



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

JOSÉ LEANDRO DE ANDRADE SANTOS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA VIA DA PIROPTOSE NA FALHA
IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS VIVENDO COM O HIV-1 EM TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL**

Recife

2018

JOSÉ LEANDRO DE ANDRADE SANTOS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA VIA DA PIROPTOSE NA FALHA
IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS VIVENDO COM O HIV-1 EM TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C Barros (CRB4/1728)

Santos, José Leandro de Andrade

Avaliação da influência da via da piroptose na falha imunológica em indivíduos vivendo com o HIV-1 em terapia antirretroviral / José Leandro de Andrade dos Santos- 2018.

135 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rafael Lima Guimarães

Coorientador: Ronaldo Celerino da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Imunogenética 2. AIDS 3. Falha terapêutica I. Guimarães, Rafael Lima (orient.) II. Silva, Ronaldo Celerino da (coorient.) III. Título

571.9648

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-039

JOSÉ LEANDRO DE ANDRADE SANTOS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA VIA DA PIROPTOSE NA FALHA
IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS VIVENDO COM O HIV-1 EM TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL**

Aprovado em 31/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos André Bezerra Cavalcanti (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Michelly Cristiny Pereira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2018

Aos pacientes
soropositivos que se
disponibilizaram
voluntariamente a
participar deste estudo,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, na minha intimidade, por ter me dado Ciência sempre em todas as decisões ao longo da vida, me ajudando a enfrentar todos os obstáculos e tornando possível a chegada até aqui.

À minha mãe, Helena, por ter me dado o dom da vida, e ter cuidado com tanto carinho, amor e dedicação, ajudando, assim, na formação do que sou hoje. Por todas as dificuldades enfrentadas juntos, e que não foram poucas, mas que hoje são lembradas por nós como motivo de vitória.

Aos meus irmãos Laryssa e Leonardo, por todos os momentos de descontração, de risos, de choro, de apoio, e que apesar de todos os pesares, seguimos juntos formando essa família linda. E a minha irmã de coração, Aline, por estar desde sempre e sempre, torcendo e vibrando a cada sucesso, chorando e amparando a cada queda, mas sempre juntos.

À minha avó Maria, meus avôs João e José, e meu padrasto Reginaldo por todo o amor, carinho, presença e torcida a mim dedicados.

Aos tios (as) e primos (as), por sempre se fazerem presentes nessa jornada traçada.

Às famílias Santos, Medeiros da Costa, Abath Cardoso Barreto, Ferreira de Souza e Cavalcanti Lima por tanta torcida, estímulo, confiança, e momentos memoráveis compartilhados.

Ao meu orientador, Rafael Guimarães, pela oportunidade a mim disponibilizada, por confiar em mim e no meu trabalho, ao qual tenho grande apreço, e sempre terei como exemplo de profissional a ser seguido.

Ao coorientador, Ronaldo, por me acompanhar durante esse período, estando sempre presente e oferecendo os ensinamentos necessários.

Aos Professores Emmanuel Pontual, Thiago Napoleão e Lidiane Albuquerque por me abrirem as portas ao mundo científico, e me ajudarem a dar os primeiros passos nesse ciclo que mais uma vez se conclui, mas que não simboliza um fim.

Às muitas amizades que foram construídas nesta universidade, e que por mais que um dia cheguemos a nos distanciar, a vivência compartilhada sempre permanecerá na lembrança, as quais não posso deixar de citar: Caio, Wiviane, Adriana, Natália, Leydianne, Gustavo, Victor, Luanna, Mário, Raquel, Adryelle,

Bárbara, Thais, Jeanne, Mateus, Marília, Fernanda, Everton, Victor P., Geilza, Marianny, Jéssica, Denise, Moezio e Thuanny.

Aos muitos amigos e colegas que me acompanharam, e estiveram disponíveis a me ajudar no que precisasse, comemorando comigo cada etapa conquistada. Destaco aqui, Alexsandra, Luan, Paloma, Eloyze, Henrique, Jéssica e Zé, que independente de tempo e por onde andamos, foram essenciais em muitas coisas da vida, e de essência a gente não pode fugir nunca.

Aos companheiros de laboratório Wlisses, Jessyca e Carol que se tornaram também de vida, por estarmos juntos sempre, partilhando experiências, conhecimento, ajudando um ao outro nos questionamentos do dia a dia, e por todos os momentos de descontração que tivemos.

