicam que há também sua indução em outros tipos celulares, além das endoteliais humanas, por tipos variados de estímulos tais como infecções virais, tratamento com LPS, e o envolvimento de CD40 e CD30 (LIN et al., 2008).

Atualmente é descrito que pela via do receptor do TNF- α , a E3, a TRAF2 e a RIP1 são alvos de A20, enquanto que pelas vias de sinalização por IL-1R e TLR, a TRAF6 é o seu alvo chave (GARG et al., 2013). Segundo Ma e Malynn (2012), essa molécula de sinalização anti-inflamatória, é de grande importância, pois regula diversas funções das células imunológicas, prevenindo doenças em condições experimentais semelhantes às condições humanas, e por regular a sobrevivência celular.

Os mecanismos moleculares pelos quais a A20 executa variadas funções como morte celular e inibição de NF- κ B são incompreendidos, mas entende-se que são relacionados à regulação de sinalização dependente de ubiquitina (MA; MALYNN, 2012). Dentre as rotas possíveis de morte celular pode-se encontrar a apoptose, que é a mais comum forma de morte em infecções por HIV-1 (KORNBLUTH, 1994), e também a necroptose como tipo distinto de apoptose sendo essa uma alternativa em que a caspase 8 cliva e, dessa forma, inativa a RIP1 ou a RIP3 pela via dependente do TNFR1 (LI; YIN; WU, 2013).

- Imunopatogênese do HIV-1 e Apoptose

O HIV-1 tem capacidade de infectar células latentes e provocar efeitos citopáticos em curto prazo, sendo essa infecção dada quando a glicoproteína do seu envelope (codificada pelo gene Env) se liga ao CD4 celular e a um correceptor de quimiocina (ABBAS et al., 2011).

A infecção por HIV-1 é caracterizada pela ativação contínua do sistema imunológico. Macrófagos e outros tipos celulares são permissivos à infecção, modulando as vias de sinalização e os mecanismos apoptóticos próprios do hospedeiro (HERBEIN et al., 2010; MBITA; HULL; DLAMINI, 2014).

A patogênese do HIV-1 é desencadeada pela depleção dos linfócitos T CD4, que leva à imunodeficiência, e a presença de células latentes (macrófagos associados ao intestino), que servem como reservatórios virais. Esses reservatórios possivelmente sofrem regulação negativa dos receptores CD4 e CCR5 induzida pelo estroma intestinal, diminuindo a ativação de NF- κ B (KUMAR; ABBAS; HERBEIN, 2014).

Enquanto ocorre o declínio do percentual de linfócitos, o número de macrófagos permanece constante contribuindo para a replicação viral. Tal declínio é consequência da atuação dos linfócitos T CD8⁺ (LT CD8⁺) que matam os LT CD4⁺ infectados de forma que o

hospedeiro se torna imunocomprometido e suscetível a novas infecções oportunistas e novas patologias (MBITA; HULL; DLAMINI, 2014).

O mecanismo que dispara o declínio progressivo de LT CD4⁺ em indivíduos infectados é controverso. A maioria das infecções ocorre em células T latentes que expressam quantidades mínimas de proteínas virais (CHORIN et al., 2014). Acredita-se que na ausência de relação significativa entre a morte celular por apoptose e o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) ou o Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), embora não tenham sido observados dados publicados suficientes para tal confirmação. Já De Pablo-Bernal¹ e colaboradores (2014) dizem existirem concentrações persistentemente altas de TNF- α e IL-6 (Interleucina-6) no plasma de indivíduos infectados por HIV não tratados.

Outros estudos tratam um dos fatores responsáveis pela perda de LT CD4⁺ durante infecções por HIV-1 como sendo a morte celular por apoptose. Corbeau e Reynes (2011) abordam em seu estudo, dentre outros fatores, sobre a intensidade da apoptose induzida por Fas após a TARV. Nesse contexto, é mostrado que a apoptose tem sido inversamente correlacionada com a progressão de LT CD4⁺ e, dessa forma, é natural que SNPs em genes como TRAIL, Fas, FasL e Bim relacionados à apoptose tenham associação com o aumento da contagem de LT CD4⁺ através da terapia.

Variações nos genes relacionados às vias de resposta imunológica podem apresentar influência na interação entre o vírus e o hospedeiro (COELHO et al., 2013). Estudos prévios envolvendo polimorfismos de base única (SNPs) no TNFR1 e TNF- α , desenvolvidos por Xu e colaboradores (2014), Rittore e colaboradores (2014) e Zidi e colaboradores (2015) apontaram relação entre os SNPs estudados e severidade da Síndrome Periódica Associada ao TNFR, ao aumento da produção e transcrição do TNF- α e aumento do risco de evolução de tumores cervicais, respectivamente.

De acordo com Herbein e colaboradores (2010), é crucial entender as vias de sinalização envolvidas na ativação de macrófagos a partir de infecções por HIV-1 visto que essa abordagem pode levar ao desenvolvimento de novas terapias. Para tanto, foi proposto um modelo para a patogênese do HIV-1 baseado em interações entre macrófagos e linfócitos. Esse modelo envolve a capacidade das proteínas virais na modulação de vias de sinalização em macrófagos, que resulta na depleção dos linfócitos T e formação de reservatórios virais. Por esse modelo, a proteína viral Nef, expressa no início do ciclo viral, regula negativamente a expressão de CD4, CD28, MHC de classe I na superfície celular e várias vias de sinalização. Já a proteína Tat é

tida como crucial para a replicação viral, enquanto Vpr tem sido relacionada com efeitos pleiotrópicos tanto na replicação viral, como na produção de citocina e transcrição mediada por NF- κ B e apoptose. A gp120 também está envolvida na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que podem aumentar a expressão de TNF- α e seus receptores, conduzindo à apoptose de células T CD8⁺ e contribuindo para a persistência viral e a supressão imunológica (Figura 10).

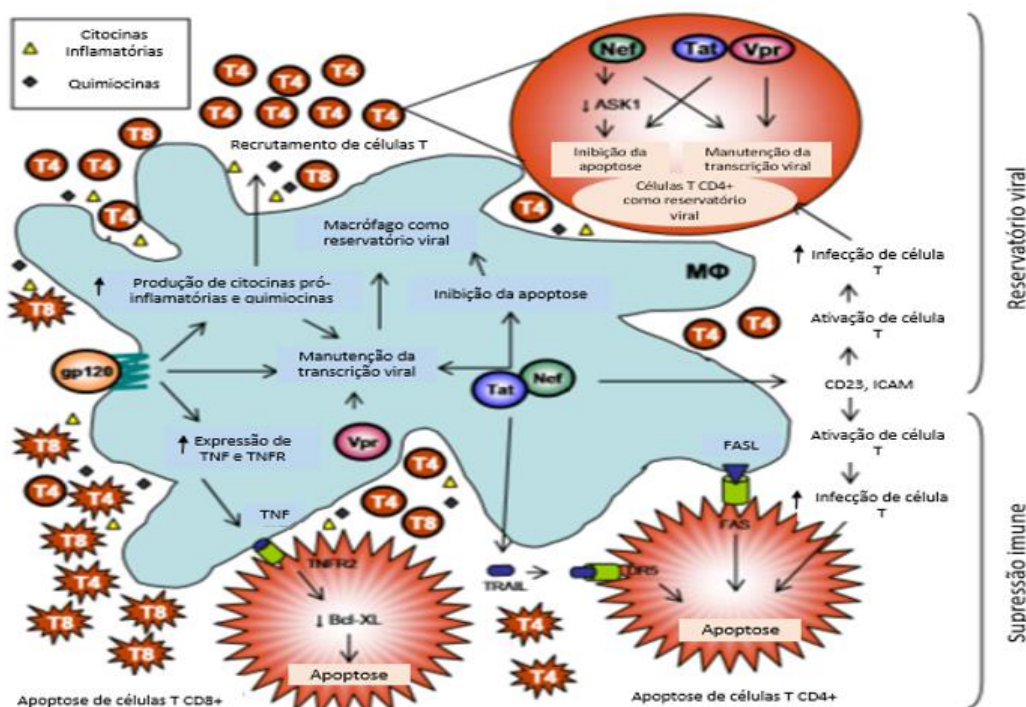


Figura 10. Patogênese do HIV-1 baseada na interação entre macrófagos e células T. Observa-se a modulação das vias de sinalização por fatores virais (Tat, Nef e gp120) em macrófagos e a formação de reservatórios virais. A gp120 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem células para a periferia dos macrófagos aumentando o número de células alvo para futuras infecções enquanto Nef, Tat, Nef e Vpr ativam mecanismos anti-apoptóticos favorecendo a persistência do vírus e contribuindo para a formação de reservatórios virais. Por outro lado, Tat induz a secreção de ligantes de morte (TRAIL) e a gp120 aumenta a produção de TNF- α e receptores de morte (TNFR2 e Fas) conduzindo as células vizinhas à apoptose, aumentando a supressão imunológica. Modificado de: HERBEIN et al., 2010.

Ainda de acordo com Herbein (2010), na patogênese do HIV-1 em macrófagos, Nef atua prevenindo a morte mediada por receptores do TNF e Fas, visto que inibe ASK-1 (quinase 1 reguladora do sinal de apoptose), caspase 8 e caspase 3. Em seu modelo de patogênese baseado na interação entre macrófagos e linfócitos T, a gp120 viral aumenta a produção de citocinas

pró-inflamatórias e quimiocinas, recrutando outras células T para a vizinhança dos macrófagos infectados, aumentando a infectividade e a formação de reservatórios virais, onde a ação conjunta de Nef, Tat e Vpr mantém a transcrição viral. Por outro lado, Tat e Nef induzem a ativação de célula T e a liberação de TRAIL, enquanto a gp120 induz a expressão de receptores de morte (Fas e TNFR) em LT CD4⁺ e CD8⁺ e participa da morte dessas células por apoptose, contribuindo assim para a persistência viral e supressão do sistema imune durante a infecção. Dessa forma, percebe-se que, em macrófagos, a interação entre as proteínas envolvidas na patogênese do HIV-1 está bem determinada, mas em linfócitos essa interação permanece incerta.

A apoptose se apresenta como um mecanismo importante de depleção de células T na infecção pelo HIV-1 (PITRAK et al., 2014). Esse tipo de morte celular programada ocorre por duas vias que se convergem: a extrínseca e a intrínseca. Tais vias são induzidas pela ativação de receptores de morte e seus ligantes, ou mesmo, pela ruptura da membrana mitocondrial, a partir da perda do potencial da membrana em decorrência do desequilíbrio entre proteínas da família Bcl-2, que aumenta a permeabilidade dos poros membranares e permite o extravasamento de citocromo c, ativando as caspases. Pela extrínseca, as ligações entre FasL/Fas e TNF α /TNFR1 estimulam caspases ativadoras 8 e 10 e, conseqüentemente, caspases efetoras 3 e 7 levando à morte da célula (MBITA; HULL; DLAMINI, 2014; PITRAK et al., 2014). Em células vizinhas não infectadas, a apoptose ocorre por meio de mecanismos já estabelecidos como a liberação de inositol trifosfato (IP3) e sinais de cálcio pelas junções gap, além de interações proteína-proteína, por exemplo (CASTELLANO; PREVEDEL; EUGENIN, 2017).

Em infecções virais, a regulação da apoptose visa favorecer a replicação e sobrevivência do vírus através da ativação de pró-caspases e caspases. Por outro lado, esse mesmo mecanismo em infecções persistentes, contribui para a persistência e/ou latência viral (SCHNEPPLE et al., 2011).

Em um panorama mais atual, o estudo desenvolvido por Castellano, Prevedel e Eugenin (2017) também aborda a formação de reservatórios virais em macrófagos e células da micróglia, através de mecanismos que envolvem a molécula pró-apoptótica Bim, reguladora negativa da Bcl-2. Nas condições avaliadas, a Bim apresentou expressão aumentada em alguns macrófagos sobreviventes pós-infecção, sugerindo uma função alternativa de Bim nessas células ou que o HIV pode bloquear sua ação apoptótica e, assim, possibilitar a formação dos reservatórios.

A ativação apoptótica pelo HIV-1 tem sido relacionada a atuação de genes e proteínas virais ligadas diretamente à infecção. Segundo Garg, Mohl e Joshi (2012), o gene Env se destaca na ligação aos receptores hospedeiros e na fusão entre as membranas viral e hospedeira, formando sincícios e facilitando a transmissão viral entre células infectadas e não infectadas, aumentando a apoptose. Já Guenzel, Hérate e Benichou (2014), destacam a atuação do gene Vpr e da proteína R viral (vpr) que regulam a replicação viral em macrófagos, importantes e duradouros reservatórios virais. Já a proteína Gag participa do capsídeo viral e após a expressão do seu precursor, possibilita a migração para a membrana plasmática e participação da montagem de uma partícula viral imatura (RUMLOVÁ et al., 2014).

A proteína Nef está envolvida na regulação da expressão de CD4, CD28 e MHC de classe I na superfície celular e modula vias de sinalização em células dendríticas (HERBEIN et al., 2010). Tal proteína também pode ativar moléculas associadas à cascata de sinalização, mediando efeitos anti-apoptóticos (KUMAR; ABBAS; HERBEIN, 2014). Todo esse contexto demonstra a importância existente na interação entre os fatores virais e citocinas, receptores de morte e moléculas intracelulares do hospedeiro para a elucidação do processo de patogênese do HIV-1.

INTERAÇÕES MOLECULARES *IN SILICO*

Com os avanços tecnológicos em sequenciamento e montagem de bancos de dados, a criação de ferramentas de bioinformática capazes de analisar tais informações nas áreas de cristalografia de raio x e ressonância magnética nuclear (RMN) possibilitaram a criação, em 1971, do banco de dados denominado PDB (do inglês Protein Data Bank – <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Sua finalidade era armazenar estruturas cristalizadas de macromoléculas biológicas (BERMAN et al., 2000). Outros bancos de dados como o TrEMBL e NCBI também apresentam essa finalidade com números de estruturas resolvidas superior ao PDB, mas de acordo com (SCHWEDE et al., 2003) esse quantitativo ainda é baixo levando alguns pesquisadores a utilizarem estruturas já resolvidas como molde (modelagem por homologia ou comparativa) a depender do objetivo dos estudos a serem desenvolvidos.

Docking proteico e análise pós-docking são exemplos de métodos computacionais atuais utilizados a fim de complementar as análises experimentais e auxiliar na construção de interações estruturais humanas, porém essa predição estrutural proteína-proteína ainda é considerada desafiadora (BARRADAS-BAUTISTA; FERNÁNDEZ-RECIO, 2017). De uma

forma geral, a bioinformática foca no entendimento de moléculas e dos eventos mediados por elas como a identificação do modo de interação dessas moléculas, e no cenário da dinâmica molecular que engloba a caracterização da flexibilidade molecular e a avaliação do efeito das mudanças estruturais e ambientais na função de biomoléculas (VERLI, 2014).

- Docking Molecular

O docking molecular consiste em uma técnica para modelagem da interação atômica entre macromoléculas que possibilita determinar o comportamento de moléculas diversas no sítio de ligação de proteínas e esclarecer processos bioquímicos relevantes. Essa técnica permite prever a conformação, a posição e a orientação do ligante no sítio ativo (complexo receptor-ligante) e estimar a afinidade da ligação (energia livre de interação) através de estratégias computacionais (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003; KITCHEN et al., 2004; MENG et al., 2011; MORRIS; LIM-WILBY, 2008). As predições de energia livre são importantes para a identificação da estrutura secundária de moléculas de RNA e localização de regiões de DNA onde se ligam fatores reguladores da transcrição para especificação enzima-substrato e receptores por ligantes ou moduladores, focos deste estudo (VERLI, 2014).

Duas etapas, que se inter-relacionam, caracterizam o docking: 1) seleção das conformações do ligante no sítio ativo, e 2) ranqueamento dessas conformações através de função de pontuação. Neste sentido, os algoritmos de amostragem devem reproduzir a conformação da mesma forma que a função deve ranqueá-la como a melhor em comparação a todas as outras obtidas (MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

Inicialmente, os métodos computacionais utilizados para docking eram baseados no modelo de Fischer, onde receptor e ligante eram considerados corpos rígidos. Posteriormente, os métodos passaram a ser baseados na teoria de “encaixe induzido”, proposta por Koshland, levando em consideração a remodelação dos sítios ativos a partir da interação com o ligante (SÁ, 2015).

- Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular se aplica à descrição da variação do comportamento das moléculas em relação ao tempo. Entende-se como comportamento as propriedades a seguir: conteúdo de estrutura secundária, orientação de cadeias laterais, conformação de alças e energia

de interação entre enzima-substrato, proteína-proteína, proteína-DNA ou ainda fármaco-receptor. Mas, apesar de todos os benefícios obtidos a partir desse tipo de simulação, é necessário ter conhecimento das limitações inerentes à uma técnica experimental, tais como incapacidade de descrever reações químicas relacionadas à ação de enzimas ou processos de oxidação e redução, evitando interpretações equivocadas dos resultados (VERLI, 2014).

As simulações de dinâmica se baseiam nas equações de movimento de Newton a fim de calcular a trajetória da partícula a partir de uma dada configuração (SÁ, 2015). O sistema utilizado contém um ambiente virtual com a molécula de interesse e moléculas de água que preenchem os espaços vazios dentro da caixa. (LINDAHL, 2008; SÁ, 2015).

De forma simplificada, a dinâmica permite a obtenção de modelos moleculares mais fiéis à realidade biológica por agregar as características de flexibilidade molecular e de temperatura através da aceleração dos átomos (VERLI, 2014).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar os mecanismos de ativação das vias extrínsecas da apoptose (TNFR1, TNFR2 e Fas) e suas correlações com mecanismos de inflamação durante a infecção pelo HIV-1.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência de variações genéticas nos genes do TNF- α , TNFR1, A20 e NF- κ B na infecção pelo HIV-1;
- Avaliar a ativação de mecanismos de morte celular de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de grupos de pacientes infectados por HIV-1 e de indivíduos saudáveis;
- Descrever as interações moleculares *in silico* entre a molécula HIV-1 gp120, TNFR1, TNFR2 e Fas e seus ligantes envolvidos nas vias extrínsecas da apoptose.

2 MÉTODO

2.1 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE VARIAÇÕES GENÉTICAS NA VIA DO TNF- α /TNFR1

2.1.1 População de estudo

Nossa população de estudo foi composta por 155 indivíduos infectados pelo HIV-1, de ambos os sexos, com faixa etária de 18 a 50 anos, oriundos das cidades da região metropolitana do Recife e cidades do interior do estado de Pernambuco, atendidos e tratados no Hospital dia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

O recrutamento se deu no período de novembro de 2013 a dezembro de 2015. Os indivíduos foram convidados a participar do estudo e aqueles que aceitaram, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). Todos os procedimentos utilizados no recrutamento, no manejo das amostras biológicas e experimentos foram apreciados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (registro nº 3629-13) (Anexo B).

Os critérios de inclusão definidos foram: indivíduos em uso regular de TARV, maiores de 18 anos, em período mínimo de um ano ininterrupto e com carga viral indetectável (< 50 cópias/mL) no mesmo período (pacientes em sucesso virológico) e presença dos dados clínicos nos prontuários. Foram excluídos: indivíduos menores de 18 anos, indivíduos com má adesão a TARV e em falha virológica, bem como, aqueles com ausência de dados clínicos nos prontuários.

O grupo de estudo foi formado por 155 indivíduos infectados por HIV-1, os quais foram divididos em dois grupos de acordo com a classificação de LI et al., (2011): Grupo Controle (Sucesso Imunológico) - indivíduos com recuperação de linfócito T CD4 $^{+}$ ≥ 200 células em relação ao baseline (contagem de CD4 $^{+}$ pré-tratamento); e Grupo Caso (Falha Imunológica) - indivíduos com recuperação de CD4 $^{+}$ < 200 células em relação ao baseline. Os grupos Controle e Caso foram compostos por 102 e 53 indivíduos, respectivamente, conforme esquematizado na Figura 11.

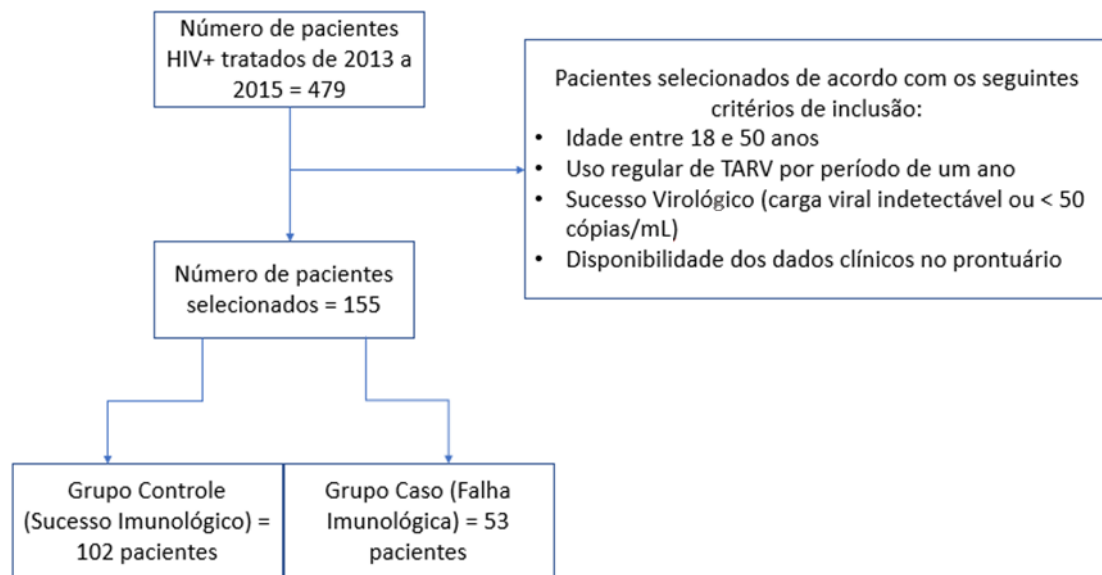


Figura 11. Fluxograma e critérios de inclusão para a seleção de pacientes do estudo.

2.1.2 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído de sangue venoso periférico coletado em tubos de 4 ml contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A extração seguiu o protocolo para o método Mini Salting-out (S.A.MILLER, 1988), com modificações. As amostras extraídas foram quantificadas em Nanodrop a fim de verificar a concentração e a pureza do material.

2.1.3 Seleção dos Polimorfismos e Genotipagem

A seleção dos polimorfismos foi baseada no impacto funcional dos variantes, nas frequências alélicas mínimas em populações africana e europeia, bem como na prévia associação dos variantes com outras patologias de caráter inflamatório. Foram realizadas buscas na literatura (HULIN-CURTIS et al., 2013; RITTORE et al., 2014; XU et al., 2014; ZIDI et al., 2015) em bancos de dados (1000 Genomes, HapMap), e no Polyphen-2 (para prever os possíveis efeitos na estrutura e função dos SNPs) e selecionados cinco polimorfismos de única base (SNPs): rs1800692 A>G (intron 4 do gene *TNFRSF1A*), rs767455 C>T (exon 1 do gene *TNFRSF1A*), rs2270926 G>T (exon 2 do gene *TNFAIP3*), rs8904 A>G (região 3'UTR do gene *NFKBIA*) e rs1800629 A>G (região promotora do gene *TNF*) como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização dos SNPs selecionados para o estudo.

Gene	SNPs	Cro	V (S/VA)	RG	TV	MAF	Função
<i>TNFRSF1A</i>	rs1800692	12	C/T	Intron 4	Missense	0.307	Haplótipos T-T associados com doenças inflamatórias e C-C-C e T-T-T com a severidade de TRAPS* e com a deleção do exon 2 ¹ .
<i>TNFRSF1A</i>	rs767455	12	C/T	Exon 1	Sinônima	0.485	
<i>TNFAIP3</i>	rs2270926	6	T/G	Exon 2	Missense	0.124	Efeito benigno apresentado no Polyphen-2.
<i>NFKBIA</i>	rs8904	14	G/A	3'LTR	Regulatória	0.424	Nível aumentado de ácido hialurônico como marcador inflamatório ² .
<i>TNF</i>	rs1800629	6	G/A	Promotor	Regulatória	0.095	Transcrição e produção de TNF- α aumentada ³ .

Cro= Cromossomo; V = variação; S = alelo selvagem; VA = variante; RG = região do gene; TV = tipo de variação; MAF = frequência alélica mínima;; *Síndrome periódica associada ao TNFR; ¹XU et al., 2014; RITTORE et al., 2014. ²HULIN-CURTIS et al., 2013. ³ZIDI et al., 2014.

Foram utilizadas para realização da genotipagem as seguintes sondas alelo específicas fluorescentes (TaqMan®): C__8921230_20 (rs1800692), C__2298465_20 (rs767455), C__7514879_10 (rs1800629), C__145670_10 (rs8904) e C__8921230 (rs1800692). As reações de genotipagem dos SNPs foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante utilizando o sistema de detecção de sequência automatizado Real Time PCR (ABI 7500 SDS System) (Foster City, CS, USA).

2.1.4 Análises dos Dados

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas por contagem direta. A adesão ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e possíveis associações foram verificadas por meio do Teste Qui-Quadrado (X^2) e Teste Exato de Fisher, respectivamente. Todos os testes foram bicaudais com um nível de significância de $\alpha = 0,05$. O desequilíbrio de ligação (DL) e as frequências haplotípicas foram avaliados usando Haploview versão 4.2 (BARRETT et al., 2005). As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas foram comparadas entre os grupos de estudo utilizando o teste exato de Fisher.

Análise estatística univariada e regressão logística foram realizadas. O teste do qui-quadrado (X^2) foi utilizado para comparações utilizando variáveis categóricas, enquanto o teste de Mann-Whitney foi realizado para comparações envolvendo variáveis quantitativas.

Adicionalmente, investigamos se alguns genótipos do gene da apoptose estavam associados ao tempo até a recuperação imunológica através da modelagem da análise de sobrevivência. Utilizamos testes de log-rank para avaliar se houve diferenças significativas no tempo até a recuperação imunológica de acordo com os genótipos. Em seguida, incluímos genótipos ao longo de variáveis clínicas em um modelo multivariado de riscos proporcionais de Cox, para controlar possíveis confusões. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R versão 2.11.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013)

2.2 BUSCA DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR RELACIONADOS À FALHA IMUNOLÓGICA

Para realização da revisão sistemática, foram acessados estudos publicados nos bancos de dados PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e SciELO no dia 03 de julho de 2018 utilizando as cadeias de pesquisa presentes na tabela a seguir (Tabela 5). Os tipos de morte celular incluídos na busca foram baseados na determinação das Diretrizes do Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular (NCCD) (GALLUZZI et al., 2018).

Os estudos foram selecionados a partir dos seguintes critérios de inclusão: artigo publicado nas línguas inglesa ou portuguesa, artigo completo disponível nos bancos de dados, publicado em janeiro ou a partir de janeiro de 2003, inserido no contexto de morte celular e patogênese do HIV. Foi elaborado um protocolo contendo os métodos de análise e os critérios de inclusão determinados inicialmente (Apêndice A).

Tabela 5. Cadeias de Pesquisa usadas para pesquisa de dados com base nos tipos de morte celular.

Tipos de morte celular	Cadeias de pesquisa	Resultados (total de artigos encontrados)
<i>Apoptose</i>	hiv AND haart AND apoptosis AND immune reconstitution	64
<i>Necrose</i>	hiv AND haart AND necrosis AND immune reconstitution	69
<i>Piroptose</i>	hiv AND haart AND pyroptosis AND immune reconstitution	13
<i>Morte celular accidental</i>	hiv AND haart AND accidental cell death AND immune reconstitution	0
<i>Acd</i>	hiv AND haart AND acd AND immune reconstitution	0
<i>Anoikis</i>	hiv AND haart AND anoikis AND immune reconstitution	0
<i>Morte celular</i>	hiv AND haart AND cell death AND immune reconstitution	49
<i>Senescência celular</i>	hiv AND haart AND cellular senescence AND immune reconstitution	4
<i>Eferocitose</i>	hiv AND haart AND efferocytosis AND immune reconstitution	0
<i>Morte celular entótica</i>	hiv AND haart AND entotic cell death AND immune reconstitution	0
<i>Apoptose extrínseca</i>	hiv AND haart AND extrinsic apoptosis AND immune reconstitution	14
<i>Ferroptose</i>	hiv AND haart AND ferroptosis AND immune reconstitution	0
<i>Morte celular imunogênica</i>	hiv AND haart AND immunogenic cell death AND immune reconstitution	0
<i>Apoptose intrínseca</i>	hiv AND haart AND intrinsic apoptosis AND immune reconstitution	14
<i>Morte celular dependente de lisossomo</i>	hiv AND haart AND lysosome-dependent cell death AND immune reconstitution	0
<i>Necrose de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT)</i>	hiv AND haart AND mitochondrial permeability transition (MPT)-driven necrosis AND immune reconstitution	0
<i>Catástrofe mitótica</i>	hiv AND haart AND mitotic catastrophe AND immune reconstitution	0
<i>Morte mitótica</i>	hiv AND haart AND mitotic death AND immune reconstitution	0
<i>Necroptose</i>	hiv AND haart AND necroptosis AND immune reconstitution	0
<i>Morte celular NETótica</i>	hiv AND haart AND NETotic cell death AND immune reconstitution	0
<i>Parthanatos</i>	hiv AND haart AND parthanatos AND immune reconstitution	0
<i>Morte celular programada pcd</i>	hiv AND haart AND programmed cell death AND immune reconstitution	57
	hiv AND haart AND pcd AND immune reconstitution	2
<i>Morte celular regulada rcd</i>	hiv AND haart AND regulated cell death AND immune reconstitution	4
	hiv AND haart AND rcd AND immune reconstitution	0
<i>Apoptose</i>	<i>Artigos adicionais</i>	2
		292

2.3 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS CELULARES DAS VIAS DE INFLAMAÇÃO/APOPTOSE E GP120

2.3.1 Download e Edição das Estruturas Proteicas

Para a realização dos testes de interação e dinâmica proteína-proteína foram usadas estruturas dos receptores Fas, TNFR1 e TNFR2, seus ligantes de referência (FasL e TNF- α) e a gp120 viral (aqui considerada como ligante teste) armazenadas no banco de dados *Protein Databank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Os PDB ID das estruturas foram: TNF- α : 1TNF; TNFR1: 1EXT; TNFR2: 3ALQ; Fas: 3THM; FasL: 4MSV; e gp120: 4RZ8.

Antes do início das simulações, as estruturas foram editadas usando o software Chimera v. 1.13.1 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (remoção de água e outras moléculas). Os passos seguintes foram constituídos por trimerização da estrutura monomérica (TNFR1 e Fas) e minimização da energia utilizando o mesmo programa de edição.

2.3.2 Docking Molecular

As dockings moleculares foram realizadas pelo programa ClusPro server (<https://cluspro.bu.edu/>) assumindo o coeficiente balanceado e escolhendo o modelo com menor score de cluster. As interações foram realizadas entre os seguintes grupos de proteínas: TNFR1 versus TNF- α , TNFR1 versus gp120, TNFR2 versus TNF- α , TNFR2 versus gp120, Fas versus FasL e Fas versus gp120.

2.3.3 Dinâmica Molecular (DM)

A dinâmica molecular foi realizada com o software GROMACS (versão 2016.2) para determinar a estabilidade do complexo de interação. O campo de força de simulação usado para todas as simulações foi o GROMOS/53A6. As estruturas tridimensionais foram solvatadas em uma caixa cúbica com moléculas de água SPC/E, e neutralizadas pela adição de íons Sódio (Na⁺) e Cloro (Cl⁻). O método de descida para a minimização de energia do sistema foi usado com 50.000 passos.

O equilíbrio do sistema foi feito em duas fases: 1) equilíbrio NVT (número de partículas constante, volume e temperatura), com temperatura constante (310 Kelvin (K)) por 10 nanossegundos (ns); 2) um equilíbrio NPT (número de partículas constante, pressão e temperatura) com pressão constante de 1bar e temperatura constante de 310K, também por 10 ns. Finalmente, após minimizar a energia e equilibrar o sistema, a fase de produção foi realizada em 310K.

As ligações covalentes foram restringidas usando o algoritmo LINCS (Linear Constraint Solver) enquanto as interações eletrostáticas foram avaliadas através do método PME (Particle Mesh Ewald). As trajetórias do DM foram registradas a cada 10 picossegundos (ps) e o tempo de produção foi de 100 ns.

3 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa são apresentados em forma de artigos.

3.1 ARTIGO 1 - POLYMORPHISMS ON TNF-A/TNFR1 PATHWAY GENES IN IMMUNOLOGICAL RECOVERY OF HIV-1-INFECTED INDIVIDUALS ON ANTIRETROVIRAL THERAPY

Recife, February 04, 2019.

Dear Editor,

Please find attached our manuscript entitled “**Polymorphisms on TNF- α /TNFR1 pathway genes in immunological recovery of HIV-1-infected individuals on Antiretroviral Therapy**” that we would like to submit to **Human Immunology** as an Research paper.

All the authors confirm that:

- The "Instructions to Authors" have been read, and the manuscript complies with those instructions.
- They have seen and agreed to the submitted version of the paper, and all who have been acknowledged as contributors have agreed to their inclusion.
- The material is original and it has been neither published elsewhere nor submitted for publication simultaneously.
- If accepted, the paper will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without written consent of the copyright holder.
- None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

Best Regards,

Msc Neyla Maria Pereira Alves

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA)
Federal University of Pernambuco (UFPE)
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-901, Recife, Pernambuco, Brazil
Telephone: +55 81 21268485; E-mail: neyla_pa@outlook.com

Polymorphisms on TNF- α /TNFR1 pathway genes in immunological recovery of HIV-1-infected individuals on Antiretroviral Therapy

Neyla Maria Pereira Alves^{a**}, Maria Leonilda Gondim Silva^b, Almerinda Agrelli^a, Antonio Victor Campos Coelho^c, Luiz Cláudio Arraes^d, Sergio Crovella^{a,e}, Ronaldo Celerino da Silva^a, Lucas André Cavalcanti Brandão^{a,b}

^aLaboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bDepartment of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^cDepartment of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^dInstitute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira, Recife, Pernambuco, Brazil.

^eDepartment of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

****Corresponding Author:**

^aLaboratory of Immunopathology Keizo Asami – Federal University of Pernambuco
Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife, Pernambuco, Brazil. Phone/Fax: +55 8121268484/8121268485. E-mail: neyla_pa@outlook.com

Abstract

Antiretroviral therapy (ART) is a hallmark of HIV-1 treatment, enabling the suppression of viral load to undetectable levels. Some individuals do not recover the CD4⁺ T cell count to normal levels, even when viral suppression occurs. SNPs in genes involved in apoptosis pathways may influence interindividual immune recovery during ART. We assessed the allelic and genotypic distribution of five SNPs (*TNFRSF1A*: rs1800692, rs767455; *TNFAIP3*: rs2270926; *NFKBIA*: rs8904; *TNF*: rs1800629) and their relationship with immune recovery in HIV-1-infected individuals under ART. 155 HIV-1 infected individuals (immunological success (102) and failure (53) groups) were genotyped using fluorogenic allelic specific probes. Individuals in immunological failure were mostly male (60.4%, $p=0.002$), with a higher median of age at treatment onset (34.8 years, $p=0.034$) and a higher time until virological suppression (6 months, $p=0.035$). In addition, ART containing AZT (ACA) was associated with immune success ($p=0.029$). The rs767455 (T/T genotype) was more frequent in immunological failure individuals ($p=0.022$) and both rs8904 (A/G genotype, $p=0.02$) and rs1800629 (G/A genotype, $p=0.024$) in immunological success individuals. Our findings suggested that female patients carrying the G/A genotype (rs1800629) in use of ACA are more prone to immune recovery ($p=0.002$; $p=0.007$; $p=0.023$, respectively).

Keywords: Death Pathway Genes; SNPs; HIV-1 Infection; Immune Response; ART.

1. Introduction

The antiretroviral therapy (ART) has changed the landscape of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) treatment, since it decreases the viral load to undetectable levels and enables the recovery of the immune system, reducing the morbidity/mortality of those living with the virus [1,2]. However, in some individuals the CD4⁺ T cell recovery to normal levels fails, even though the viral load is suppressed to undetectable levels through a good adherence to ART [3]. The molecular mechanisms that lead to this unexpected disconnection between virological suppression and the immune recovery are still on debate [3–5].

Direct viral cytopathogenicity, thymic insufficiency, persistent T cell activation, elevated levels of inflammation and apoptosis are important mechanisms that may be involved in this condition [6]. During HIV-1 infection, the apoptosis levels increase, and bystander cells (not infected by HIV-1) in lymph nodes are especially affected [7,8].

HIV-1 promotes modulation of cell death pathways components, inducing death receptors expression (tumor necrosis factor receptor 1 - TNFR1 and first apoptosis signal receptor - Fas) and death ligands release (Fas ligand - FasL and Tumor necrosis factor alpha - TNF- α) [9]. The continuous release of TNF- α could contribute to exacerbated immune activation leading to cell apoptosis [10]. Thus, high levels of serum TNF- α have been associated with loss of CD4⁺ T cells and consequently progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) phase [11].

We hypothesized that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in some apoptosis extrinsic pathway genes could modulate the common activation of NF- κ B and A20 molecules (a down regulator of NF- κ B complex) by TNF- α /TNFR1 binding, increasing cell death by apoptosis, and influencing immune recovery in HIV-1 infected individuals in virologic success (undetected viral load).

The rs1800692 belongs to a chromosomal segment that contains a haplotype block where rs767455 is present. Although localized in intron 4, it forms a haplotype with rs767455, related to the severity of cystic fibrosis, and to the greater expression of exon 2 skipping in HEK293T cells, besides presenting a strong association with fever developed by patients with TRAPS (12)]. The rs8904, in the *NF- κ B inhibitor alpha* gene, and rs1800629, in TNF gene, showed, for example, increased frequency in female patients with knee osteoarthritis and association with increased levels of hyaluronan (marker of synovial inflammation) (13)], and significative association with advanced cervical tumor stage (14)], respectively. The A20 molecule is an important regulator of inflammation. Simanski et al (15)] cites A20 deregulation related to the appearance of type 1 diabetes, systemic lupus erythematosus (SLE), inflammatory bowel disease, ankylosing arthritis, Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis.

Therefore, these SNPs in *TNF* receptor superfamily member 1A (*TNFRSF1A*) (rs1800692 and rs767455), *TNF* alpha induced protein 3 (*TNFAIP3*) (rs2270926), *NF- κ B inhibitor alpha* (*NFKBIA*) (rs8904) and *TNF* (rs1800629) were selected to investigate their distribution and relationship to immune recovery in HIV-1-infected individuals in virologic success.

2. Materials and Methods

2.1 Population Study

One hundred and fifty-five HIV-1-infected individuals (HIV-1+) from Recife metropolitan region and/or minor towns of Pernambuco State (Brazil) were recruited in the period of 2013 to 2015, at Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira (IMIP). As Recife populations result of genetic admixture processes involving European (59%), African (23%) and Amerindian (18%) contributions [16], the self-reported skin color was include in the study.

Individuals aged 18 to 50 years were recruited according to the following criteria: regular ART treatment (uninterrupted for at least one year), undetectable viral load (<50 copies / mL) for at least one year (virological success) [17], and presence of clinical data in medical records. The enrolled individuals were classified based on immunologic recovery according to Li *et al.* (18)] as following: immunological success (recovery of CD4⁺ T $\geq$ 200 cells compared to the baseline [CD4⁺ T cells count prior to treatment initiation]) and immunological failure (recovery of CD4⁺ T <200 cells in comparison to baseline).

The control of ART adherence was performed both through access to the national health database SICLOM (Sistema de Controle Logístico de Medicamentos) designated to the registration of ART drug prescriptions, and visits with the physicians, every two months on average for clinical follow-up and medication replenishment, according to the ART regimen belonging to each patient. Whole blood samples were provided every three to four months for investigation of plasma viral load levels, quantification of T cells and total blood cells, biochemical panel, serology of comorbidities by hepatitis B and C virus, toxoplasmosis, syphilis, and/or other tests if necessary. These data were assessed on CERPE, a Brazilian diagnostic laboratory database.

The study was approved by Human Research Ethics Committee from IMIP-PE (registration nº 3629-13). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. The genomic DNAs were obtained in full accordance with signed informed consent forms.

2.2 SNPs selection and genotyping

The variants choice was made based on a minor allele frequency (MAF) major than 0.05 in Caucasian and Yoruba populations (reference ancestral populations of Brazil), impact functional of variant and previous associations with other pathologies,

using the 1000 genomes database, PolyPhen-2 (to predict the possible effects on the structure and function of SNPs) and literature reports (12–14,19)]. The selected SNPs were rs1800692 A>G (intron 4 of *TNFRSF1A*), rs767455 C>T (exon 1 of *TNFRSF1A*), rs2270926 G>T (exon 2 *TNFAIP3*), rs8904 A>G (3'UTR of *NFKBIA*) and rs1800629 A>G (promoter region of *TNF*) (Table 1).

Genomic DNA was obtained from peripheral whole blood using Mini Salting out protocol (20)] and genotyping by allele specific fluorogenic probes (TaqMan[®] assays) on a real time PCR platform (ABI 7500 SDS System), following the manufacturer's instructions.

2.3 Statistical Analysis

Allelic and genotypic frequencies were estimated by direct counting. The Hardy-Weinberg Equilibrium adherence and possible associations were verified through Chi-Square Test (X^2) and Fisher's Exact Test, respectively. All tests were two-tailed with a significance level of $\alpha=0.05$. Linkage disequilibrium (LD) and haplotypic frequencies were evaluated using Haploview version 4.2 (21)]. Allelic, genotypic and haplotypic frequencies were compared across study groups using Fisher Exact Test.

Univariate statistical analysis and logistic regression were performed. Chi-Square test (X^2) was used for comparisons using categorical variables, while Mann-Whitney test was performed for comparisons involving quantitative variables.

Additionally, we investigated if some genotypes of apoptosis gene were associated with the time until immunological recovery through survival analysis modeling. We used log-rank tests for assessing if there were significant differences in time until immunologic recovery according to genotypes. Next, we included genotypes along clinical variables in a multivariate Cox proportional hazards model, to control for possible confounding.

All statistical analyses were performed with the R software version 2.11.1 (22)].

3. Results

We enrolled 155 HIV-1 individuals for the study. After one year of follow up, 102 patients showed immunological success and 53 immunological failures. The clinic-epidemiological characterization of groups is displayed in Table 2.

We did not find significant differences between the two groups in relation to self-reported skin color, CD4+T cells count pre-treatment, ART regimens with protease inhibitors, syphilis and hepatitis B serologies ($p\text{-value}>0.05$). Univariate analysis revealed statistical differences regarding the male sex ($p=0.002$), age of treatment onset ($p=0.034$), ART regimens containing AZT ($p=0.029$) and time until virological suppression ($p=0.035$) (Table 2). The male sex and the time until immunological success/failure were considered risks factors for immunological failure. Brown skin color was more frequent in immunological failure individuals group, but the $p\text{-value}$ was not significative (52.8%; $p=0.120$) (Table 2).

Allelic and genotypic frequencies of SNPs in apoptotic pathway genes (*TNFRSF1A*, *TNFAIP3*, *NFKBIA*, *TNF*) and their genetics association are showed in Table 3. Significant differences were observed for both rs767455 (immunological failure individuals), rs8904 (immunological failure and success individuals) and rs1800629 (immunological success individuals) SNPs. Genotypes distributions were not in Hardy-Weinberg equilibrium in both the studied groups.