Aos demais integrantes do grupo PatGen, pela dinâmica diária que vivemos no laboratório, as trocas de conhecimento, por todo o aprendizado fornecido e que foram essenciais na minha formação profissional.

À turma de Mestrado e Doutorado de 2017.1 por todo o apoio durante as disciplinas, pela ajuda mútua difícil de se observar hoje em dia, as discussões científicas que contribuíram para cada passo nesse percurso, e ao coleguismo de sempre, que fizeram o sucesso da turma.

As parcerias firmadas no IMIP, sobretudo a Ana, por toda a paciência, carinho, força, confiança e solidariedade passadas (não podendo esquecer do café diário!). Apenas quem tem um bom coração consegue desempenhar um trabalho na excelência realizada por ela, no cuidado a cada paciente, nas palavras de força direcionadas a eles. Que o nome Ana siga sendo sinônimo de humanização para o hospital Dia, a Saúde precisa disso.

Ao setor do LIKA por toda a infraestrutura oferecida, bem como seus funcionários e demais alunos que contribuíram para a conclusão deste estudo. Aos órgãos de fomento FACEPE e CNPq.

E a todos que não foram citados aqui, mas que de forma direta ou indireta sempre torceram por mim, e contribuíram para que este momento pudesse se concretizar.

Muito obrigado a todos!

“A vida, portanto, pode ser considerada uma reação em cadeia do DNA”

Sam Kean¹

¹ KEAN, S. O polegar do Violinista e outras histórias da genética sobre amor, guerra e genialidade. Editora Zahar, v. 1, p.4, 2013.

RESUMO

A falha imunológica em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) decorre da não recuperação de células T CD4+, mesmo nos indivíduos que apresentam carga viral baixa. A morte celular exacerbada apresenta-se como um dos principais mecanismos de falha, sendo a piroptose a principal via de morte observada no processo de infecção pelo HIV-1. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da morte celular por piroptose na falha imunológica de indivíduos HIV-1 positivos submetidos à terapia antirretroviral. Foram recrutados 248 pacientes. Variantes em cinco genes da via da piroptose foram avaliadas por genotipagem utilizando sondas Taqman. Variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos indivíduos foram consideradas para associação. A imunofenotipagem das células foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que os polimorfismos rs10754558 (*NLRP3*), rs2043211 (*CARD8*), rs1143634 (*IL1B*) e rs6940 no gene *IFI16* não demonstraram associação com a falha imunológica. O polimorfismo rs187238 (*IL18*) demonstrou associação do alelo C ($p < 0,001$) e do genótipo CC ($p = 0,009$) com proteção ao desenvolvimento de falha imune na população analisada. A contagem de células T CD4+ < 350 céls/μL apresentou-se associada com o risco de falha imune ($p < 0,001$). A análise imunofenotípica não apresentou associação estatística da piroptose entre os grupos, tanto das células T CD4+ gerais quanto das células T CD4+ recém emigradas do timo. Porém, observou-se que o grupo caso possui um maior nível de morte por piroptose que nos indivíduos controles. Estes resultados podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos que podem levar à falha imunológica, servindo de auxílio para pesquisas futuras.

Palavras-Chave: AIDS. Imunogenética. Morte celular. Falha terapêutica.

ABSTRACT

Immunological failure in patients with Acquired Immunodeficiency Virus (HIV) is due to non-recovery of CD4⁺ T cells, even in individuals with low viral load. Exacerbated cell death is one of the main mechanisms of failure, with pyroptosis being the main pathway of death observed in the HIV-1 infection process. The aim of the study was to evaluate the influence of pyroptosis cell death on the immunological failure of HIV-1 positive subjects undergoing antiretroviral therapy. A total of 248 patients were recruited. Variants in five genes of the pyroptosis pathway were evaluated by genotyping using Taqman probes. Clinical, epidemiological and laboratory variables were considered for association. Immunophenotyping of the cells was assessed by flow cytometry. The results demonstrated that the polymorphisms rs10754558 (*NLRP3*), rs2043211 (*CARD8*), rs1143634 (*IL1B*) and rs6940 in the *IFI16* gene showed no association with the immunological failure. The polymorphism rs187238 (*IL18*) showed association of the C allele ($p < 0.001$) and the CC genotype ($p = 0.009$) with protection against the development of immune failure in the analyzed population. The CD4⁺ T cell count < 350 cells/ μ L was associated with the risk of immune failure ($p < 0.001$). The immunophenotypic analysis did not present statistical association of pyroptosis between the groups, both of the general CD4⁺ T cells and of the newly emigrated CD4⁺ T cells of the thymus. However, it was observed that the case group had a higher level of pyroptose death than controls. These results may contribute to a better understanding of the mechanisms that may lead to the immunological failure, serving as an aid to future research.