For rs767455 SNP in *TNFR1SF1A*, the T allele and T/T genotype were more frequent in immunological failure individuals than in immunological success individuals (49.1% versus 32.3%, OR=2.01, 95%CI=1.20-3.37, $p=0.006$; 30.8% versus 16.2%, OR=2.96, 95% CI=1.13-7.95, $p=0.022$, respectively). For rs8904 SNP in *NFKBIA*, the A

allele was significantly more frequent in immune failure (65.4% versus 47.1%, OR=2.12; 95%CI=1.27-3.58, $p=0.002$) while the A/G genotype was more frequent in immunological success than immunological failure individuals (43.1% versus 26.9%; OR=0.38, 95%CI=0.16-0.89, $p=0.02$). Similarly, the G/A genotype of rs1800629 SNP in *TNF* was significantly more frequent in immunological success individuals than in immunological failure individuals (31.5% versus 15.4%; OR=0.35, 95% CI=0.12-0.92; $p=0.024$).

The mean baseline T CD4+ cells count (pre-treatment) showed no discrepancy between the success (272.5 [126-390]) and immunological failure groups (279 [130-399]). Univariate survival analysis showed that individuals that started treatment with T CD4+ cells count <200 cells/mm³ took a longer time to immunological recovery (median time=27 months, 95%CI=22-48) when compared with those who had T CD4+ cells count $\geq$ 200 cells/mm³ (median time=23 months, 95%CI=20-35; log-rank test $X^2=7$, d.f.=2, $p=0.029$). A similar trend was not observed when we increased the cutoff to $\geq$ 350 cells/mm³ cells count of T CD4+ (median time=24 months, 95%CI=16-upper bound not calculated; log-rank test $X^2=6.7$, d.f.=2, $p=0.352$).

The linkage disequilibrium (LD) analysis of the two SNPs at *TNFRSF1A*, revealed a low LD ($D' < 0.2$). However, individuals carrying both alleles T-T, rs1800692-rs767455, were more frequent in patients at immunological failure (36.7% versus 22.4%; OR=2.46, 95%CI=1.23-4.99, $p=0.006$) (Table 4).

Following, the multivariate logistic regression model revealed significant association of immunological failure with male sex. Significant associations were also observed of immunological success with rs1800629 G/A genotype and antiretroviral therapy containing AZT (Table 5).

Discussion

Immunological failure is the suboptimal recovery of CD4⁺ T lymphocytes by HIV-1 individuals during the ART even in HIV-1 suppression (23,24)]. This phenomenon is multifactorial, being attributed mainly to a chronic immune activation that results in profound depletion of CD4⁺ T cells [7,25]. In addition, it is well known that cell death is implicated on CD4⁺ depletion [26,27]. Thus, we decided to test if 5 SNPs in 4 genes (*TNFRSF1A*, *TNFAIP3*, *NFKBIA* and *TNF*) on apoptosis extrinsic pathway, but also involved in inflammation events, and some clinical variable could be involved in the immunological ART response in patients with HIV-1.

Frist, we observed 3 variants associated with a higher risk of immunological failure after one year of treatment (rs8904 at *NFKBIA*, rs767455 *TNFR1SF1A* and rs1800629 at *TNF*; table 3). McDonald et al. [28] mentioned the rs8904 could promote a functional impairment of NFKB1, releasing the NF- κ B to promotor inflammatory transcription. Moreover, the rs8904 variant was related to increased inflammatory markers such as hyaluronic acid in patients with osteoarthritis [13]. Our results indicate that individuals carrying the A/G genotype are more than 2 times chances to recovery CD4⁺ T cells during the ART. Somehow these patients carrying the A allele can present elevated levels of NFKBIA active could increase the transcription levels of NF- κ B and consequentially triggers immune cellular activation to produce inflammation. This inflammation scenario is able to exhaust the immune system, impairing immune recovery [9,29]. However, heterozygosis in this individuals group was an important factor for immunological success.

Self-reported skin color was not associated with immunologic insufficiency, although the brown color was more frequent in the individuals belonging to this group. The population of the northeast region has higher ancestral contributions of Africans and Amerindians [30] and this miscegenation makes impossible a reliable comparison between

the groups. However, it is important to note that the African population has a high immunological activation condition, with increased TNF- α plasma levels in both HIV-infected and uninfected individuals [31] and amerindian population in Mexico and Central America present HLA-HIV allelic associations both protection and risk to HIV disease progression [32].

Our result showed an association between immunological failure and the presence of rs1800629 at TNF- α polymorphism in our sample group, making us ratify our hypothesis about the possible persistent inflammatory condition with immunological recovery in ART. The -308A allele (rs1800629) present in TNF- α promotor increased expression of this gene [14]. Heterozygosis -308G/A patients are more inclined to recovery their immune system during ART, probably by the positive equilibrium of TNF levels. In pathological conditions, the precursor of TNF- α , present in lymphocyte, macrophages and other cells, is cleaved into two functional forms that can bind to receptors 1 and 2 of TNF: plasma membrane-associated TNF and soluble TNF. Despite of the pleiotropism of these forms, membrane-associated TNF binds preferentially to TNFR2 while soluble TNF binds more specifically to TNFR1 [9]. Moreover, we also hypothesis that an increased levels of TNF- α could bind alternatively to TNFR2, due to decrease or suppression TNFR1 expression due to the T-rs1800692 and A-rs767455 haplotypes, and to active a cell death pathway or a similar proinflammatory response being able to contribute to the immune suppression of the individuals, like Herbein et al. [29] suggested.

The T-rs1800692 and T-rs767455 haplotypes of *TNFR1SF1A* induce the skipping of peptide signal and exon 1 [12], so, protein could not be translocated to the plasma membrane and decrease or suppress the expression of TNFR1 on the surface of CD4⁺ T cells. Moreover, this haplotype is involved to increase the severity of cystic fibrosis and fever in individuals with TNFR-associated periodic syndrome (TRAPS) [12]. Despite

that, in our population study both SNPs were not in LD, however, patients carrying the T-T haplotypes for rs1800692-rs767455, respectively, are at risk to a weak immunological recovery during the ART (Table 4). However, these data should be observed with caution because they are not in Hardy-Weinberg equilibrium.

We observed a significant relationship among pre-treatment CD4⁺ T lymphocytes counts <200 cells/mm³ and delayed time to immunologic recovery, corroborating, in part, the results of Hunt et al [33] and Batista et al [34] regarding immunological recovery during ART considering the pre-treatment CD4⁺ T lymphocyte count. We believe that individuals with lower CD4⁺ T counts before initiation of therapy are more susceptible to immune failure [34].

Therapeutic guidelines for HIV prophylaxis and follow-up in Brazil changes over the years with the aim of broadening the intervention and preventing new infections [35]. Currently, referral services for HIV treatment in Pernambuco use, based on Brazilian guidelines, TDF+3TC+DTG (Tenofovir+Lamivudine+Dulotegravir) as the main ART scheme, and as the first alternative scheme the AZT+3TC+DTG (Zidovudine+Lamivudine+Dulotegravir). In this sense, since our primary aim was not to evaluate ART regimens in relation to immunological failure, we included only the main and alternative regimens cited in the univariate analysis and multivariate logistic regression model. About that, our results showed association among regime containing zidovudine (AZT) and the faster immunological recovery, corroborating the data of Batista et al [34]. Individuals who used therapy containing AZT showed significant improvements in a less time than others individuals who used other therapeutic regimens. The AZT can increase individual's survival, reducing the incidence of opportunistic infections, resultant of immunological failure [34], in individuals with advanced HIV-1 infection, and delay aids progression in asymptomatic individuals [36].

Our findings also showed relationship among male sex and immunological failure, possibly due mechanisms of immune modulation by steroid hormones, such as estrogen [37]. The estrogen is capable of interferer in apoptotic process of some cells, promoting a pro-inflammatory effect (neutrophils concentration) and delay TNF-induced apoptosis (monoblast cells) [37]. Studies as Al-Tarrah et al [38], examined the influence of sex hormones on humoral and cellular immune responses of men and women under trauma. They found increased levels of IL-6 and TNF- α in male sex. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects may be influenced by testosterone and progesterone, increased IL-10 and TNF- α synthesis, reduced Natural Killer cell activity, inhibit NF- κ B activation and induce the activation of pro-apoptotic mechanisms. The hormonal effects also may be reduced with age of individuals [38].

Following, it was performed a logistic regression to include all variables with $p < 0.1$. We found that the sex, the use of ART containing AZT and the -308 G/A genotype remained associated (table 5). We believe that HIV-1 individuals with reduced levels of testosterone, possibly, undergo changes in TNF- α synthesis, NF- κ B transcription and macrophages activation, which are permissive to HIV-1 infection. This fact can induce a continuous immune system activation, signaling pathways modulation and the host's own apoptotic mechanisms and immunological failure of HIV-1 ART [26,29]. Although little is known about ART effects on sexual diversity in viral suppression and immune recovery, Castilho et al [39] suggest a relationship among the reduced risk of early/late death after ART in women on comparison to men, corroborating our study, where was verified an increased risk of immunological failure in men.

Limitations generated by factors such as lack of data available in medical records and small number of samples have hampered the achievement of some primary outcomes. Nonetheless, the data demonstrated may contribute to the understanding of inflammatory

mechanisms and clinical-epidemiological variables that influence the immunological recovery of HIV-1-infected patients.

4. Conclusion

Our results agree with previous studies on the slower immune recovery in ART subjects is associated with numerical levels of suboptimal CD4⁺ T lymphocytes prior to initiation of therapy involving other populations. Age and sex are possible risk factors for immune failure.

Understanding the mechanisms related to immune dysregulation associated with HIV-1 is essential for the development of possible therapeutic interventions. Although we found associations between the SNPs studied of the molecules involved in the apoptotic and inflammatory pathway further studies with larger numbers of molecules and individuals need to be performed to uncover the role of SNPs in these genes in the HIV-1 therapy.

Acknowledgments

We thank all patients, controls and health centers (IMIP) involved in this study. This work was funding by CAPES, CNPq and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (IBPG-0454-2.11/14, BCT-0081-2.02/17).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

References

- [1]. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(6):493–505.
- [2]. Knobel H, Guelar a, Carmona a, Espona M, González a, López-Colomés JL, et al. Virologic outcome and predictors of virologic failure of highly active antiretroviral therapy containing protease inhibitors. *AIDS Patient Care STDS*. 2001;15(4):193–9.
- [3]. Okoye AA, Picker LJ. CD4+ T cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev*. 2013;254(1):54–64.
- [4]. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1943–54.
- [5]. Nunnari G, Fagone P, Condorelli F, Nicoletti F, Malaguarnera L, Di Rosa M. CD4+ T-cell gene expression of healthy donors, HIV-1 and elite controllers: Immunological chaos. *Cytokine* [Internet]. 2016;83:127–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.04.007>
- [6]. Luo Z, Zhou Z, Ogunrinde E, Zhang T, Li Z, Martin L, et al. The effect of plasma auto-IgGs on CD4 + T cell apoptosis and recovery in HIV-infected patients under antiretroviral therapy. 2017;102(December):1–7.
- [7]. Holm GH, Gabuzda D. Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol*. 2005;79(10):6299–311.
- [8]. Herbeuval J, Boasso A, Grivel J-C, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1–infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood*. 2005;105(6):2458–65.
- [9]. Pasquereau S, Kumar A, Herbein G. Targeting TNF and TNF receptor pathway in HIV-1 infection: From immune activation to viral reservoirs. Vol. 9, *Viruses*. 2017. p. 1–17.
- [10]. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF-κB pathway. *FEBS J*. 2011;278(6):862–76.
- [11]. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev*

- Pathol [Internet]. 2011;6:223–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034222> <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-pathol-011110-130254>
- [12]. Rittore C, Sanchez E, Soler S, Barat-Houari M, Albers M, Obici L, et al. Identification of a new exon 2-skipped TNFR1 transcript: regulation by three functional polymorphisms of the TNFR-associated periodic syndrome (TRAPS) gene. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014;73(1):290–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23505244>
- [13]. Hulin-Curtis SL, Sharif M, Bidwell JL, Perry MJ. Evaluation of NFKB1A variants in patients with knee osteoarthritis. *Int J Immunogenet*. 2013;272–9.
- [14]. Zidi S, Stayoussef M, Zouidi F, Benali S, Gazouani E, Mezlini A, et al. Tumor Necrosis Factor Alpha (–238 / –308) and TNFR2-VNTR (–322) Polymorphisms as Genetic Biomarkers of Susceptibility to Develop Cervical Cancer Among Tunisians. *Pathol Oncol Res*. 2015;21(2):339–45.
- [15]. Simanski M, Erkens A, Rademacher F, Harder J. Staphylococcus epidermidis-induced Interleukin-1 Beta and Human Beta-defensin-2 Expression in Human Keratinocytes is Regulated by the Host Molecule A20 (TNFAIP3). *Acta Derm Venereol* [Internet]. 2018;0. Available from: <http://www.medicaljournals.se/acta/content/abstract/10.2340/00015555-3073>
- [16]. Coelho A, Moura R, Cavalcanti C, Guimaraes R, Sandrin-Garcia P, Crovella S, et al. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res*. 2015;14(1):2876–84.
- [17]. Coelho AVC, Silva SPS, de Alencar LC a, Stocco G, Crovella S, Brandão L a C, et al. ABCB1 and ABCC1 variants associated with virological failure of first-line protease inhibitors antiretroviral regimens in Northeast Brazil patients. *J Clin Pharmacol*. 2013;53(12):1286–93.
- [18]. Li T, Wu N, Dai Y, Qiu Z, Han Y, Xie J, et al. Reduced thymic output is a major mechanism of immune reconstitution failure in HIV-infected patients after long-term antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2011;53(9):944–51.
- [19]. Xu F, Zhou G, Han S, Yuan W, Chen S, Fu Z, et al. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. *PLoS One*. 2014;9(7):e101138.

- [20]. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
- [21]. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21:263–5.
- [22]. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
- [23]. Le Moing V, Thiebaut R, Chene G, Sobel A, Massip P, Collin F, et al. Long-term evolution of CD4 count in patients with a plasma HIV RNA persistently <500 copies/mL during treatment with antiretroviral drugs. *HIV Med.* 2007;8(3):156–63.
- [24]. Dronda F, Moreno S, Moreno A, Casado JL, Pérez-Elías MJ, Antela A. Long-term outcomes among antiretroviral-naïve human immunodeficiency virus- infected patients with small increases in CD4+ cell counts after successful virologic suppression. *Clin Infect Dis.* 2002 Oct;35(8):1005–9.
- [25]. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749–59.
- [26]. Mbita Z, Hull R, Dlamini Z. Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)- mediated apoptosis: new therapeutic targets. *Viruses.* 2014;6(8):3181–227.
- [27]. Pitrak DL, Novak RM, Estes R, Tschampa J, Abaya CD, Martinson J, et al. Apoptosis Pathways in HIV-1-Infected Patients Before and After Highly Active Antiretroviral Therapy: Relevance to Immune Recovery. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014;30(00):1–9.
- [28]. McDonald DR, Mooster JL, Reddy M, Bawle E, Secord E, Geha RS. Heterozygous N-terminal deletion of IκBα results in functional nuclear factor κB haploinsufficiency, ectodermal dysplasia, and immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(4):900–7.

- [29]. Herbein G, Gras G, Khan K, Abbas W. Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology* [Internet]. 2010;7(1):34. Available from: <http://www.retrovirology.com/content/7/1/34>
- [30]. Rodrigues de Moura R, Coelho AVC, de Queiroz Balbino V, Crovella S, Brandão LAC. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol*. 2015;27(5):674–80.
- [31]. Stephen D. Lawn, Robin J. Shattock, Joseph W. Acheampong, Renu B. Lal, Thomas M. Folks GEG and STB. Sustained plasma TNF- α and HIV-1 load despite resolution of their parameters of immune activation during treatment of tuberculosis in Africans. 1999. p. 2231–7.
- [32]. Valenzuela-Ponce H, Alva-Hernández S, Garrido-Rodríguez D, Soto-Nava M, García-Téllez T, Escamilla-Gómez T, et al. Novel HLA class I associations with HIV-1 control in a unique genetically admixed population. *Sci Rep*. 2018;8(1):1DUMMY.
- [33]. Hunt PW, Deeks SG, Rodriguez B, Valdez H, Shade SB, Abrams DI, et al. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. *Aids*. 2003;17(13):1907–15.
- [34]. Batista G, Buvé A, Ngom Gueye NF, Manga NM, Diop MN, Ndiaye K, et al. Initial suboptimal CD4 reconstitution with antiretroviral therapy despite full viral suppression in a cohort of HIV-infected patients in Senegal. *Med Mal Infect*. 2015;45(6):199–206.
- [35]. Ministério da Saúde. *Pep 2018*. J Geophys Res. 2018.
- [36]. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH et al. A Trial Comparing Nucleoside Monotherapy with Combination Therapy in HIV-Infected Adults with CD4 Cell Counts from 200 to 500 per Cubic Millimeter. *N Engl J Med*. 1996;335:1081–90.
- [37]. Molloy EJ, O'Neill AJ, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW, et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: The role of estradiol and progesterone. *Blood*. 2003;102(7):2653–9.

- [38]. Al-Tarrah K, Moiemmen N, Lord J. The influence of sex steroid hormones on the response to trauma and burn injury. *Burn Trauma* [Internet]. 2017;5(1):29. Available from: <http://burntrauma.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41038-017-0093-9>
- [39]. Castilho JL, Melekhin V V., Sterling TR. Sex Differences in HIV Outcomes in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era: A Systematic Review. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2014;30(5):446–56. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/aid.2013.0208>

Table 1. Characterization of SNPs selected for the genotyping studies.

Gene	SNPs	Chr	V (WT/VA)	GR	VT	MAF	Function
<i>TNFRSF1A</i>	rs1800692	12	C/T	Intron 4	Missense	0.307	Haplotypes A-T associated with inflammatory diseases. and G-G-C and T-A-T to the severity of TRAPS* and the exon 2 skipping ¹ .
<i>TNFRSF1A</i>	rs767455	12	C/T	Exon 1	Synonym	0.485	
<i>TNFAIP3</i>	rs2270926	6	T/G	Exon 2	Missense	0.124	Benign effect on Polyphen-2.
<i>NFKBIA</i>	rs8904	14	G/A	3'LTR	Regulatory	0.424	Increased level of hyaluronic acid as an inflammatory marker ² .
<i>TNF</i>	rs1800629	6	G/A	Promotor	Regulatory	0.095	Increased of TNF- α transcription and production ³ .

Chr = Chromosome; V = variation; WT = wild type; VA = variant; GR = gene region; VT = variation type; MAF = minimal allele frequency; *TNFR-Associated Periodic Syndrome; ¹XU et al., 2014; RITTORE et al., 2014. ²HULIN-CURTIS et al., 2013. ³ZIDI et al., 2014.

Table 2. Clinical-epidemiological variables of HIV-1 infected individuals involved in the study.

Clinical-epidemiological Variables	Immunological		Univariate analysis
	Success (n=102)	Failure (n=53)	
Sex. n (%)			
Female	68 (66.7)	21 (39.6)	$\chi^2=9.356$. df=1. p-value=0.002*
Male	34	32 (60.4)	
Skin color. n (%)			
White	21 (20.6)	16 (30.2)	$\chi^2=4.239$. df=2. p-value=0.120
Brown	49 (48.0)	28 (52.8)	
Black	32 (31.4)	9 (17.0)	
Age at treatment onset (years)			
Median (IQR)	31.1 (26.8-36.0)	34.8 (29.0-42.3)	W=2140. p-value=0.034*
Virological suppression (months)			
Median (IQR)	5 (2.5-8.0)	6 (5-11)	W=1829. p-value=0.035*
Pre-treatment T CD4+ cells count (cells/mm³)	272.5	279	W=2436. p-
Median (IQR)	(126-390)	(130-399)	value=0.654
Pre-treatment T CD4+ cells count (cells/mm³) (categories)			
Yes	32 (35.6)	15 (34.9)	$\chi^2=1.058e-30$. p-value=1.000
No	58 (64.4)	28 (65.1)	
≤350 cels/μl			
Yes	60 (66.7)	23 (53.5)	$\chi^2=1.629$. df=1. value=0.202
No	30 (33.3)	20 (46.5)	
ART containing AZT. n (%)			
Yes	85 (87.6)	35 (71.4)	$\chi^2=4.783$. df=1. p- value=0.029*
No	12 (12.4)	14 (28.6)	
ART containing protease inhibitors. n (%)			
Yes	42 (43.3)	18 (36.7)	$\chi^2=0.340$. df=1. p- value=0.560
No	55 (56.7)	31 (63.3)	
Serologies. n (%)			
Syphilis			
Positive	6 (12.0)	4 (17.4)	$\chi^2=0.065$. df=1. p-value=0.798
Negative	44 (88.0)	19 (82.6)	
Hepatitis B			
Immune by natural infection/vaccination	26 (59.1)	8 (53.3)	$\chi^2=0.007$. df=1. p-value=0.930
Susceptible	18 (40.9)	7 (46.7)	

IQR = Interquartile range; χ^2 = Chi-squared test; df = degrees of freedom; W = Mann-Whitney test; TARV = Antiretroviral therapy.

Table 3. Allelic and genotypes frequencies of SNPs *TNF- α /TNFR1* pathway genes in HIV-1- infected individuals from Pernambuco.

Gene/ SNPs	Immunological		Fisher's Exact Test		
	Success n(%)	Failure n(%)	OR	CI95%	p-value
<i>TNFRSF1A - rs1800692</i>					
C	106 (54.1)	65 (65.0)		Reference	
T	90 (45.9)	35 (35.0)	0.6	0.37-1.07	0.082
CC	28 (28.6)	22 (44.0)		Reference	
CT	50 (51.0)	21 (42.0)	0.5	0.23-1.22	0.1
TT	20 (20.4)	7 (14.0)	0.4	0.13-1.36	0.1
<i>TNFRSF1A – rs767455</i>					
C	134 (67.7)	53 (50.9)		Reference	
T	64 (32.3)	51 (49.1)	2.0	1.20-3.37	0.006*
CC	51 (51.5)	17 (32.7)		Reference	
CT	32 (32.3)	19 (36.5)	1.7	0.75-4.23	0.163
TT	16 (16.2)	16 (30.8)	2.9	1.13-7.95	0.022*
<i>TNFAIP3 – rs2230926</i>					
T	170 (83.3)	87 (85.3)		Reference	
G	34 (16.7)	15 (14.7)	0.8	0.41-1.73	0.742
TT	71 (69.6)	36 (70.6)		Reference	
GT	28 (27.4)	15 (29.4)	1.0	0.46-2.35	1.000
GG	3 (3.0)	0 (0.0)		nc	
GT+GG			0.9	0.42-2.10	1.000
<i>NFKBIA – rs8904</i>					
G	108 (52.9)	36 (34.6)		Reference	
A	96 (47.1)	68 (65.4)	2.1	1.27-3.58	0.002*
GG	32 (31.4)	27 (51.9)		Reference	
AG	44 (43.1)	14 (26.9)	0.3	0.16-0.89	0.020*
AA	26 (25.5)	11 (21.1)	0.5	0.19-1.29	0.137
<i>TNF – rs1800629</i>					
G	122 (60.1)	72 (69.2)		Reference	
A	81 (39.9)	32 (30.8)	0.6	0.39-1.13	0.134
GG	45 (44.3)	32 (61.5)		Reference	
GA	32 (31.5)	8 (15.4)	0.3	0.12-0.92	0.024*
AA	24 (23.6)	12 (23.1)	0.7	0.28-1.72	0.535

OR = odds ratio; CI95% = 95% confidence interval; nc = not calculated; n = size sample; *significant p-value

Table 4. Haplotype frequencies of SNPs *TNFRSF1A* (*rs1800692* and *rs767455*) in HIV-1- infected individuals from Pernambuco.

Haplotype	Immunological		Fisher's Exact Test		
	Success n(%)	Failure n(%)	OR	CI95%	p-value
C	68 (35.4)	23 (23.5)		Reference	
T	61 (31.8)	28 (28.6)	1	0.67-2.74	0.409
T	43 (22.4)	36 (36.7)	2	1.23-4.99	0.006*
C	20 (10.4)	11 (11.2)	1	0.60-4.20	0.353

OR = odds ratio; CI95% = 95% confidence interval; nc = no calculated; n= size sample; *significant p-value. Linkage disequilibrium, $D' < 0.2$.

Table 5. Logistic regression model of *TNF- α* genotypes influence over immunological success in HIV-1-infected individuals under antiretroviral therapy.

Variable	Coefficient	OR	95% CI	p-value
Model Intercept	-0.292		0.10-5.51	0.774
Male sex	1.313	3.72	1.61-8.56	0.002*
Age (in years)	0.006	1.01	0.96-1.06	0.799
Time until virological suppression		1.01	0.99-1.01	0.377
Antiretroviral therapy containing AZT	-1.186	0.30	0.11-0.85	0.023*
rs1800629 G/A genotype	-1.422	0.24	0.09-0.68	0.007*
rs1800629 A/A genotype	-0.223	0.80	0.29-2.21	0.667

OR=Odds ratio; 95%CI=95% confidence interval; *Significant p-value

3.2 ARTIGO 2 - CELL DEATH AND IMMUNE FAILURE CORRELATION IN GLOBAL HIV-INFECTED PATIENTS: A SYSTEMATIC REVIEW

Cell death and immune failure correlation in global HIV-infected patients: a systematic review

Neyla Maria Pereira Alves^{1*}, Almerinda Agrelli¹, Ronald Rodrigues de Moura^{2,3}, Livia Lima Alves Cintra³, Heverton Valentim Colaço da Silva³, Sergio Crovella², Ronaldo Celerino da Silva¹, Lucas André Cavalcanti Brandão^{1,3}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author:

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – Federal University of Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife, Pernambuco, Brazil. Phone/Fax: +55 8121268484 / 8121268485. E-mail: neyla_pa@outlook.com

Abstract

Purpose. About 16% of patients treated with antiretroviral therapy (ART) against human immunodeficiency virus (HIV-1) do not recovery their CD4+ cell count to a basal level. Several and divergent mechanisms for CD4+ cells destruction in HIV-1-infected patients are described, but the complete elucidation remains in debate.

Objective. For that reason, this systematic review is intended to evaluate mechanisms involved in HIV-1 pathogenesis that implicated in different cell type death as a justification for the existence of poor immunologic reconstitution of nonresponders patients in regular ART.

Methods. A literature search was performed using PubMed, BVS and SciELO databases. Search terms included HIV, HAART, immune reconstitution and types of cell death defined by Nomenclature Committee on Cell Death guidelines. The review was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (CRD42019118602).

Results. 29 articles were included. The main outcomes involved with CD4+ depletion and immune recovery were: the poor access to IL-7 due to collagen deposition, JAK3 downregulation and STAT5 upregulation; the immunosenescence and chronic immune activation triggered by PD-1 expression or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity mediation; dysfunctional T cells by defective IL-2 production; and inflammation by high levels of cytokine expression.

Conclusions. The low recovery ratio of CD4+ T cell in NR individuals is related to multiple immune alterations. Poor thymic function, lack of IL-7 access and programmed cell death protein 1 expression were the main causes of lymphocyte loss

Keywords. HIV infection; cell activation; cell death; antiretroviral therapy, poor immune reconstitution.

1. Introduction

Cell death, for years, was seen as the supposed cell life result. However, experimental evidence from decades indicates that cell death could apply to a clustering of genetically coordinated mechanisms which directs functions such as controlled elimination of irreversibly damaged and also potentially harmful cells (1).

Regulated cell death (RCD) is framed in dichotomous aspects that may involve intense and/or prolonged intra- or extracellular environmental perturbations that impair the adaptive stress-driven response and the recovery of cellular homeostasis. Others RCD begin independently of exogenous environmental, characterizing an physiological responses or tissue renewal of a complex programmed cell death (PCD) pathway (1).

In this sense, the basis of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) researches involves understanding about the prolonged disruption of lymphocyte function associated with the destruction of CD4⁺ T cells by Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) (2,3). Until today, it is known that both death of infected and uninfected cells (bystander cells) can occur through the excessive activation of T lymphocytes or the abortive infection of immune cells induced by incomplete reverse transcripts or others viral proteins (*e.g.*: Env, Tat, Nef, Vpr and Vpu). In fact, progressive loss of CD4⁺ T lymphocytes and host defense collapse by HIV-1 contributes to clinical progression to AIDS (2,4). This cell loss may involve several and different forms of cell death such as apoptosis, necrosis, pyroptosis or other (4). In addition, several other insights like high expression of inflammatory markers in plasma (5), poor lymphocytes response to IL-7 in vitro, age and coinfections (6) are involved in the immune failure and somehow implicated in cell death.

Since 1996, antiretroviral therapy (ART) was inserted in the HIV-1 treatment. The standard treatment is effective, guarantees the reduction of viral replication and, consequently, the patient's immune reconstitution (7). Despite the efficacy of ART, immune nonresponder (NR) HIV-1 infected individuals represent, on average, 16% of treated people (8) and are unable to reconstitute satisfactorily the CD4⁺ T lymphocytes levels after years of treatment. In

contrast, increased frequencies of CD4⁺ T cells circulating in the cell cycle of these patients are observed, however, *in vitro*, these cells do not complete the cell division, unlike that observed in immunological responders and healthy controls (6).

The major pathogenic mechanisms of cell destruction in HIV-1-infected patients remain divergent. Recent researches made by Garg and Joshi (9) show the phenomenon of apoptosis as the main pathway for CD4 T cell loss in HIV-1 pathogenesis. However, Doitsh and Greene (2) treat this line of reasoning as limited to elucidate the massive loss of CD4 T lymphocytes *in vivo*. They argue that the presence of incomplete DNA fragments released after inefficient reverse transcription in cells induces cell death by pyroptosis and maintains the chronicity of inflammation and the chronic immune activation.

The implicit mechanisms of discordant immunological reconstitution are contradictory and remain not completely understood. In this systematic review, the objective was to evaluate the cell death mechanisms involved in HIV-1 pathogenesis implicated in a poor immunologic reconstitution of global critical patients (children and adults nonresponders regardless of gender) in regular use of ART.

2. Methods

2.1. Review Protocol

A review protocol, including analysis and inclusion criteria was registered in PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews - <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>) platform under CRD42019118602 number.

2.2. Data searches and study screening

To obtain substantial literature, the electronic databases PubMed, Virtual Health Library (BVS) and SciELO were searched on 03 July 2018. The search strings are in Table 1. The inclusion criteria were:

- Article published in English or Portuguese;
- Article was an original report;
- Presence of the complete article available in the databases;
- Article published on or after January 2003;
- Article described cell death and HIV pathogenesis.

At least two authors selected the articles independently and individually, according to the inclusion criteria. Disagreements were resolved by a third investigator. Duplicated articles were excluded. The types of cell death included in the research strings were established based on Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) guidelines (1). We developed a selection folder of data based on Cochrane Consumers and Communication – data extraction template for included studies. The systematic review structure was performed based on PRISMA guidelines (Transparent Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analyses - <http://www.prisma-statement.org/>) (10).

2.3. Ethics Approval

No ethics approval was required because we performed a systematic review of published articles.

2.4. Studies Selection

The articles selection was based on the inclusion criteria, as shown in the flow chart (Figure 1).

3. Results and Discussion

In the review, we screened 290 articles and only 29 studies (8,11–38) met the inclusion criteria. Two additional articles were included in this review during the selection of full-texts bibliographies (7,10) (described in the Figure 1). The characteristics of the included articles are described in the Table 2. The studies involved 1783 participants among children and adults infected, in ART, responders or nonresponders (NR) to ART, co-infected or not, and healthy donors. A more specific counting of individuals groups was not performed because it was not well specified in eight studies.

The criteria for assessing CD4 recovery levels were also not well specified or were not fully available in all studies, not allowing to estimate statistically which mechanism was associated with the activation of a major pathway of cell death in individuals with immune failure recovery. Despite that, we were able to identify 5 mechanisms (or events) leading to a poor immunological reconstitution in HIV-1 nonresponders patients: 1- cell death by apoptosis (8,11,22,24,30,31,33–36,38,12,14–20), 2 - immunosenescence (27,32), 3 - cell activation (29,37), 4 - response to ART (23,25,26) and 5 - inflammation (21,28) (Figure 2). The summary of results is contained in Table 3.

In more details, the favorable mechanisms to poor immunological reconstitution of nonresponders patients in regular ART identified were: damage to the fibroblastic reticular cell (FRC) network and restrict access to interleukin-7 (11,13,31,38), shorter telomere length and dysregulated telomerase activity (22), down regulated CD27 expression (32), antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (33), polymorphisms in interleukins, death receptors and ligands (24,34), CMV and HCV co-infections (27,28,36), γ -chain cytokines modulation (36,37), increased reservoir (19,38), HIV-co-receptors tropism (12,19), HIV RNA levels (23), expression and signaling of cytokines and cell molecules in immune response (13,14,30,31,15,16,18,20,25,26,28,29). In this scenario, no other death mechanisms reported relationship with poor immune reconstitution such as necrosis or pyroptosis cell deaths. However, Doitsh and Greene (2) pointed two mechanisms to cell death in HIV-1-infected cells: 1) caspase 1 and 3 activity, high levels of IL-1 β and Interferon (IFN-) β suggesting that presence of caspase is needed to cytopathic response, and 2) inflammasomes activation, cleavage and secretion of IL-1 β by caspase 1, suggesting abortive HIV infection and maturation in CD4+ T cells. However, these mechanisms was not found in clinical investigation, thus, it was not included in this systematic review outcomes. Yet, mechanisms involving persistent T-cell activation and bystander apoptosis by X4 viruses and gp120 viral molecule should be considered. Continuous expression and/or secretion of HIV-1 proteins by persistently infected cells in patients on regular ART is able to culminate in this bystander apoptosis (12).

Nonetheless, it was possible to categorize and compile some relevant mechanisms involved in the immunological failure of HIV-1 infected individuals and treated according to World Health Organization (WHO) recommendations.

The details of outcomes found are exposed in the following topics.

3.1. Apoptosis

Under normal conditions, individuals present the fibroblastic reticular cell (FRC) network where IL-7 is available, allowing T cells to have access to survivorship factors. HIV-1 infection is associated to progressive decreases in FRC network and consequent poor access to IL-7 due to the deposition of collagen external to the FRC, resulting in an increase of apoptosis cell death. Moreover, cells treated with autologous IL-7 have 20 to 30% less chances to undergo apoptosis than naive T cells without stromal cells (11).

Reinforcing the Zeng results (11), Gaardbo et al (22) describes a negative correlation between IL-7 levels and CD4⁺ T cell counts, but differs as to the level of IL-7 available showing that although this cytokine is abundantly present the level of IL-7R is reduced in patients NR in relation to healthy controls.

Despite this, it is possible that survival of naive T cells is maintained due to the presence of other survival factors such as CCL19 even with IL-7 blockade, but the increase in naive T cell apoptosis is related to depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and that both depend on the decrease of FRC network (11). This mechanism is outlined in figure 3. Inflammation and activation of Transforming Growth Factor β (TGF β) are predicted to elicit a fibrosis in FCR result in CD4⁺ T cell depletion (31). IL-7 and first-phase naive and total CD4⁺ T cells regeneration in patients also was associated with low thymic score (15). Nunnari et al (16) demonstrated that IL-7 administration act synergistically with gp120 viral molecule increasing neuronal apoptosis, downregulating Jak3 and upregulating STAT5 in astrocytes. The impaired regulation of Jak3 influences negatively the phosphorylation and activation of STAT5, though the stimulation of STAT5 could occur by another route (Figure 4). However, higher levels of STAT5 could increase both lymphocyte enlargement and immune regulation by Treg cells (39). In addition, NR subjects present high levels of stromal IL-7 production in relation to the individuals responding to the treatment, justifying the reduction of CD4⁺ production and its low count (11).

The thymic function is normally assessed by three forms: T-cell receptor excision circles (TRECs - fragments of DNA excised in T-cell receptor production in the maturing T cell), recent thymic emigrants (RTEs), or naive CD4⁺ cell count (22). The Gaardbo et al study (22) showed that RTEs express CD31, a surface marker, and the count and levels both RTE and CD31 are lower in HIV-1 infection. Impaired thymic and bone marrow production also were reported as cause of low levels of TRECs in subjects that presented low CD4⁺ T cell response (34). ART administration is able to increase significantly the level of TREC in T CD4⁺ cells, but not in T CD8⁺ cells, and the decrease of apoptosis levels in circulating T lymphocyte of HIV-infected subjects was insignificant during follow up (17). Marchetti et al (38) showed that both NR and full responders are prone to have lower CD4 and CD8 level of TREC, but without statistical significance. Proliferation of immature thymocytes, measured by TREC in PBMC, was not related with infection by X4 or R5 viruses, however, T cell activation was shown to be high in NR that had both R5 and X4 viruses. This activation was not observed in good immunological responders (12).

Ratifying these results, increased levels of Ki67 (cell proliferation marker) were found in NR, showing that the peripheral proliferation of Ki67 characterizes a compensatory mechanism for poor thymopoiesis (22). Similar results were found by Marchetti et al (38) in NR patients reporting an increased levels of Ki67 and cell proliferation. However, the T cell activation and proliferation were linked to higher CD4⁺ T cell spontaneous apoptosis ($p < 0.05$) in relation to full responders. These outcomes shows that NR carry less naive T cell and more apoptotic cells like a parameter to activation and proliferation of T CD4-lymphopenia (38).

Another important view of Gaardbo et al (22) involves the action of the enzyme telomerase in telomer shortening. When HIV infections occur there is an increase in cellular production and consequently deregulation of telomerase activity happens as a compensatory mechanism. This chromosome instability could impair cell growth and induce both early and late apoptosis, especially in patients with CD4⁺ T cells counts < 500 cells/ μ l.

T CD4⁺ cells lost by apoptosis could be present during immune activation through several phenomena such as residual viral production (HIV RNA, gp120 and nef viral molecules induces immune activation by TLR7, CD4 receptor and coreceptor and lipid rafts, respectively), older age, high levels of CCR5, HCV and CMV co-infections, low level of Treg, genetic pre-disposition and others (12,34–36).

Programmed cell death protein 1 (PD-1) is a co-inhibitory receptor in immune cells which controls inflammation and also an important marker of chronic immune activation in individuals infected by viral pathogens that present failure in immune reconstitution (Figure 4) (40).

CD38 is a common marker of exacerbated immune activation in tumor cells, such as escape mechanism to the PD-1/PD-L1 block, (41) and insufficient immune reconstitution. Thus, Grabmeier-Pfistershammer et al (18) evaluated whether, in HIV-1 infection, CD38 exerts this role, but they did not observed upregulation of either CD38 or another T cell activation marker and concluded that PD-1 was the only marker of poor immune reconstitution and that this event occurs isolated not associated with activation of the immune system as a whole.

However, a recent research shows important predictor of CD4 + T-cell apoptosis observed in NR patients is antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). This mechanism was evaluated by Luo et al (33) who demonstrated that there is mediation of cytolysis and cellular apoptosis by anti-CD4 IgG through ADCC in NR patients, and that anti-CD4 IgG also stimulates an increased expression of CD4 and coexpression of CD38 and HLA-

DR inducing cellular activation in total and memory CD4⁺ T cells (12), respectively. Yet, NK cells from these patients showed significantly expression of CD107a in relation to responders and control groups confirming the cytotoxicity and activation of NK through anti-CD4 IgG. Regarding this theme, Gaardbo et al (22) reported that autoantibodies are present at low levels in healthy individuals, but with low affinity and no pathological activity unlike in HIV infection when elevated autoantibody levels are present early and lasted until the chronic phase. Even ART treatment, not all of this activation is reversed meaning that, under these conditions, ART may not be able to inhibit the pathogenicity of HIV

The occurrence of CD4 cell apoptosis in HIV patients co-infected with HCV is also described. Analysis of PARP and TUNEL apoptotic markers showed significant increased of cell death in co-infected patients than in HIV-positive individuals, indicating HCV/HIV-co-infection as a predisposing factor to programmed cell death by apoptosis (35). Others co-infections such as, CMV are also able to influence CD4⁺ T cell proliferation and apoptosis. Patterson, Jesser and Weinberg (36) analyzed the γ -chain receptor in HIV-infected and uninfected patients and found that the apoptosis level of PBMC was significantly higher than uninfected controls ($p < 0.0001$), and among IL-15, IL-2, IL-4 and IL-7 treated cultures IL-2 has less effect against apoptosis while IL-15 has the most potent effect. IL-4 and IL-7 do not exercised significantly change in apoptosis. But, no studies were found correlating the immunological responder, co-infection and cell death mechanism.

3.2. Immunosenescence

Different from RDC, cellular senescence involves an irreversible and progressive loss in proliferative capacity followed by specific features in cell morphology and biochemistry such as cellular enlargement, altered chromatin structure and increased lysosomal galactosidase beta 1 (GLB1) activity (1). Cellular senescence is described in some immune responses as seen in HIV-1 chronic infections (1) Moreover, ART administration could increment the chronicity level of inflammation in HIV-1 infected individuals and possibly related to immunosenescence (42).

Double-negative B cells (IgD-CD27⁻) population are present at low levels in healthy individuals, but their presence is significantly higher in peripheral blood in elderly individuals, patients with Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and HIV infection. IgD-CD27⁻ cells are unable to act presenting antigens, i.e., loss of expression of CD27, a member of the TNF receptor superfamily, prevents the spread of activation signals,

but little is known about the lack of CD27 in this cell population (43). Higher frequency found of IgD-CD27- B cells in HIV-infected children could mean both the late memory and/or functionally exhausted cells with down regulated expression of CD27 or premature immune senescence (32).

Immunosenescence was also investigated in HIV-infected individuals co-infected with CMV. In patients seronegative for CMV was found inverse correlation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells means in peripheral blood (higher mean of CD4⁺ T cells versus lower mean of CD8⁺ T cells counts) and higher CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio. In addition, there was a high percentage of CD8⁺ T cells expressing CD28 and a low percentage of CD8⁺ T cells expressing CD57 in individuals who were seronegative for CMV compared to the group with positive individuals for CMV co-infection, concluding that the evidence of immunosenescence phenotype was lower in CD8⁺ T cells from CMV-seronegative individuals group than in CMV-seropositive individuals group (27).

In agreement with these results, Gaardbo et al (22) show that the elevated expression of the PD-1 molecule in NR patients is a marker of cell depletion and senescence in view of its overregulation of T cells depletion due to chronic virus infection. Additionally, its expression is negatively related to the CD4⁺ T cell count.

3.3. Inflammation

According to the recent publication of Watanabe et al (44) showing the persistent levels of IFN- γ in HIV-infected patients on ART even after two follow-up measurements. The authors believe that results are linked to a possible association with endogenous anti-HIV response where IFN- γ is a factor related with poor CD4⁺ T cell count recovery, and discard inflammation occurrence.