Keywords: AIDS. Immunogenetics. Cell death. Therapeutic failure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	— Número de pessoas vivendo com HIV, entre os anos de 1990 e 2016	24
Figura 2	— Dados de cobertura da meta 90-90-90, por região, no ano de 2016 ..	28
Figura 3	— Esquematização filogenética do HIV	31
Figura 4	— Estrutura Morfológica do HIV	33
Figura 5	— Estrutura Genética do HIV-1.....	35
Figura 6	— Ciclo do HIV-1.....	40
Figura 7	— Reconhecimento e fusão do vírus	41
Figura 8	— Progressão clínica da infecção pelo HIV-1	44
Figura 9	— Mecanismo de ação das drogas TARV	47
Figura 10	— Vias de morte celular	56
Figura 11	— Dinâmica de ativação da caspase. Adaptado de (MIAO, 2011).....	61
Figura 12	— Ativação, desencadeamento e execução da piroptose.....	63
Figura 13	— Mecanismo das células permissivas e não-permissivas a infecção pelo HIV-1	65
Figura 14	— Mecanismo geral da piroptose na problemática do HIV-1	67
Figura 15	— Localização e estrutura do gene <i>NLRP3</i>	69
Figura 16	— Localização e estrutura do gene <i>CARD8</i>	72
Figura 17	— Localização e estrutura do gene <i>IL1B</i>	73
Figura 18	— Localização e estrutura do gene <i>IL18</i>	75
Figura 19	— Localização e estrutura do gene <i>IFI16</i>	76
Figura 20	— <i>Dot plot</i> por densidade da região dos linfócitos com aumento de 1000 vezes	94
Figura 21	— Populações celulares avaliadas.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Indicadores epidemiológicos da AIDS por regiões do Brasil.....	26
Tabela 2 — Dados atualizados da Meta 90-90-90 para o Brasil, América Latina e Mundo.	28
Tabela 3 — Medicamentos fornecidos pelo SUS aos pacientes soropositivos.	48
Tabela 4 — Frequência alélica mínima dos SNPs selecionados para o estudo.....	81
Tabela 5 — Marcadores e populações celulares avaliadas.	85
Tabela 6 — Testes de associação com as variáveis demográficas, epidemiológicas e clínicas (teste Exato de Fisher, exceto para peso, idade e tempo de início da terapia).	89
Tabela 7 — Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos avaliados entre casos e controles.	91
Tabela 8 — Variáveis utilizadas no modelo de regressão logística para explicar a ocorrência de falha imunológica.	93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
ACD	Morte celular accidental
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AIM-2	<i>Absent in Melanoma 2</i> ou <i>Interferon-inducible protein</i>
ALR	<i>AIM2-like receptors</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>
3G	
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
AZT	<i>Azidothymidine</i>
BBVs	<i>Bloodbone viruses</i>
CARD	Domínio de Ativação e Recrutamento de Caspase
CARD8	Domínio de Ativação e Recrutamento de Caspase tipo 8
CCR5	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CD4+	<i>Cluster of differentiation 4 positive</i>
CD8+	<i>Cluster of differentiation 8 positive</i>
CMV	Citomegalovírus
CRFs	<i>Circulating Recombinant Forms</i>
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DMRs	Mutações de Resistência a Drogas
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DR	<i>Death Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FI	Falha Imunológica
FIIND	<i>N-terminal domain function to find</i>
gp120	Glicoproteína 120