Several pro- and anti-inflammatory cytokines are released in HIV-1 patients co-infected with tuberculosis that present immune reconstitution inflammatory syndrome (TB-IRIS). Patients belonging to this group are more prone to present lower levels of IL-13, IL-15 and IL-17A. After 24 hours of stimulation with *M. tuberculosis*, the TGF- β was the unique cytokine that has not upregulated. IL-5 was higher in unstimulated non-IRIS patients unlike IL-2, IL-15 and TNF that were higher in TB-IRIS patients. To stimulated patients, IL-1b, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ , GM-CSF and TNF were significantly abundant ($p_{\text{corr}} \leq 0.03$). Yet, higher supernatant cytokine concentrations were observed to IL-2, originated from lymphoid tissue, and IL-12p40, IL-1b, GM-CSF, TNF, IL-10, IL-6, and IL-8 ($p_{\text{corr}} \leq 0.04$), from myeloid

cells. For serum concentrations analysis, the TNF, IL-6, and IFN- γ ($p_{\text{corr}} \leq 0.02$) were significantly higher in TB-IRIS patients. After corticosteroid therapy, IL-6 and TNF concentrations declined, but not IFN- γ .

3.4. Others factors triggering T cell death

During HIV-1 infection the host immune response trigger cells activation from several ways and somehow involved in immune recovery in ART.

The pool of T cells, by homeostatic proliferation, is dependent on IL-7, IL-2 and IL-15 signals and self-MHC/peptide ligands. Their receptors share a common γ chain through Janus Kinase (Jak)-3, but IL-2R and IL-15R also share a common β chain through Jak-1. Therefore, dysfunctional T cells in HIV infections is result of defective IL-2 production and/or inability to make IL-2, exhausted phenotype (increased expression of PD-1 molecule), alteration of maturation and increased apoptosis (Figure 4). Assays also showed that γ chain deficiency was present in HIV-infected patients compared to controls (37).

The analysis of other cell activation markers showed that although CD4⁺ T cells naive presented a slight increase and in a slower way, the number of CD4⁺ expressing Fas (CD95⁺ CD4⁺) increased significantly ($p=0.01$). This condition was not observed in CD8⁺ T cells expressing Fas. Increased expression of CD28 and CD95 was significant between 12 and 48 weeks of ART administration. In addition, all patients showed an increase in TREC indicating an inclination to increase naive CD4 T and viral load decline, although there is no statistical power due to the small number of individuals analyzed (29).

The CD4⁺ T cells levels and HIV-1 RNA load at the baseline are important factors influencing immune recovery after ART. In general, patients with CD4⁺ T cells count lower than 200 cell/mm³ at the baseline, even treated with triple-drug therapy containing a protease inhibitor, have a higher risk of disease progression with weak immunologic response, favoring the occurrence of opportunistic diseases (23). Besides that, Zidovudine has been shown to induce apoptosis in NR individuals. Zidovudine could upregulated caspase-3, Fas and TNFR2 (8,20).

Moreover, NR patients using ART regimen containing three drugs: 2 NRTIs + a PI/NNRTI/II (corresponding to 89% of NR), did not recover CD4⁺ T cells levels even with suppressed viral load for an extended period. The therapy was able to only partially reduce the super activation of circulating CD4 and CD8 and in the gut. As for the Treg phenotype, the

expression of CTLA-4 and PD-1 was higher in the gut relative to the peripheral blood and the percentage of Treg expressing both CTLA-4 and PD-1 was higher in untreated patients than in the others patients' groups and controls. The frequency between circulating CTLA-4+ Treg and PD-1+ Treg was heterogeneous. While CTLA-4+ was higher in NR patients, PD-1+ showed no significant difference between NR, responders and controls (26).

However, in individuals under regular use of ART is observed a significant decrease in cellular activation (low sCD14) and in the HIV Gag-specific CD8+ T-cell response (IFN- γ or CD107 and TNF- α reducing) (25).

Other factors involving subgroups expression of NK cells were evaluated by Giuliani et al (21). The CD56^{bright} count and NK cells were increased in the NR patient group in relation to the responders ($12\pm3\%$ vs $3\pm2\%$, $p=0.0001$; 20 ± 4 vs 8 ± 1 cells/ μ l, $p=0.001$, respectively). This percentage of cell group and cell count showed an inverse relationship with pre-ART CD4+ T cell count. Além disso, in CD56^{bright}, high NKp46 and low CD25 expression is existent. The potencial degranulation of this group of cells showed an increase of approximately three times CD107a+ than untreated controls with K562 and K562/IL-12/IL-15. Finally, after stimulation with IL-2/IL-12, CD56^{bright} presented higher levels of IFN- γ + (3% - unstimulated cells - to 14% to responders patients).

4. Limitations

Our ability to analyze and establish a relationship between mechanism associated with a major pathway of cell death in individuals with immune failure was limited by both the poor level of details about the criteria for assessing CD4 T cell recovery and inconsistent specific or not fully available measures across the included studies.

5. Conclusions

Overall, in this review, the evidence of the criterion adopted for defining the immune failure is not robust enough to determine the key mechanism of cell death activation that characterizes the loss of T cells in the HIV pathogenesis. Only two case-control and one cross-sectional studies allowed substantial crossover of the required data. Hence, our findings on which type of cell death is responsible for impairing the complete immune reconstitution of a significant group of patients can not be applied.

The main results showed that cell death by apoptosis in non-ART responding HIV-1-infected individuals was activated by the extrinsic pathway. Although it was not possible to determine statistically the mechanism responsible for impaired immune recovery in NR patients in ART, it was possible to notice that lack of recovery of CD4⁺ T cells depends on multiple factors. Poor thymic function and lack of access to IL-7 were the main reported factors in association with lymphocyte loss CD4⁺ T by apoptosis as a consequence of impaired immune activation in HIV-1 infection. As a secondary but important result, we found the expression of Programmed cell death-1 (PD-1) molecule exerting an immunomodulatory role in cellular activation and immunosenescence. In addition, tuberculosis co-infection and IRIS are factors that contribute to increase inflammation condition via TNF, IL-6 and IFN, and the baseline T CD4⁺ count influence in apoptosis due to chromosome instability. Some studies suggested supplementary treatment with recombinant human IL-2.

References

1. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486–541.
2. Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost during HIV Infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;19(3):280–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.012>
3. S. Moretti, S. Marcellini, A. Boschini et al. Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors. *Clin Exp Immunol.* 2000;364–73.
4. Nardacci R, Perfettini JL, Grieco L, Thieffry D, Kroemer G, Piacentini M. Syncytial apoptosis signaling network induced by the HIV-1 envelope glycoprotein complex: An overview. *Cell Death Dis* [Internet]. 2015;6(8):e1846-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.204>
5. Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation

- and turnover of memory CD4 cells. *J Infect Dis.* 2011;204(8):1217–26.
6. Younes S, Rodriguez B, Michael M, Younes S, Talla A, Ribeiro SP, et al. Cycling CD4 + T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction Find the latest version : Cycling CD4 + T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. 2018;128(11):5083–94.
 7. Cossarizza A. Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes. *Curr Pharm Des [Internet]*. 2008;14(3):237–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220834>
 8. Benveniste O, Flahault A, Rollot F, Elbim C, Estaquier J, Pédrón B, et al. Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. *J Infect Dis.* 2005;191(10):1670–9.
 9. Garg H, Joshi A. Host and viral factors in HIV-mediated bystander apoptosis. *Viruses.* 2017;9(8):1–23.
 10. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *J Clin Epidemiol.* 2009;62(10):e1-34.
 11. Zeng M, Southern PJ, Reilly CS, Beilman GJ, Chipman JG, Schacker TW, et al. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naïve T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2012;8(1).
 12. Delobel P, Nugeyre M-T, Cazabat M, Sandres-Saune K, Pasquier C, Cuzin L, et al. Naive T-Cell Depletion Related to Infection by X4 Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Poor Immunological Responders to Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Virol [Internet]*. 2006;80(20):10229–36. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00965-06>
 13. Torti C, Cologni G, Uccelli MC, Quiros-Roldan E, Imberti L, Airo P, et al. Immune correlates of virological response in HIV-positive patients after highly active antiretroviral therapy (HAART). *Viral Immunol [Internet]*. 2004;17(2):279–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cit>

ation&list_uids=15279705

14. Wang X, Zhang Z, Zhang S, Fu J, Yao J, Jiao Y, et al. B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 2008;38(11):3226–36.
15. Kalayjian RC, Spritzler J, Pu M, Landay A, Pollard RB, Stocker V, et al. Distinct mechanisms of T cell reconstitution can be identified by estimating thymic volume in adult HIV-1 disease. *J Infect Dis* [Internet]. 2005;192(9):1577–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16206072>
16. Nunnari G, Xu Y, Acheampong EA, Fang J, Daniel R, Zhang C, et al. Exogenous IL-7 induces Fas-mediated human neuronal apoptosis: Potential effects during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Neurovirol*. 2005;11(4):319–28.
17. Aladdin H, Katzenstein T, Dreves AM, Ryder L, Gerstoft J, Skinhøj P, et al. T-cell receptor excisional circles, telomere length, proliferation and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus-infected individuals after 18 months of treatment induced viral suppression. *Scand J Immunol*. 2003;57(5):485–92.
18. Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P, Rieger A, Leitner J, Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56(2):118–24.
19. Almodovar S. The Complexity of HIV Persistence and Pathogenesis in the Lung Under Antiretroviral Therapy: Challenges Beyond AIDS. *Viral Immunol* [Internet]. 2014;27(5):186–99. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vim.2013.0130>
20. Wallace ZR, Sanderson S, Simon AK, Dorrell L. Exposure to zidovudine adversely affects mitochondrial turnover in primary T cells. *Antiviral Res* [Internet]. 2016;133:178–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.08.002>
21. Giuliani E, Vassena L, Di Cesare S, Malagnino V, Desimio MG, Andreoni M, et al. NK cells of HIV-1-infected patients with poor CD4+T-cell reconstitution despite suppressive HAART show reduced IFN- γ production and high frequency of autoreactive CD56bright cells. *Immunol Lett* [Internet]. 2017;190:185–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.08.014>

22. Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Incomplete immune recovery in HIV infection: Mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
23. Koletar SL, Williams PL, Wu J, McCutchan JA, Cohn SE, Murphy RL, et al. Long-Term Follow-Up of HIV-Infected Individuals Who Have Significant Increases in CD4+ Cell Counts during Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2004;39(10):1500–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546087> <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/424882>
24. Nasi M, Pinti M, Bugarini R, Troiano L, Lugli E, Bellodi C, et al. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and Fas ligand (CD178) influence the rise in CD4+ T cell count after antiretroviral therapy in drug-naïve HIV-positive patients. *Immunogenetics.* 2005;57(9):628–35.
25. Hayes TL, Asmuth DM, Critchfield JW, Knight TH, Mclaughlin E, Yotter T, et al. Impact of Highly Active Antiretroviral Therapy Initiation on CD4+ T-cell Repopulation in Duodenal and Rectal Mucosa. *AIDS.* 2013;27(March 2010):867–77.
26. Rueda CM, Velilla PA, Chougnet CA, Rugeles MT. Incomplete Normalization of Regulatory T-Cell Frequency in the Gut Mucosa of Colombian HIV-Infected Patients Receiving Long-Term Antiretroviral Treatment. *PLoS One.* 2013;8(8):1–9.
27. Barrett L, Stapleton SN, Fudge NJ, Grant MD. Immune resilience in HIV-infected individuals seronegative for cytomegalovirus. *Aids.* 2014;28(14):2045–9.
28. Tadokera R, Meintjes G, Skolimowska KH, Wilkinson KA, Matthews K, Seldon R, et al. Hypercytokinaemia accompanies HIV-tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome. *Eur Respir J.* 2011;37(5):1248–59.
29. Al-Harthi L, Voris J, Patterson BK, Becker S, Eron J, Smith KY, et al. Evaluation of the impact of highly active antiretroviral therapy on immune recovery in antiretroviral naive patients. *HIV Med.* 2004;5(1):55–65.
30. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, et al. Immune activation, apoptosis, and treg activity are associated with persistently reduced CD4+T-cell counts during antiretroviral therapy. *Aids.* 2010;24(13):1991–2000.

31. Eleanor M.P. Wilson and Irini Sereti. Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunol Rev.* 2014;254(1):343–54.
32. Singh R, Mukherjee A, Singla M, Vajpayee M, Negi N, Kabra SK, et al. Impact of HIV infection and highly active antiretroviral therapy (HAART) on B cell subpopulations in children. *J Med Virol.* 2018;90(7):1222–31.
33. Luo Z, Li Z, Martin L, Wan Z, Meissner EG, Espinosa E, et al. Pathological Role of Anti-CD4 Antibodies in HIV-Infected Immunologic Nonresponders Receiving Virus-Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2017;216(1):82–91.
34. Corbeau P, Reynes J. Immune reconstitution under antiretroviral therapy: The new challenge in HIV-1 infection. *Blood.* 2011;117(21):5582–90.
35. Körner C, Krämer B, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fätkenheuer G, et al. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4⁺ T-cells in HIV-positive patients. *Clin Sci* [Internet]. 2009;116(12):861–70. Available from: <http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20080532>
36. Patterson J, Jesser R, Weinberg A. Distinctive in vitro effects of T-cell growth cytokines on cytomegalovirus-stimulated T-cell responses of HIV-infected HAART recipients. *Virology.* 2008;378(1):48–57.
37. Pahwa S. Role of common gamma chain utilizing cytokines for immune reconstitution in HIV infection. *Immunol Res.* 2007;38(1–3):373–86.
38. Marchetti G, Gori A, Casabianca A, Magnani M, Franzetti F, Clerici M, et al. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. *Aids.* 2006;20(13):1727–36.
39. Smith GA, Uchida K, Weiss A, Taunton J, Francisco S, Engleman EP, et al. Essential biphasic role for JAK3 catalytic activity in IL-2 receptor signaling. *Nat Chem Biol.* 2016;12(5):373–9.
40. Hoeres T, Holzmann E, Smetak M, Birkmann J. PD-1 signaling modulates interferon- γ production by Gamma Delta ($\gamma\delta$) T-Cells in response to leukemia. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018;00(00):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1550618>

41. Chen L, Diao L, Yang Y, Yi X, Rodriguez BL, Li Y, et al. CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1 / PD-L1 Blockade. 2018;
42. Fülöp T, Cossarizza A. Cellular Senescence , Immunosenescence and HIV. 2017;42:28–46.
43. Centuori SM, Gomes CJ, Kim SS, Putnam CW, Larsen BT, Garland LL, et al. Double - negative - (CD27 – IgD –) B cells are expanded in NSCLC and inversely correlate with affinity - matured B cell populations. J Transl Med [Internet]. 2018;1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1404-z>
44. Watanabe D, Uehira T, Suzuki S, Matsumoto E, Ueji T, Hirota K, et al. Clinical characteristics of HIV-1-infected patients with high levels of plasma interferon- γ : a multicenter observational study. 2019;2:1–10.

Table 1. Search strings used for data search based on the types of cell death

<i>Cell death types</i>	<i>Search string</i>	<i>Results (total articles found)</i>
<i>Apoptosis</i>	hiv AND haart AND apoptosis AND imune reconstitution	64
<i>Necrosis</i>	hiv AND haart AND necrosis AND imune reconstitution	69
<i>Pyroptosis</i>	hiv AND haart AND pyroptosis AND imune reconstitution	13
<i>Accidental cell death</i>	hiv AND haart AND accidental cell death AND imune reconstitution	0
<i>Acd</i>	hiv AND haart AND acd AND imune reconstitution	0
<i>Anoikis</i>	hiv AND haart AND anoikis AND imune reconstitution	0
<i>Cell death</i>	hiv AND haart AND cell death AND imune reconstitution	49
<i>Cellular senescence</i>	hiv AND haart AND cellular senescence AND imune reconstitution	4
<i>Efferocytosis</i>	hiv AND haart AND efferocytosis AND imune reconstitution	0
<i>Entotic cell death</i>	hiv AND haart AND entotic cell death AND imune reconstitution	0
<i>Extrinsic apoptosis</i>	hiv AND haart AND extrinsic apoptosis AND imune reconstitution	14
<i>Ferroptosis</i>	hiv AND haart AND ferroptosis AND imune reconstitution	0
<i>Immunogenic cell death</i>	hiv AND haart AND immunogenic cell death AND imune reconstitution	0
<i>Intrinsic apoptosis</i>	hiv AND haart AND intrinsic apoptosis AND imune reconstitution	14
<i>Lysosome-dependent cell death</i>	hiv AND haart AND lysosome-dependet cell death AND imune reconstitution	0
<i>Mitochondrial permeability transition (MPT)-driven necrosis</i>	hiv AND haart AND mitochondrial permeability transition (MPT)-driven necrosis AND imune reconstitution	0
<i>Mitotic catastrophe</i>	hiv AND haart AND mitotic catastrophe AND imune reconstitution	0
<i>Mitotic death</i>	hiv AND haart AND mitotic death AND imune reconstitution	0
<i>Necroptosis</i>	hiv AND haart AND necroptosis AND imune reconstitution	0
<i>NETotic cell death</i>	hiv AND haart AND NETotic cell death AND imune reconstitution	0
<i>Parthanatos</i>	hiv AND haart AND parthanatos AND imune reconstitution	0
<i>Programmed cell death</i>	hiv AND haart AND programmed cell death AND imune reconstitution	57
<i>pcd</i>	hiv AND haart AND pcd AND imune reconstitution	2
<i>Regulated cell death</i>	hiv AND haart AND regulated cell death AND imune reconstitution	4
<i>rcd</i>	hiv AND haart AND rcd AND imune reconstitution	0
<i>Apoptosis</i>	<i>Adicional articles</i>	2
		292

Table 2. Characteristics of the included studies.

Reference, Year	Population (n)	Study Subject	Study designs included	Conclusions/Other Characteristics
Zeng et al., 2012(1)	LTs from HIV-1 infected patients (70 Male/Female)	Response to ART	Baseline and 6 months after initiating ART in the acute, pre-symptomatic and AIDS stages	Apoptosis increases progressive depletion of naive CD4+ and CD8+ T cells
Gaardbo et al., 2012(2)	NA	Mechanisms, clinical care and immunological nonresponse	Review article	NR was associated to high levels of immune activation and apoptotic cells
Singh et al., 2018(3)	Children <5 years of age (110)	Effect of ART in the B cell compartment	Prospective cohort study	B cells are conducted to over-activation and functional exhaustion by HV. ART could be inefficient in normalizing the levels of Fas Anti-CD4 IgG from NR induce cytolysis and apoptosis in NK and naive CD4+ T cells
Luo et al., 2017(4)	Healthy controls (17), HIV-positive responders (26), and HIV-positive nonresponders (22)	Specific mechanism to direct CD4+ T cell destruction	Case-control study	Polymorphisms associated with non immune response to ART. CCR5 was a co-activation molecule involved in immune activation and rise in CD4 count Early initiation of ART in HIV/HCV-co-infected patients may be no effective measure to prevent excessive loss of CD4+ T cells
Corbeau and Reynes, 2011(5)	NA	Response to ART. Discuss the tools to identify the mechanisms that may impair immune reconstitution	Review article	The frequency of T-cells in early apoptosis was increased by IL-2
Körner et al., 2009(6)	Patients (94) and healthy controls (12)	Ex vivo CD4+ T cell apoptosis in HIV/HCV-co-infected and HIV-mono-infected groups of patients in ART	Cross-sectional and serial analysis spontaneous	Failure of immune reconstitution have a proliferative response to IL-2, IL-7, and IL-15. Cytokine receptor deficiencies may contribute to immune deficiency in HIV-infected patients
Patterson et al., 2008(7)	Cytomegalovirus-seropositive individuals (62): HIV-infected on ART (36) and HIV-uninfected controls (26)	In vitro tests with PBMC from HIV-infected subjects	Case-control study	The lack of CD4 cell recovery in NR is consequence of a augmented activated apoptotic T cell compartment, elevated IL-7 and thymic impairment and high levels of intracellular HIV DNA
Pahwa, Savita, 2007(8)	HIV-infected pediatric patients in cohort study	The role of gamma cytokines (C γ) in response modulation to HIV infection	Literature review	X4 viruses could influence a poor immune reconstitution on ART by triggering persistente T-cell activation and bystander apoptosis via gp120-CXCR4 interactions. X4 viruses could account for the depletion of the naive T-cell pool by the impairment of the thymus output or by the destruction of mature naive cells in the periphery
Marchetti et al., 2006 (13)	Immunologic nonresponders (27), virological non-responders (15) and full responders (22)	T cell dynamics, HIV intracellular reservoir, homeostatic balances between antigen-driven activation, proliferation, cell death and thymopoiesis	Cross-sectional study	Virological suppression may induce Bcl-2 and IL-15 hyperexpression during incomplete immune-reconstitution phase. The more complete immune reconstitution appeared to be marked by both high TRECs and low LSA levels, indicating both central and peripheral CD4 T-cell repopulations
Delobel et al., 2006 (14)	Group of patients having poor immune reconstitution (15) and group of patients having good immunological and virological responses (15)	Different impacts of residual replication of CCR5 and CXCR4 receptors on T cell homeostasis during immune reconstitution on ART	Case-control study	B7-H1 is significantly up-regulated on circulating mDC in HIV-1-infected individuals and successful immune reconstitution after ART and B7-H1 expression decreased were inversely proportional
Torti et al., 2004 (15)	Patients divided in 4 groups: 1-concordant viro-immunological success (32), 2- virological success and immunological failure (9), 3- virological failure and immunological success (9), 4- concordant failure (11)	Virological and immunologic responses after ART	Case-control study	Reductions in immune activation were associated with reductions in spontaneous lymphocyte apoptosis. Changes in T cell counts suggest distinct pathophysiologic mechanisms to HAART-induced restoration
Wang et al., 2008 (16)	HIV-1 infected subjects and healthy individuals	B7-H1 expression on mDC in a cohort of HIV-1-infected individuals	Cross-sectional and longitudinal study	
Kalayjian et al., 2005 (17)	Older (45 years old) (92) versus younger (18–30 years old) (46) HIV-1-infected subjects	Clinical, immune, and viral responses to initial ART regimen	A prospective, multicenter cohort study	

Nunnari et al., 2005 (18)	Human mature neuron and astrocytes (hNT-2 cell cultures)	The role of IL-7 in HIV-1-associated dementia (HAD)	Cross-sectional study	IL-7R transcripts are not stable in specific human cells. IL-7 down-modulated IL-7Rα expression and increased HIV-1 mediated Fas-induced T-cell death, besides up-regulate STAT5 in astrocytes. Proapoptotic genes were up-regulated expression
Aladdin et al., 2003 (19)	HIV-infected individuals (27) and healthy controls (11)	Effect of ART on viral suppression on TRECs, telomere length, proliferative responses and PHA-stimulated apoptosis	Case-control study	Patients in virological success have TREC level normalization of CD4+ T-cell population
Almodovar, Sharllyn, 2014 (21)	NA	HIV infection associated with pulmonary complications (chronic obstructive pulmonary diseases, pulmonary arterial hypertension and lung cancer)	Literature review	HIV-X4 viruses relation with COPD and lung cancer
Wallace et al., 2016 (22)	PBMCs from HIV-positive adults. Regimen ART with zidovudine – ZDV - (10) or without ZDV (10) and healthy donors (10)	Use of zidovudine and mitochondrial stress associated with primary T cell survival	Cross-sectional study	Association among Zidovudine exposure, impaired mitochondrial turnover and increased susceptibility to apoptosis in T cells was found and contributes to a worse immune reconstitution
Giuliani et al., 2017 (23)	HIV-1-infected non responders patients (12) and HIV-1-infected responders patients (16)	Frequency, phenotype and various functions of NK-cell subsets of NR in ART in comparison with full immune responders	Cohort study	The NK-cell compartment that may play a role in disease progression and impaired CD4+ T cell recovery. NRs present decreased capacity of IFN-γ production in response to cytokine stimulation contributing to the susceptibility to infections and tumors
Koletar et al., 2004 (24)	HIV-infected subjects with CD4+ T cell counts <50 cells/mm ³ (612)	Response to ART	Prospective, placebo-controlled study	Opportunistic illnesses occurrence were associated with decreases in CD4+ cell counts and suboptimal control of virologic replication. Discordant responses (CD4+ cells increased and lack of suppression of viral replication) may be related to higher memory CD4+ cells count, activated CD8 cells and lower IL-2-producing CD4+ cells
Nasi et al., 2005 (25)	HIV-infected treatment-naïve patients (131) and healthy donors (136)	Fas and FasL polymorphisms and response to ART	Retrospective study	Combination of polymorphisms of Fas or FasL could influence CD4+ T cell production and viral load decrease. Immunoreconstitution triggered by ART may be influenced for these genes
Wilson; Sereti, 2014 (31)	NA	Acute complications like IRIS after ART initiation, chronic immune activation in long term therapy involved in immune restoration	Review article	Early ART is important to immune system restoration, limiting the imbalances and dysfunction of leukocyte subsets
Hayes et al., 2013 (26)	PBMC, and rectal and duodenal biopsies from chronic HIV-infected individuals (14)	Effects of ART initiation on CD4+ T cell immune activation in gastrointestinal tract	Cohort study	Immune activation was decreased in blood and rectal CD8+ T cells after ART. CD28 expression in peripheral and mucosal CD8+ T cells was increased. Early effects of ART included CD4 recovery in blood, duodenal and rectal mucosa, changes in T-cell differentiation and costimulatory molecule expression, and decreased HIV-specific CD8+ T-cell response
Rueda et al., 2013 (27)	Healthy controls (13), ART immunological responders (8), ART non-immunological responders (9), and untreated patients (16)	Immune reconstitution and response to ART	Cross-sectional study	Viral replication control is not sufficient to normalize gut Treg frequency. Partial normalization was observed only in the subsets of patients with overall CD4 reconstitution.
Barrett et al., 2014 (11)	HIV-infected CMV-seropositive (126) and HIV-infected CMV-seronegative individuals (27)	Cellular senescence	Observational cohort	HIV-infected CMV-seronegative individuals present ART-induced reconstitution of CD4+ T cell levels, normalization of CD4+/CD8+ T cell ratios and less immunosenescence
Tadokera et al., 2011 (28)	Culture of PBMC from tuberculosis (TB) and HIV-infected individuals with IRIS	Pro- and anti-inflammatory cytokines in TB-IRIS pathology	Case-control study	Cytokine release contributes to pathology in TB-IRIS. IL-6 and TNF were elevated. Corticosteroid therapy influence IL-6 and TNF decrease in serum

Al-Harthi et al., 2004 (29)	ART naive HIV-infected patients evaluated longitudinally (13)	Therapeutic effect in HIV-1-infected patients	Cohort study	This increase in CD95 expression could not be explained by enhanced apoptosis, but shows the activation status of T cells. ART prior to CD4 T-cell decline below 500 cells/mL.
Benveniste et al., 2005 (8)	HIV-1-infected subjects who had CD4+ cell count <250/mm ³ (19) and control patients with CD4+ cell count >500/mm ³ (19)	Response to ART	Prospective transsectional case-control	Low-level regeneration of CD4+ cells is related to regeneration of central CD4+ cells deficiency and apoptosis. Increased T cell death by apoptosis was related to a higher level of CD4+ cells activation
Piconi et al., 2010 (30)	HIV-infected and treated patients with undetectable viremia divided in group with CD4 cell counts >500 cells/μl and group with CD4 cell counts <500 cells/μl (67)	Relationship between immune activation and poor CD4+ T-cell-recovery during virologically successful ART	Transversal case-control	Immune alterations are present in ART-treated patients with CD4+ T lymphocyte counts reduction. Altered gut permeability resulting in increased LPS serum concentrations would trigger TLR-4-mediated immune activation of multiple cell types. Activated Treg lymphocytes could avoid complete CD4+ T cells reconstitution via immunosuppressive cytokines and apoptotic mechanisms

Note: NA – not available; NR – immune non responders; ART – antiretroviral therapy; LT – lymphoid tissue; TREC – TRC excision circle; IL-2, IL-15 - cytokines interleukin 2 and 15; *Fas* – *Fas receptor*; *Cγ* – gamma cytokines; LSA – lymphocyte spontaneous apoptosis; B7-H1 – CD274, programmed death-1 ligand-1 (PD-L1); mDC – myeloid dendritic cells; PHA – phytohaemagglutinin; PBMC – peripheral blood mononuclear cells; COPD – chronic obstructive pulmonary disease; IRIS – Immune reconstitution inflammatory syndrome; CMV – Cytomegalovirus; TNF – Tumour necrosis factor; LPS – lipopolysaccharide.

Table 3. Summary of characteristics of included studies based on outcomes of mechanisms of cell death.

Outcomes	Mechanisms	Conclusions	References
Apoptosis	- Damage to the FRC network - Poor access to IL-7 - Dysregulation of telomerase - Antibody-dependent cytotoxicity - TREC activation - Polymorphisms in IL-2, IL-15 genes - Measure of apoptosis using PARP and TUNEL - γ-chain cytokines modulation - Reservoir and immunophenotyping subsets and IL-7/IL-7R measurement - TREC, spontaneous apoptosis and HIV-1 env regions quantifications - IL-7/IL-7R pathway activation - Treatment of PBMC with PHA, FITC and 7-AAD - Monoclonal antibodies and endotoxin levels analyzes - mtROS and mtMass quantification - TGF-β, immunomodulatory cytokines and interleukins signalling - T cell proliferation and count, TREC, cytokines, apoptosis, cellular proviral DNA and plasma viral RNA assesment - Stimulation with gag+env or CMV peptides for analyzes of PD-1, TLR2 and TLR4 expression, IL-10 and TGF-β production, annexin V and caspases 8 and 9 activation - Polymorphisms genotyping in Fas and FasL - HIV reservoir and CXCR4/CCR5 receptors evaluation - Thymic-dependent and –independent pathways of T cell regeneration - B7-H1 expression - Spontaneous apoptosis and evaluation of Bcl-2, IL-7, IL-15, CD45RA and CD45RO expression	- Enhanced perforin expression of CD8 - Pro-liferative response to IL-2, IL-7, and IL-15 - Chromosome instability - Deposition collagen - High immune activation - Cytolysis and apoptosis activation via Anti-CD4 IgG in nonresponders - Impaired activity and production of thymus - Apoptosis induced by spontaneous Fas and HIV - HCV/HIV-co-infected patients with higher levels of apoptotic cells - IL-2 increased the early apoptosis in cells - Poor CD4 recovery caused by high activation of apoptotic T cells, elevated IL-7, thymic impairment and high levels of HIV DNA - Poor immune reconstitution due persistente cell activation and bystander apoptosis via gp120-CXCR4 interactions - Neuronal apoptosis augmented by HIV-1 gp120 and Fas - High susceptibility of PBMCs to spontaneous and PHA-stimulated apoptosis in HIV-infected patients - Increased susceptibility to apoptosis is correlated with increased PD-1 expression - Increased spontaneous apoptosis of zidovudine-exposed T cells by upregulation of caspase-3 - Higher ROS-positive frequency in zidovudine presence - mt-ROS-positive CD8+ and CD4+ T cells caused excessive cell death - TGF-β pathway induced fibrosis and prevents access to IL-7 resulting in apoptotic depletion - High levels of CD4+ cells activation, lower thymic output, increased apoptosis, Fas induced and TNFR1 - Altered gut permeability causes TLR-4-mediated immune activation - Treg activation prevent CD4+ t cell reconstitution by immunosuppressive cytokines and apoptotic mechanisms - -670 polymorphism association with apoptosis and diseases related to apoptosis across cell proliferation or NF-κB activation - HIV-CXCR4 associated with risk of cancers and apoptosis associated with inflammatory process due to HIV complications - Higher levels of sTNFR1 and IL-7 in HIV-1-infected patients. TREC increased in older infected subjects - Upregulation of B7-H1 and PD-1 in HIV-infected subjects related with apoptosis in myeloid dendritic cell - Bcl-2 more expressed in immune failure patients, spontaneous apoptosis more frequent in complete failure group, IL-7 increased in HIV-positive subjects	(1,2,14–17,20,21,27–29,4–7,9,10,12,13)
Immunosence	- Downregulation of CD27 and CD25 expression - HIV/CMV co-infection	- ART-induced normalization of CD4 and CD8 T cells levels and immune senescence phenotype - ART is inefficient to normalizing Fas levels - Over-activation and exhaustion of B cells induced by HIV	(3,24)
Cell activation	- Plasma HIV RNA levels - γ-chain cytokines modulation	- Fas expression increased reflect the T cells activation - Proliferative response to IL-2, IL-7, and IL-15 stimulation - IL-21 enhanced perforin expression in CD8 T cells	(8,26)
Response to ART	- CD4+ T cell and HIV RNA levels count - Quantification of markers of immune activation and LPS levels - Biomarkers panel	- CD4+ cells count decrease associated with higher baseline HIV RNA load (suboptimal control of virologic replication) and opportunistic illnesses - Discordant response (increased CD4+ and lack of viral replication suppression) was related with activated CD8+ count and IL-2 producing by CD4+ cells - Patients in ART therapy present decreased levels of CTLA-4 and PD-1 expression compared with untreated patients - Gut Treg frequency is partially normalized in patients with overall CD4 reconstitution - Immune activation decrease in CD8+ T cells after ART	(19,22,23)
Inflammation	- Cytokine gene expression and secretion by heat-killed <i>Mycobacterium tuberculosis</i> stimulation - Quantification of soluble CD14 and LPS and evaluation of functional activity of NK-cell	- Increased cytokine transcripts, release and concentrations in serum - This condition contribute to pathology in TB-IRIS - Corticosteroid therapy decreases IL-6 and TNF in serum - In CD56^{bright} NK-cell and infections susceptibility increase, the CD4+ T cell count and CD25 levels were decreased	(18,25)

Note: FRC – fibroblastic reticular cell; IL-7 – interleukin 7; TREC – TRC excision circle; IL-2, IL-15 – cytokines interleukin 2 and 15; PARP – poly(ADP-ribose) polymerase; TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling; IL-7R – interleukin 7 receptor; PBMC – peripheral blood mononuclear cell; PHA – phytohaemagglutinin; FITC – annexin-fluorescein isothiocyanate; 7-AAD – 7-amino actinomycin D; mtROS – mitochondrial reactive oxygen species; TGF- β – transforming growth factor β ; PD-1 – programmed death-1; CMV – Cytomegalovirus; TLR2,TLR4 – Toll-like receptors 2 and 4; IL-10 – interleukin 10; CD25 – interleukin 2 receptor subunit alpha; CD27 – CD27 molecule; Fas – Fas receptor; HCV – hepatitis C virus; CXCR4 – C-X-C chemokine receptor type 4; TNFR1 – tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b; IL-6 – interleukin 6; TB – tuberculosis; IRIS – Immune reconstitution inflammatory syndrome; TNF – Tumour necrosis factor; CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; CCR5 – C-C chemokine receptor type 5.

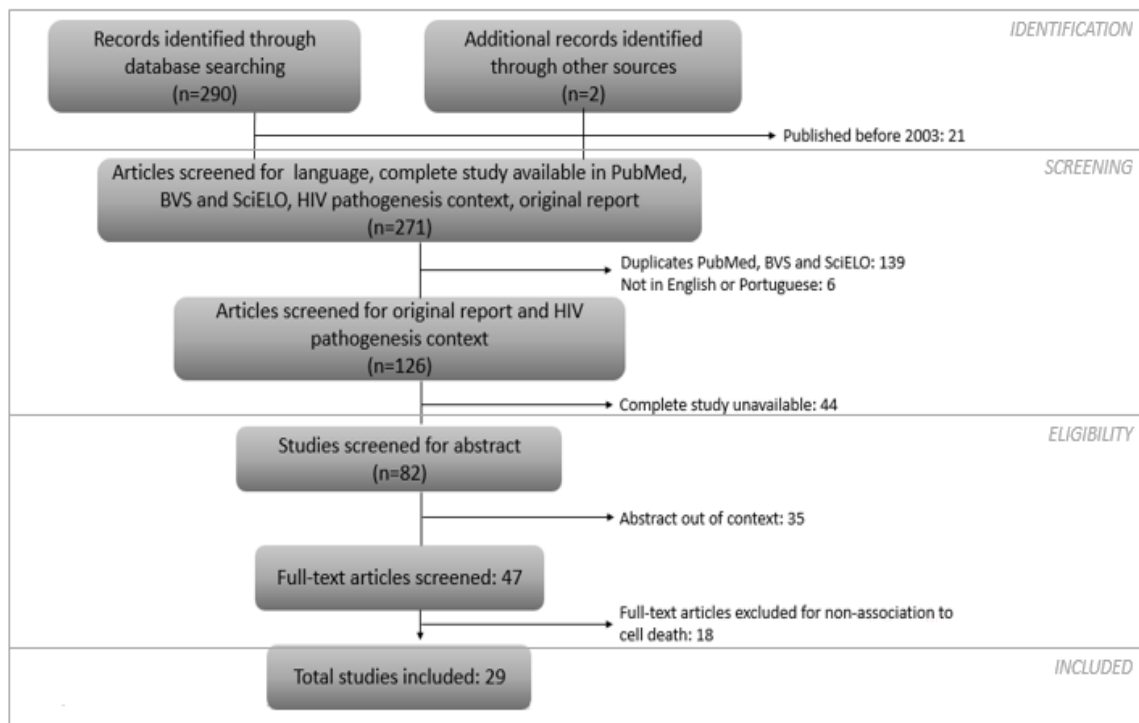


Figure 1. Flow chart of excluding and selecting studies. Adapted from (30).

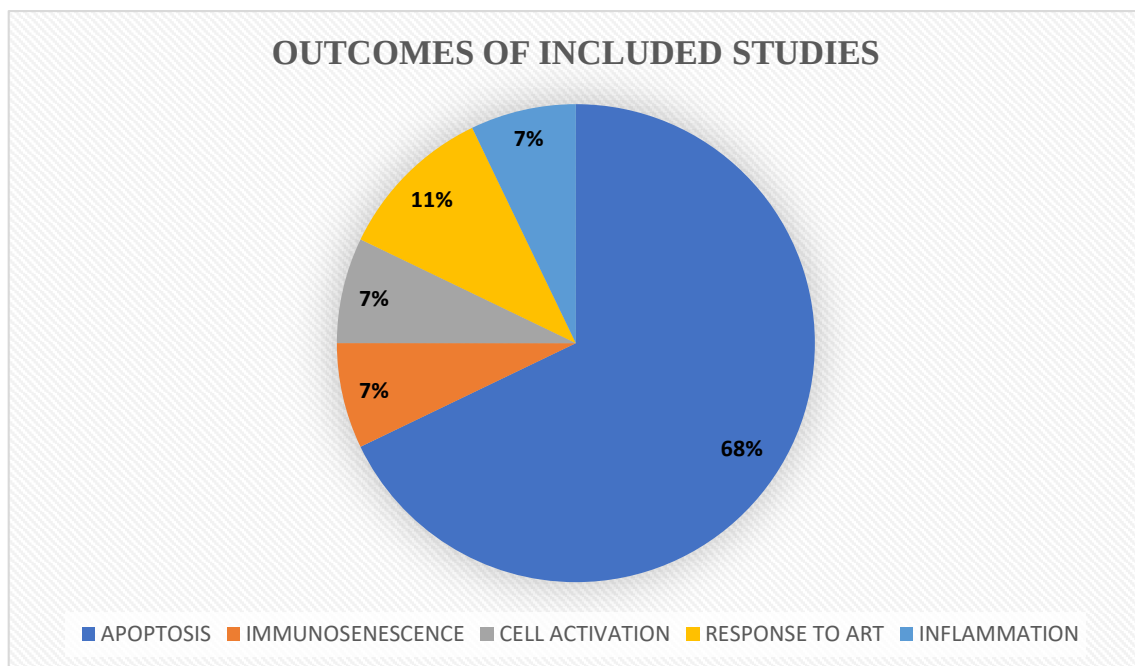


Figure 2. Distribution of outcomes related with poor immunologic reconstitution of HIV-1 nonresponders patients in ART.

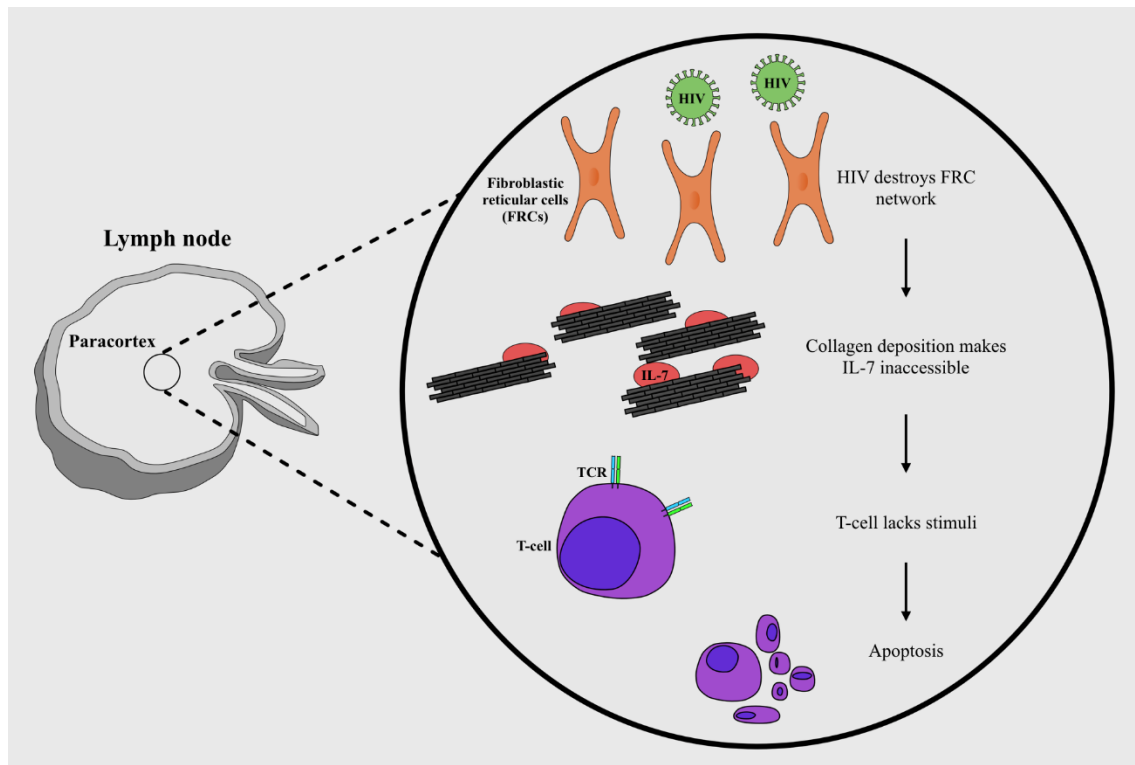


Figure 3. Deregulation of lymphoid tissue architecture during HIV infection. In chronic phase of infection, HIV induces the destruction of FRC (fibroblastic reticular cell) network in the paracortex. FRC network destruction induces collagen deposition causing fibrosis and loss of IL-7 production. T cells lose the survival stimulus and undergo apoptosis.

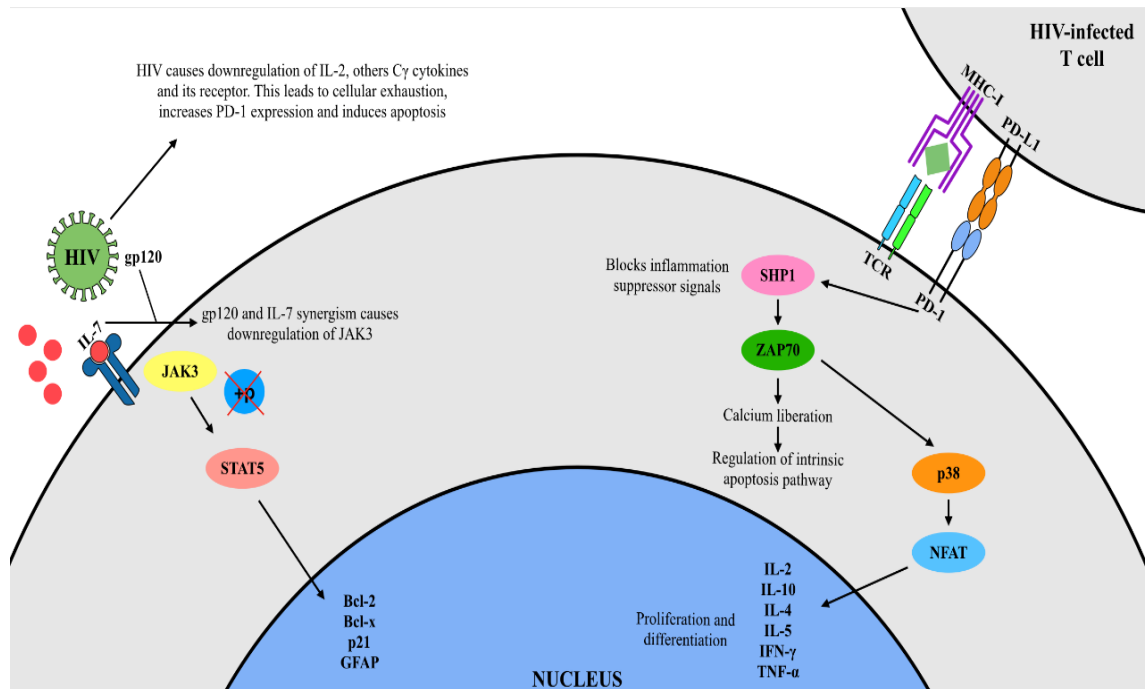


Figure 4. Modulation of cell activation pathways in HIV infection. Levels of IL-7 and IL-7R are deregulated during infection. IL-7 and gp120 act synergistically downregulating Jak3 and preventing the activation of STAT5 increasing apoptosis. HIV also decreases or inhibits the production of IL-2 and increases the expression of PD-1 (exhausted phenotype). PD-1/PD-L1 linkage controls inflammation through NFAT activation and causes chronic immune activation, cell depletion, senescence and insufficient immune reconstitution.

3.3 ARTIGO 3 - MOLECULAR INTERACTION BETWEEN HIV-1 GP120 PROTEIN AND CELL ACTIVATION RECEPTOR: A POSSIBLE MECHANISM OF IMMUNE SUPPRESSION

Molecular Interaction between HIV-1 gp120 Protein and Cell Activation Receptor: A Possible Mechanism of Immune Suppression

Neyla Maria Pereira Alves^{1*}, Ronald Rodrigues de Moura^{2,3}, Heitor Horlando Sampaio Araújo da Silva³, Natália Pereira da Silva³, Sergio Crovella², Ronaldo Celerino da Silva¹, Lucas André Cavalcanti Brandão^{1,3}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author:

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – Federal University of Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife, Pernambuco, Brazil. Phone/Fax: +55 8121268484/8121268485. E-mail: neyla_pa@outlook.com

Abstract

Pathogenicity of Human Immunodeficiency Virus (HIV) is characterized by the gradual loss of CD4⁺ T cells and loss of cell-mediated immunity. Viral infection mechanisms can modulate cell death and inflammation through the TNF- α or FasL pathways in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes causing death of these cells by apoptosis and viral persistence and suppression of the immune system. Clarify how the activation of TNF- α /TNFR1, TNF- α /TNFR2 and FasL/Fas is involved in the increase of cell death by apoptosis or inflammation due to HIV-1 infected cells is crucial for understanding viral pathogenesis and the possible targeting of antiretroviral treatment. Thus, we describe the *in silico* molecular interactions between the TNFR1, TNFR2, Fas receptors, their ligands and viral gp120 molecule involved in the extrinsic pathways of apoptosis. Structures of TNFR1, TNFR2, Fas, TNF- α , FasL and gp120 stored in PDB Databank were used for Molecular Docking and Dynamics simulations. Combinations were made between receptors, ligands, intracellular molecules and viral factors. We found that gp120 molecule binds strongly to TNFR2 in the same region that TNF- α does and may be a major competitor with TNF- α in groups of individuals even on antiretroviral therapy may present poor immune recovery.

Keywords: Death receptors; HIV-1 infection; gp120 modulation; Molecular interactions; Immune response.

Introduction

The mechanism that involves the progressive decline of CD4 + T lymphocytes in infected patients is controversial (1), however host and viral factors can play a key role in CD4+ T cell loss (2) stimulating the modulation of the signaling pathways in these cells (3). Several molecules, cells and mechanisms of recognition, death or help to the infected cell are involved in host immune response during infections. On the other hand, viruses may present several ways to escape of the immune system of host (4).

Apoptosis is recognized as an important mechanism of T cell depletion in HIV infections (5) since its regulation occurs in order to favor viral replication and survival through the activation of pro-caspases and caspases, increasing virus transcription. At the same time, this apoptotic mechanism, in persistent infections, contributes to the persistence and/or latency of the virus (6). Garg, Mohl and Joshi (7), described the performance of two viral envelope glycoproteins, gp120 and gp41, in binding to cellular CD4 chemokines receptors and fusion between viral and cellular membranes, cooperating for the formation of syncytia and facilitating virus transmission between infected and uninfected cells and, consequently, increased apoptosis.

The gp120/gp41 viral structure (spike) undergoes changes in the configuration that allow the virus to enter the target cell through a high potential energy used for fusion between viral and cellular membranes. These changes in the configuration are necessary to guarantee flexibility for gp120 even retaining contact with gp41(8). The gp120 plays an important role in the pathogenesis of hiv because it induces the expression of death receptors (Fas and TNFR) in CD4+ and CD8+ T lymphocytes and activates the production of proinflammatory cytokines

such as TNF- α participating in the death of these cells by apoptosis contributing to viral persistence and suppression of the immune system during infection (3).

Tumor necrosis factor (TNF) is an immunity-modulating cytokine that activates signals through TNF receptors 1 and 2 and is required for defense against infectious diseases (9). In HIV-1-infected individuals the concentrations of TNF- α are persistently high (10). Tumor Necrosis Factor receptors (TNFR) can be classified as activators (TNFR2) or death (TNFR1 and Fas). These receptors contain a transmembrane region and extra- and intracellular domains to which ligands and adapter proteins bind, (FADD, TRAF2, RIP1, TRADD), respectively, transmitting pro- or anti-apoptotic signals by the activation of caspases or NF- κ B (11,12). The formation of Fas/FasL complex activates apoptotic mechanisms similar to those induced by TNF, another possible pathway for apoptosis in HIV-1 infected cells due to the high level of detectable expression of this complex in macrophages of infected patients (13).

Several intra- and extracellular mechanisms are involved in both apoptosis and persistent cell activation, but insufficient data on the influence of the direct action of gp120 on the activation of TNFR1, TNFR2 and Fas receptors that characterize the modulation of cellular activation or apoptosis pathways, which is the focus of this study. Here we describe the molecular interactions between HIV-1 gp120, TNFR1, TNFR2, Fas and their ligands involved in the extrinsic apoptosis of HIV-1-infected individuals cells.

Methods

1. Structures

For molecular docking and Dynamics simulations, we used structure stored in Protein Databank (PDB). The PDB ID of the structures are: TNF-alpha: 1TNF; TNFR1: 1EXT;

TNFR2: 3ALQ; Fas: 3THM; FasL: 4MSV; and gp120: 4RZ8. Prior simulations, the structures were edited using Chimera v. 1.13.1 software (removing water and other molecules).

2. Protein-Protein Docking

We used ClusPro server to perform molecular docking between the structures assuming the balanced coefficients, choosing the model with lowest cluster score.

3. Molecular Dynamics simulations

Molecular dynamics (MD) was performed with GROMACS software (version 2016.2) to determinate the stability of the docked complex. The simulation force field used for all simulations was the GROMOS/53A6. The tridimensional structures were solvated into a cubic box with SPC/E water molecules, and neutralized by adding Na^+ and Cl^- ions. The steepest descent method for Energy minimization was used with 50,000 steps. The equilibration of the system was made in two phases: first, NVT (constant number of particles, volume and temperature) equilibration, with constant temperature (310K) for 10 ns; second, an NPT (constant number of particles, pressure and temperature) equilibration with constant pressure of 1 bar and constant temperature of 310 K, also for 10 ns. Finally, after minimizing energy and equilibrating the system, the production phase was carried out at 310 K. The covalent bonds were constrained using the LINCS (Linear Constraint Solver) algorithm whereas the electrostatic interactions were assessed through the PME (Particle Mesh Ewald) method. The MD trajectories were recorded every 10 ps and the production time was 100 ns.

Results

Docking results are displayed in Table 1. The gp120 molecule binds to TNFR2 in the same region that TNF-alpha does, although with less affinity than TNF-alpha (cluster scores: -951.3 and -1831.9, respectively). Moreover, gp120 did not bind to TNFR1 or Fas in the region that TNF-alpha and FasL binds, respectively.

To evaluate the stability of the complexes, we carried out Molecular Dynamics. In general, the complexes with the native ligands of TNFR1, TNFR2 and Fas were more stable along the simulations (Figure 1). Analyzing the RMSD plot of TNFR2-gp120, we observed that, although the docking suggested the binding of the complex, the stability of this system did not persist after 50 ns, where one unit of the TNFR2 trimer dissociates of the complex (Figure 2).

Furthermore, although RMSD plot from Fas-gp120 complex points to a stable system, the region where gp120 binds, according to docking, did not suggest activation of the receptor. Finally, the complexes with TNFR1 suggests a non-activation of the receptor through gp120. Other MD analysis (radius of gyration, and solvent accessibility analysis) also corroborates RMSD data.

Discussion

We sought to characterize and correlate, from a molecular approach, the interaction of three receptors involved in the extrinsic pathway of apoptosis and inflammation (TNFR1, TNFR2 and Fas) with their respective ligands and with viral gp120 regarding the response of HIV-1-infected individuals to antiretroviral therapy. The viral gp120 protein was chosen as the link between HIV and its target cell through direct binding to the cellular CD4 and coreceptors.

The structure of TNFR2 may be formed by both dimers and trimers to which two or three TNF trimers bind by recruiting other complexes and forming TNF-TNFR2 aggregates on the cell surface. These models present symmetry and allow the formation of a realistic structural arrangement for both models described. Subsequently, the formation of these aggregates induces the recruitment of intracellular molecules such as TRAF2 that binds to the internal region (intracellular domain) of TNFR2 initiating the signaling pathway mediated by that receptor (9). Even though it is not clear how TRAF2 triggers signal transduction through this pathway, it is known that from the activation of the TNFR1-TNF- α pathway, it forms complex with other adapter molecules (TRADD and RIP1) inducing the activation and transcription of NF- κ B to activate proinflammatory responses (14,15).

Due to the possibility of gp120 replacing TNF- α with TNFR2 binding in the mechanism described above, we consider the possibility that the molecular mechanisms of HIV-1 infection and defense observed in treated individuals involve the following scenario: gp120, because it is a flexible glycoprotein (does not bind to gp41 by disulfide linkages) and is capable of undergoing conformational changes after initially binding to the CD4 present in the cell membrane and subsequently binds with high affinity with both the CCR5 and with CXCR4 co-receptors (8), is also able to bind stably with TNFR2 triggering a persistent cell activation condition, given the dynamic behavior of these two molecules.

In addition, since the formation of complexes between TNFR2 and TNF- α can occur both in the presence of homodimers and homotrimers, the fact that one of the TNFR2 trimers departs after 50 ns during simulation with gp120 makes us hypothesize that this event may not interfere in the recruitment of intracellular molecules.

On the other hand, the TNFR1 and Fas receptors are involved in signaling pathways of cellular death and activation making us to think, similarly to Herbein (3), that gp120 acts synergistically with these receptors and modulates key mechanisms of these pathways as

increasing the expression of these receptors and consequently transcription of NF- κ B or increased activation of caspases, stimulating the recruitment and chronic activation of bystanders cells and resulting in death due to cell exhaustion. However, the results of the simulations between TNFR1 or Fas and gp120 showed that gp120 was not able to bind in the same regions as the natural ligands of these receptors and there was no formation of stable complexes.

Our results show the importance regarding the molecular characterization of these pathways of inflammation and cell death by apoptosis in relation to HIV-1 infection. Considering that apoptotic mechanisms and concentrations of persistent proinflammatory cytokines in viral infections are important factors for the virus latency condition (6,10) and that viral gp120 is capable of interacting strongly with the TNF receptor 2 that is related to T cell survival (9), we propose that this viral envelope glycoprotein may be a competitor with TNF- α and that groups of individuals even on antiretroviral therapy may present poor immune recovery because of increased levels of viral reservoir and/or cell depletion induced by modulation of signaling pathways by gp120.

Even if this possibility exists, new studies involving the analysis of interactions between intracellular molecules with other viral factors are still needed to better clarify the behavior of the defense cells against HIV-1 infection and make possible new directions for ART.

Conclusions

We concluded that gp120 and receptors of cell activation and death are able to interact significantly and gp120 may compete with TNF- α for TNFR2 binding. These interactions suggest that there is an important mechanism of blocking cell death and activation of

inflammation in HIV-1 infected cells that may influence the formation of viral reservoirs and consequently impair the immune recovery of HIV-1 infected individuals.

References

1. Chorin E, Gal-Garber O, Yagel Y, Turner D, Avidor B, Berke G, et al. PBMC of HIV-infected patients contain CD8 T cells that form conjugates with and kill HIV-infected autologous CD4 T cells. *Immunology* [Internet]. 2014;30(1):n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12385>
2. Garg H, Joshi A. Host and viral factors in HIV-mediated bystander apoptosis. *Viruses*. 2017;9(8):1–23.
3. Herbein G, Gras G, Khan K, Abbas W. Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology* [Internet]. 2010;7(1):34. Available from: <http://www.retrovirology.com/content/7/1/34>
4. Cossarizza A. Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2008;14(3):237–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220834>
5. Pitrak DL, Novak RM, Estes R, Tschampa J, Abaya CD, Martinson J, et al. Apoptosis Pathways in HIV-1-Infected Patients Before and After Highly Active Antiretroviral Therapy: Relevance to Immune Recovery. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014;30(00):1–9.
6. Schnepf DJ, Shepard B, Bren GD, Cummins NW, Natesampillai S, Trushin S, et al. Isolation of a TRAIL antagonist from the serum of HIV-infected patients. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35742–54.
7. Garg H, Mohl J, Joshi A. HIV-1 induced bystander apoptosis. *Viruses*. 2012;4(11):3020–43.

8. Pancera M, Majeed S, Ban YA, Chen L, Huang C, Kong L. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. 2010;107(3):1–6.
9. Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, Yoshioka Y. Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex. 2013;3(November 2010).
10. De Pablo-Bernal RS, Ruiz-Mateos E, Rosado I, Dominguez-Molina B, Alvarez-Ríos AI, Carrillo-Vico A, et al. TNF- α levels in HIV-infected patients after long-term suppressive cART persist as high as in elderly, HIV-uninfected subjects. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(11):3041–6.
11. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics* [Internet]. 2001;17(8):738–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524375>
12. Li J, Yin Q, Wu H. Structural Basis of Signal Transduction in the TNF Receptor Superfamily. *Adv Immunol* [Internet]. 2013;1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781945/>
13. Mbita Z, Hull R, Dlamini Z. Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-mediated apoptosis: new therapeutic targets. *Viruses*. 2014;6(8):3181–227.
14. Shibata Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Han X, Tanaka Y, Gohda J, et al. p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat Commun* [Internet]. 2012;3:1061. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms2068>
15. Cubero FJ, Singh a, Borkham-Kamphorst E, Nevzorova Y a, Al Masaoudi M, Haas U, et al. TNFR1 determines progression of chronic liver injury in the IKK γ /Nemo genetic model. *Cell Death Differ* [Internet]. 2013;20(11):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933814>

Table 1. Results of Molecular Docking among activation and cell death receptors, ligands and HIV-1 gp120

Receptor	Ligand	Cluster Value	Presence of interaction
TNFR1	TNF- α	-1300,7	Yes
TNFR1	gp120	-888,6	No
TNFR2	TNF- α	-1831,9	Yes
TNFR2	gp120	-951,3	Yes
Fas	FasL	-970,9	Yes
Fas	gp120	-932,6	No

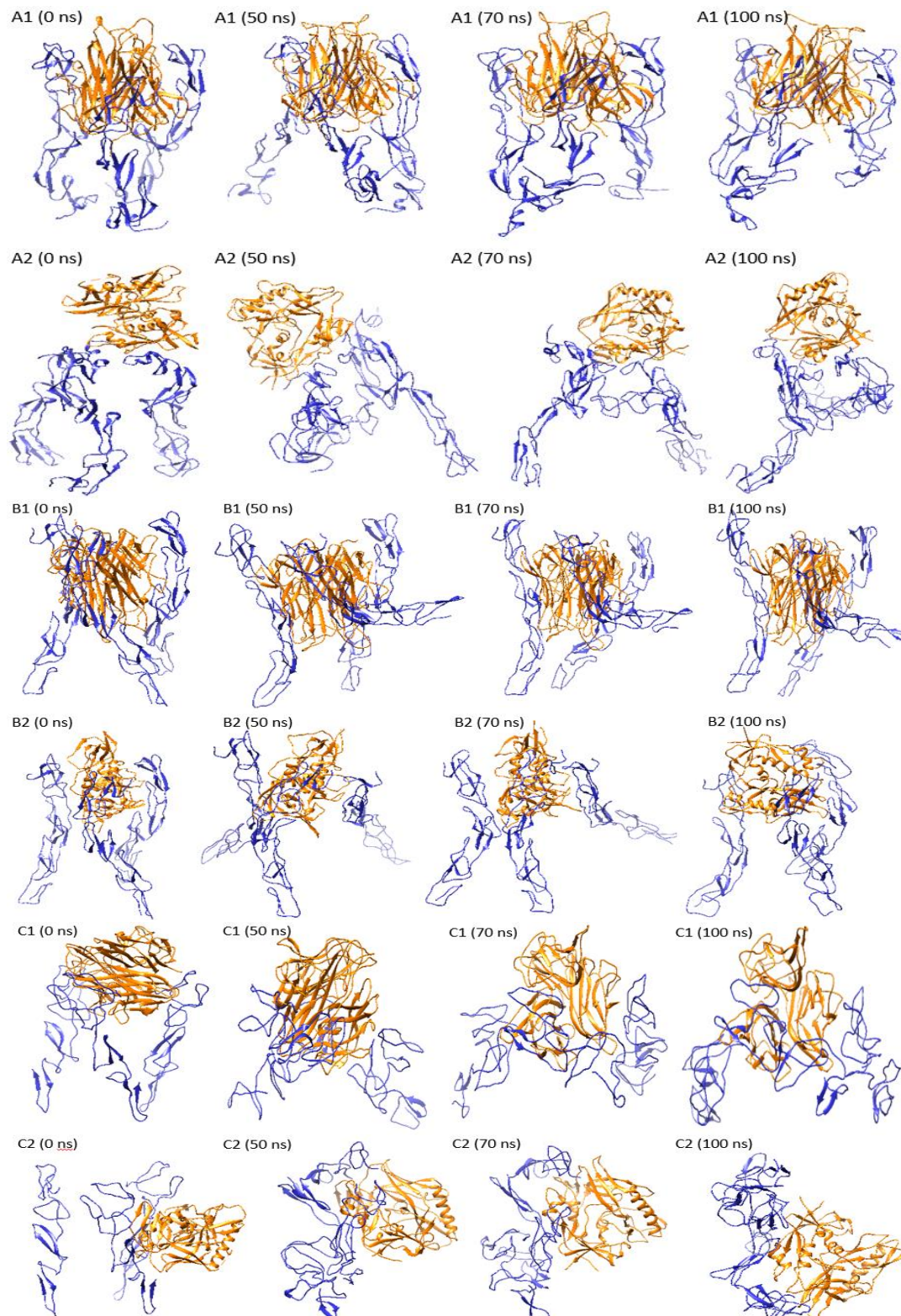


Figure 1. TNFR1-TNF α (A1), TNFR1-gp120 (A2), TNFR2-TNF α (B1), TNFR2-gp120 (B2), Fas-FasL (C1) and Fas-gp120 (C2) interactions showing the behavior of the receptors and ligands at 0 ns (initial time), 50 ns, 70 ns and 100 ns (final time). gp120 is not able to bind to TNFR1 and Fas receptors (A2 and C2, respectively). Receptors and their natural linkers have stable bonds (A1, B1 and C1). The B2 image at 50 ns and 70 ns times shows a discrete dissociation of one of the TNFR2 trimers. B2 image, at time 100 ns, shows the restoration of the TNFR2 trimer to the complex.

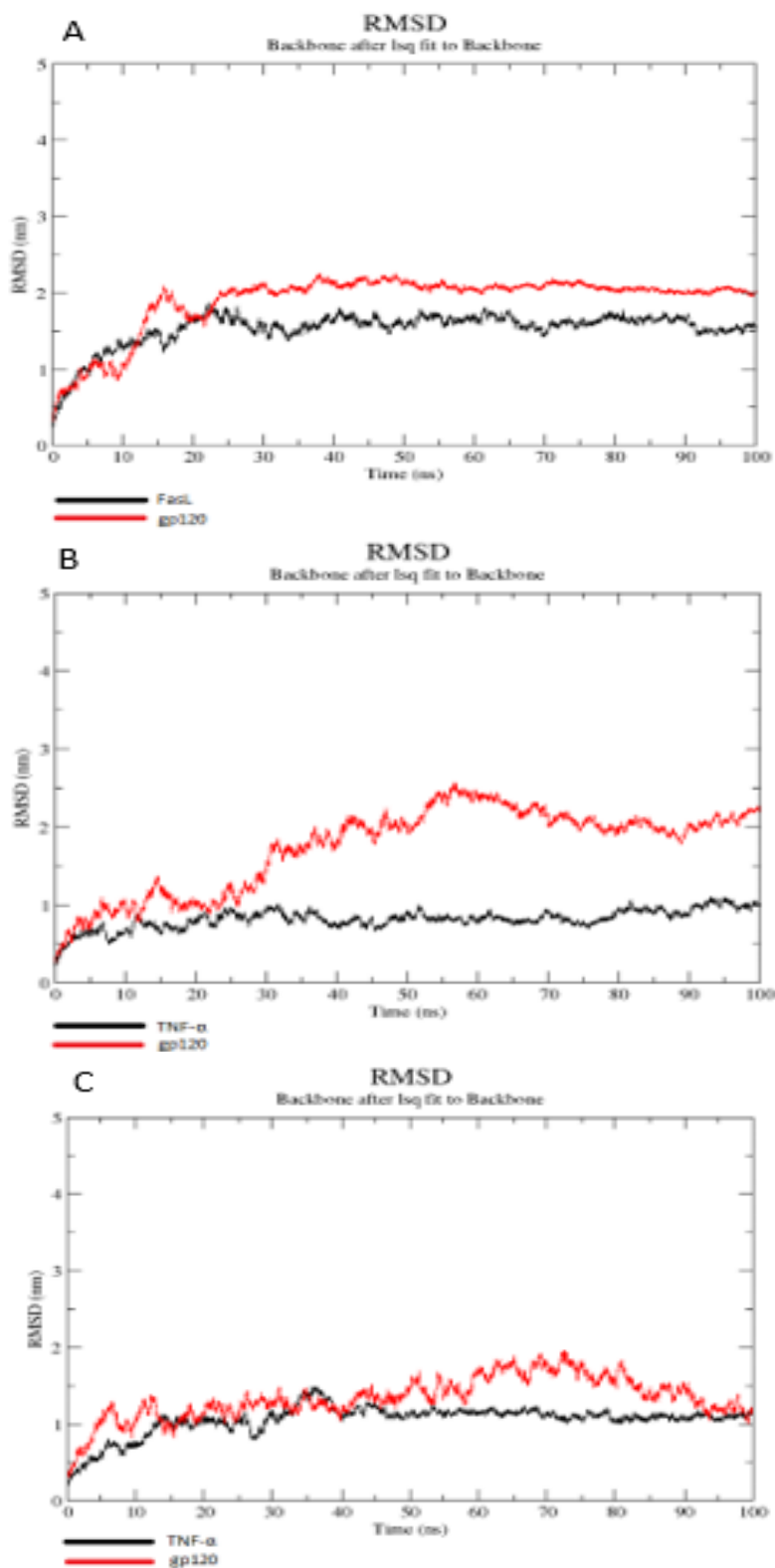


Figure 2. Graphs representing the distance between the atoms (nm) in the times of 0 to 100 ns. The lines in black represent the reference ligands (TNF- α or FasL) and the red lines represent the test ligand (gp120). (A) Fas-FasL and Fas-gp120 interactions, (B) TNFR1-TNF- α and TNFR1-gp120 interactions, and (C) TNFR2-TNF- α and TNFR2-gp120 interactions.

4 CONCLUSÕES

Influência de variações genéticas na via do TNF- α /TNFR1

- Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores envolvendo outras populações sobre a recuperação imune mais lenta em indivíduos em TARV estar associada a níveis numéricos de linfócitos T CD4⁺ subótimos antes do início da terapia;
- Média de idade de 34,8 anos e sexo masculino são possíveis fatores de risco para falha imunológica;
- A compreensão dos mecanismos relacionados à desregulação imunológica associada ao HIV-1 é essencial para o desenvolvimento de possíveis intervenções terapêuticas. Embora tenhamos encontrado associações entre os SNPs estudados das moléculas envolvidas na via apoptótica e inflamatória, novos estudos com maior número de moléculas e indivíduos precisam ser realizados para descobrir o papel dos SNPs nesses genes na terapia do HIV-1.

Mecanismos de morte celular relacionados à falha imunológica

- Os estudos incluídos na revisão sistemática não evidenciaram os critérios adotados para definir a falha imunológica de maneira robusta o suficiente para determinar o mecanismo chave da ativação da morte celular que caracteriza a perda de células T na patogênese do HIV-1. Apenas dois estudos de caso-controle e um estudo transversal permitiram substancial cruzamento dos dados necessários. Assim, nossos achados sobre qual tipo de morte celular é responsável por prejudicar a reconstituição imune completa de um grupo significativo de pacientes não podem ser aplicados;
- Os principais resultados mostraram que a apoptose em indivíduos infectados pelo HIV-1 não respondedores à TARV foi ativada pela via extrínseca;
- A falta de recuperação das células T CD4⁺ depende de múltiplos fatores como: baixa função tímica e falta de acesso à IL-7 associados à apoptose ativação imune prejudicada, expressão da molécula de morte celular programada-1 (PD-1) exercendo papel imunomodulador na ativação celular e na imunosenescência, co-infecção por tuberculose e Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune (IRIS) como fatores que aumentam a condição de inflamação via TNF, IL-6 e IFN, contagem basal de células T CD4⁺ influenciando a apoptose devido à instabilidade cromossômica.

Análises in silico

- HIV-1 gp120 e receptores de inflamação e morte são capazes de interagir entre si de forma significativa;
- gp120 pode competir com TNF- α pela ligação com TNFR2 devido à sua capacidade de mudança de conformação estrutural decorrente da ausência de ligações covalentes;
- Essas interações sugerem a possibilidade de haver um mecanismo importante de bloqueio de morte celular e ativação de inflamação em células infectadas por HIV-1 que pode influenciar a formação de reservatórios virais e, consequentemente, prejudicar a recuperação imune de indivíduos acometidos pela infecção;
- A ativação dessa via pode direcionar o entendimento a respeito da patogenicidade da infecção pelo HIV-1 em células T.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 9th editio ed. Philadeplhia: Elsevier, 2018.
- ABHISHEK V. GARG, MUSHTAQ AHMED, ABBE N. VALLEJO, AVERIL MA, AND S. L. G. The Deubiquitinase A20 Mediates Feedback Inhibition of Interleukin-17 Receptor Signaling. **Sci Signal**, v. 149, n. 5, p. 521–530, 2013.
- ALVES, S. et al. Progress Report on the Brazilian Response to HIV/AIDS. p. 1–127, 2012.
- ANTONIO VICTOR CAMPOS COELHO, LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI BRANDÃO, RAFAEL LIMA GUIMARÃES, PAULA LOUREIRO, JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO, LUIZ CLÁUDIO ARRAES DE ALENCAR, SERGIO CROVELLA, L. S. Mannose Binding Lectin and Mannose Binding Lectin-Associated Serine Protease-2 Genes Polymorphisms in Human T-Lymphotropic Virus Infection. **Journal of Medical Virology**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2013.
- BARMANIA, F.; PEPPER, M. S. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. **Applied and Translational Genomics**, v. 2, n. 1, p. 3–16, 2013.
- BARRADAS-BAUTISTA, D.; FERNÁNDEZ-RECIO, J. Docking-based modeling of protein-protein interfaces for extensive structural and functional characterization of missense mutations. **Plos One**, v. 12, n. 8, p. e0183643, 2017.
- BARRE-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, 1983.
- BARREIRO, P. et al. Pharmacogenetics of antiretroviral therapy. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 10, n. 8, p. 1119–30, 2014.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, p. 263–265, 2005.
- BATTISTE, J. L. et al. Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1547–51, 1996.
- BAUD, V.; KARIN, M.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. v. 11, n. 9, p. 372–377, 2001.
- BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos. p. 1–220, 2013.
- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335–373, 2003.

CASTELLANO, P.; PREVEDEL, L.; EUGENIN, E. A. HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

CHORIN, E. et al. PBMC of HIV-infected patients contain CD8 T cells that form conjugates with and kill HIV- infected autologous CD4 T cells. **Immunology**, v. 30, n. 1, p. n/a-n/a, 2014.

COELHO, A. V. C. **9P_No Title No Title**. [s.l: s.n.].

CORBEAU, P.; REYNES, J. Review article Immune reconstitution under antiretroviral therapy : the new challenge in HIV-1 infection. **Therapy**, v. 117, n. 21, p. 5582–5590, 2011.

COX, D. G.; CANZIAN, F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 8, p. 738–9, 2001.

CRESSEY, T. R.; LALLEMANT, M. Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 333–342, mar. 2007.

CUBERO, F. J. et al. TNFR1 determines progression of chronic liver injury in the IKK γ /Nemo genetic model. **Cell death and differentiation**, v. 20, n. 11, p. 1–13, 2013.

DE COCK, K. M.; JAFFE, H. W.; CURRAN, J. W. Reflections on 30 years of AIDS. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 6, p. 1044–1048, 2011.

DE PABLO-BERNAL, R. S. et al. TNF- α levels in HIV-infected patients after long-term suppressive cART persist as high as in elderly, HIV-uninfected subjects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 11, p. 3041–3046, 2014.

DOGRA, S.; KHULLAR, G. Tumor necrosis factor- α antagonists: Side effects and their management. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 79, n. 7, p. 35, 2013.

EGGERS, C. et al. HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Journal of Neurology**, v. 264, n. 8, p. 1715–1727, 2017.

FANALES-BELASIO, E. et al. **HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview** *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 2010.

FRAGOSO LONA, J. M. et al. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: Biología molecular y genética. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 149, n. 5, p. 521–530, 2013.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.

GARG, A. V. . et al. The Deubiquitinase A20 Mediates Feedback Inhibition of Interleukin-17 Receptor Signaling. **Sci Signal**, v. 6, n. 278, p. ra44, 2013.

GARG, H.; MOHL, J.; JOSHI, A. HIV-1 induced bystander apoptosis. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 3020–3043, 2012.

GUENZEL, C. A.; HÉRATE, C.; BENICHO, S. HIV-1 Vpr-a still “enigmatic multitasker”. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAR, p. 1–13, 2014.

HAMMER SM, KATZENSTEIN DA, HUGHES MD, GUNDAKER H, SCHOOLEY RT, HAUBRICH RH, ET AL. A Trial Comparing Nucleoside Monotherapy with Combination Therapy in HIV-Infected Adults with CD4 Cell Counts from 200 to 500 per Cubic Millimeter. **N Engl J Med**, v. 335, p. 1081–1090, 1996.

HERBEIN, G. et al. Macrophage signaling in HIV-1 infection. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 34, 2010.

HEYNINCK, K. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-induced necrotic cell death by the zinc finger protein A20. **Anticancer research**, v. 19, n. 4B, p. 2863–2868, 1999.

HULIN-CURTIS, S. L. et al. Evaluation of NFKB1A variants in patients with knee osteoarthritis. **International Journal of Immunogenetics**, p. 272–279, 2013.

HUTCHINSON, J. F. The biology and evolution of HIV. **Annual Review of Anthropology**, v. 30, p. 85–108, 2001.

KARIN, M.; DELHASE, M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. **Seminars in immunology**, v. 12, n. 1, p. 85–98, 2000.

KILMARX, P. H. Global epidemiology of HIV. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 4, p. 240–246, 2009.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KORNBLUTH, R. S. The immunological potential of apoptotic debris produced by tumor cells and during HIV infection. **Immunology Letters**, v. 43, n. 1–2, p. 125–132, 1994.

KOURTIS, A. P.; BULTERYS, M. Mother-to-child transmission of HIV: Pathogenesis, mechanisms and pathways. **Clinics in Perinatology**, v. 37, n. 4, p. 721–737, 2010.

KUERTEN, S. et al. Dissociated Production of Perforin, Granzyme B, and IFN- γ by HIV-Specific CD8⁺ Cells in HIV Infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 24, n. 1, p. 62–71, 2008.

KUMAR, A.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. **Viruses**, v. 6, n. 4, p. 1837–1860, 2014.

LAXMINARAYAN, R. et al. Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project. **Lancet**, v. 367, n. 9517, p. 1193–1208, 2006.

LI, J.; YIN, Q.; WU, H. Structural Basis of Signal Transduction in the TNF Receptor Superfamily. **Advances in immunology**, p. 1–17, 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. 944–951, 2011.

LI, W. et al. Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFkB and MAPK1/3 pathway. **Biology of reproduction**, v. 83, n. 3, p. 481–7, 2010.

LIN, S.-C. et al. Molecular Basis for the Unique De-ubiquitinating Activity of the NF- κ B Inhibitor A20. **J Mol Biol.**, v. 98, n. 4, p. 723–734, 2008.

LINDAHL, E. R. Molecular dynamics simulations. **Methods in Molecular Biology**, v. 443, p. 3–23, 2008.

LUCAS, S.; NELSON, A. M. HIV and the spectrum of human disease. **Journal of Pathology**, v. 235, n. 2, p. 229–241, 2015.

MA, A.; MALYNN, B. A. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. v. 12, n. 11, p. 774–785, 2012.

MBITA, Z.; HULL, R.; DLAMINI, Z. Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-mediated apoptosis: new therapeutic targets. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 3181–3227, 2014.

MENG, X. et al. Molecular Docking : A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. p. 146–157, 2011.

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. 803–833, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em crianças e adolescentes. **Dtr2001.Saude.Gov.Br**, p. <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/>, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde - Brasil**, v. 49, 2018.

MONTESORI, V. et al. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 170, n. 2, p. 229–238, 2004.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. **Molecular Modeling of Proteins**, p. 365–382, 2008.

MUKAI, Y. et al. Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex. v. 3, n. November 2010, 2013.

NOMAGUCHI, M. et al. HIV-1 mutates to adapt in fluxing environments. **Microbes and Infection**, n. September, p. 1–5, 2017.

PANCERA, M. et al. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. v. 107, n. 3, p. 1–6, 2010.

PASQUEREAU, S.; KUMAR, A.; HERBEIN, G. **Targeting TNF and TNF receptor pathway in HIV-1 infection: From immune activation to viral reservoirs** *Viruses*, 2017.

PILLAI, A. K. A. A. H. L. S. **Imunologia celular e Molecular**. [s.l: s.n.]. v. 9

PITRAK, D. L. et al. Apoptosis Pathways in HIV-1-Infected Patients Before and After Highly Active Antiretroviral Therapy: Relevance to Immune Recovery. **AIDS research and human retroviruses**, v. 30, n. 00, p. 1–9, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., 2013.

RITTORE, C. et al. Identification of a new exon 2-skipped TNFR1 transcript: regulation by three functional polymorphisms of the TNFR-associated periodic syndrome (TRAPS) gene. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 1, p. 290–7, 2014.

RUMLOVÁ, M. et al. HIV-1 protease-induced apoptosis. **Retrovirology**, v. 11, n. 1, p. 37, 2014.

S.A.MILLER, D. D. D. AND H. F. P. A simple salting out procedure for extractin DNA from humam nnucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 15, n. 3, p. 1215, 1988.

SAGAN, Carl. Frases de Pensador. Disponível em: <https://www.pensador.com/frase/MzQ5ODI/>. Acesso em: 26 mar 2019.

SÁ, D. M. **MODELOS CARACTERIZANDO A INTERAÇÃO ENTRE AS TOXINAS DA FAMÍLIA CRY1A DE BACILLUS THURINGIENIS E O RECEPTOR BT-R1 DE MANDUCA SEXTA**. 2015.

SCHNEPPLE, D. J. et al. Isolation of a TRAIL antagonist from the serum of HIV-infected patients. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 41, p. 35742–35754, 2011.

SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381–3385, 2003.

SENNIKOV, S. V. et al. **Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type i and type II receptors**. [s.l.] Hindawi Publishing Corporation, 2014.

SESSLER, T. et al. Structural determinants of DISC function: New insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 140, n. 2, p. 186–199, 2013.

SHEMBADE, N.; HARHAJ, E. W. A20 inhibition of NF- κ B and inflammation: Targeting E2:E3 ubiquitin enzyme complexes. **Cell Cycle**, v. 9, n. 13, p. 2481–2482, 2010.

SHI, X. et al. Beneficial effect of TNF- α inhibition on diabetic peripheral neuropathy. **Journal of neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 69, 2013.

SHIBATA, Y. et al. p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. **Nature Communications**, v. 3, p. 1061, 2012.

SILVA, R. C. DA. **Distribuição de Polimorfismos de Base Única (SNPs) em Genes**

Relacionados à Infecção pelo HIV-1 em uma População do Nordeste Brasileiro. [s.l: s.n.].

STANLEY, B. J. et al. Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. **Journal of virology**, v. 82, n. 17, p. 8656–63, 2008.

TANG, M. W.; SHAFER, R. W. HIV-1 antiretroviral resistance: Scientific principles and clinical applications. **Drugs**, v. 72, n. 9, p. 1–25, 2012.

TOKUNAGA, F. et al. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. **The EMBO journal**, v. 31, n. 19, p. 3856–70, 2012.

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

UNAIDS. How AIDS Changed Everything. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2015.

UNAIDS. Prevention Gap Report 2016. **Unaid**s, p. 286, 2016.

UNAIDS. KNOWLEDGE IS POWER. 2018.

VALDIVIA, A. et al. Restoring Cytokine Balance in HIV-Positive Individuals with Low CD4 T Cell Counts. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 00, n. 00, p. aid.2016.0303, 2017.

VALERIANO, J. J. DE L. S. **Polimorfismos genéticos associados a efeitos adversos neuropsiquiátricos em pacientes HIV positivos submetidos à terapia com Efavirenz Recife Josué Jeyzon de Lima Soares Valeriano Polimorfismos genéticos associados a efeitos adversos neuropsiquiátricos em.** [s.l: s.n.].

VELLA, S. et al. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. **Aids**, v. 26, n. 10, p. 1231–1241, 2012.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular.** [s.l: s.n.]. v. 53

VIJAYAN, K. V. et al. Pathophysiology of CD4+ T-Cell depletion in HIV-1 and HIV-2 infections. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, p. 1–8, 2017.

WATTS, J. M. et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 711–716, 2009.

WERSOM, E. S. S. . et al. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. **Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**, p. 5–55, 2013.

WU, J. N. AND H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. **Annu Rev Biophys.**, p. 443–468, 2013.

XU, F. et al. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e101138, 2014.

ZIDI, S. et al. Tumor Necrosis Factor Alpha (–238 / –308) and TNFRII-VNTR (–322) Polymorphisms as Genetic Biomarkers of Susceptibility to Develop Cervical Cancer Among Tunisians. **Pathology and Oncology Research**, v. 21, n. 2, p. 339–345, 2015.

APÊNDICE A - PROTOCOLO DE ESTUDO – REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

Número de Registro no **International Prospective Register Of Systematic Reviews**: CRD42019118602

A STUDY PROTOCOL

Cell death and immune failure correlation in global HIV-infected patients: a systematic review

Objective:

To estimate mechanisms involved in HIV-1 pathogenesis that implicated in the increase of one principal cell death type as a justification for the existence of poor immunologic reconstitution of critical patients (nonresponders) in regular ART.

Research Questions:

- 1- What are the major mechanisms activated in CD4 + and CD8 + T lymphocytes from HIV-1 infected individuals which stimulate cell death pathway?
- 2- What type of induced cell death by the activation of these mechanisms can be considered the main?

Population:

Immunologic nonresponders (NR) patients in antiretroviral therapy treatment or cell cultured obtained from these patients

Interventions:

Response to antiretroviral therapy, infection progression, immunological mechanisms and/or co-infections.

Control:

Immunologic responders (IR) patients in antiretroviral therapy treatment or cell cultured obtained from these patients and healthy controls.

Outcome:

Cell death and cytokines pathways, HIV-1 pathogenic mechanisms and cell immune mechanisms to assess the immune landscape of nonresponders and responders patients.

Study Design:

Determination of a main cell death type that may substantiate the immunological failure of a portion of individuals undergoing effective antiretroviral therapy.

Electronic Databases:

PubMed, BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) and SciELO. **Languages:**

English and Portuguese.

Publication Date:

Studies published on or after January 2003.

Inclusion criteria for article selection:

- Article published in English or Portuguese languages;
- The article is an original report;
- Presence of the complete article available in the databases;
- Article published on or after January 2003;
- Study inserted on the HIV cell death and pathogenesis contexts.

Preliminary selection process of studies:

To construct a search string from the combination of the words: hiv AND haart AND “cell death types (28 terms based on Nomenclature Committee on Cell Death guidelines)” AND immune reconstitution.

Terms
“apoptosis”
“necrosis”
“pyroptosis”
“accidental cell death”
“acd”
“anoikis”
“cell death”
“cellular senescence”
“efferocytosis”
“entotic cell death”
“extrinsic apoptosis”
“ferroptosis”
“immunogenic cell death”
“intrinsic apoptosis”
“lysosome-dependent cell death”
“mitochondrial permeability transition (mpt)-driven necrosis”
“mitotic catastrophe”
“mitotic death”
“necroptosis”
“netotic cell death”
“parthanatos”
“programmed cell death”
“pcd”
“regulated cell death”
“rcd”

Terms definitions available on Galluzzi et al., 2018 (GALLUZZI et al., 2018).

Reviewers will read the abstracts. Studies that present relevant content will be selected for full text reading. The data collected from the studies that meet the selection criteria will be included in the systematic review driving sheet. The repeated studies will be documented once only.

Final selection process of studies:

Reviewers will document study data (PMID, DOI, title, authors, kind of study/methodology, study theme, association or not to cell death and conclusions) in the review driving sheet.

Results Summary:

The relevant collected data from the selected articles will be grouped into a table.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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 obterá 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	

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 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO IMIP – PE

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

PERSPECTIVAS

Nossa perspectiva inclui determinar formas de dar continuidade às análises de interação molecular proteína-proteína nas vias dos receptores de ativação e morte celular (TNFR1, TNFR2 e Fas) como um todo.