gp41	Glicoproteína 41
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i>
HIV-2	<i>Human Immunodeficiency Virus type 2</i>
IC	Intervalo de Confiança
IF	Inibidor de Fusão
IFI16	<i>Gamma-interferon-Inducible Protein type 16</i> ou <i>Interferon-inducible Myeloid Differentiation Transcriptional Activator</i>
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INI	Inibidor de Integrase
INNTR	Inibidor Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa
INRs	Não Respondedores Imunológicos
INTR	Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa
IP	Inibidor de Protease
IP/r	Inibidor de Protease/ ritonavir
kD	kDalton
LFA-1	<i>Integrin Leukocyte Function-association Antigen 1</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
mm ³	Milímetro(s) Cúbico(s)
mL	Mililitro(s)
NF-κβ	Fator Nuclear Kappa Beta
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD-like Receptor Family</i>
NLRP3	<i>NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3,</i>
NLRPC4	<i>NOD-like Receptor Family, CARD domain containing protein 4</i>
nm	Nanômetro(s)
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>

PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
pb	Pares de bases
PCD	Morte Celular Programada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVHA	Pessoas que vivem com HIV/AIDS
PYD	<i>Pyrin Domain</i>
RCD	Morte Celular Regulada
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SIV _{cpz}	<i>Simian Immunodeficiency Virus chimpanzee</i>
SIV _{cm}	<i>Simian Immunodeficiency Virus capped-Mangabey</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TARV	Terapia Antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de Célula T
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TR	Transcriptase Reversa
TRIM	<i>Tripartite Motif Family</i>
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
VDLR	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral.....	18
1.1.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)	20
2.1.1	Histórico	20
2.1.2	Epidemiologia	23
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO – HIV-1	29
2.2.1	Aspectos Filogenéticos	29
2.2.2	Aspectos Morfológicos	33
2.2.3	Aspectos Genéticos	34
2.2.4	Transmissão	35
2.2.5	Ciclo do HIV-1	39
2.2.6	Patogênese	42
2.3	ANTIRRETROVIRAIS	45
2.3.1	Terapia Antirretroviral (TARV).....	45
2.3.2	Sucesso e Falha terapêuticos	50
2.3.3	Falha Imunológica.....	52
2.4	MORTE CELULAR	55
2.4.1	Vias de Morte Celular	55
2.4.2	Piroptose: uma via de morte celular altamente inflamatória	59
2.4.3	Papel da piroptose na infecção pelo HIV-1	64
2.4.4	Genes e proteínas da via da piroptose	68
2.4.4.1	<i>NLRP3</i>	68
2.4.4.2	<i>CARD8</i>	71
2.4.4.3	<i>IL1β</i>	73
2.4.4.4	<i>IL18</i>	74
2.4.4.5	<i>IFI16</i>	76
3	METODOLOGIA	79
3.1	DESENHO DE ESTUDO E SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS	79
3.2	CLASSIFICAÇÃO QUANTO A FALHA/SUCESSO IMUNOLÓGICO	80
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA	80

3.4	SELEÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPS).....	81
3.5	GENOTIPAGEM.....	82
3.6	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS)	82
3.7	CONTAGEM E VIABILIDADE DAS CÉLULAS.....	83
3.8	IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	84
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	86
4	RESULTADOS.....	88
4.1	ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E LABORATORIAL	88
4.2	ANÁLISE GENOTÍPICA	90
4.3	ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA.....	92
4.4	ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA	93
5	DISCUSSÃO	96
6	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS.....	104
	ANEXOS	124
	ANEXO A – ARTIGOS SUBMETIDOS.....	124
	ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP...125	
	ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	126
	ANEXO D – QUESTIONÁRIOS E FORMULÁRIOS DE ACOMPANHAMENTO	129

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) desde o início da sua epidemia apresenta índices significativos de morbimortalidade em todo o mundo, necessitando, assim, de uma extrema atenção social, política e econômica, por se apresentar como um problema de saúde pública.

Atualmente, apesar de números ligados à infecção sempre serem epidêmicos, muito se evoluiu, uma vez que as pesquisas envolvendo o HIV-1 possibilitaram um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos do vírus, promovendo assim o desenvolvimento da terapia antirretroviral. O objetivo principal da terapia é a diminuição da carga viral a níveis considerados indetectáveis, vindo a contribuir para uma melhor expectativa de vida dos pacientes infectados. Mesmo com a terapia antirretroviral, alguns aspectos envolvendo a falha terapêutica ainda são desconhecidos.

Um destes aspectos é o fato de que entre 15% a 30% dos pacientes, que conseguem a redução da carga viral, não conseguem obter um ganho das células T CD4+, constituindo o grupo dos indivíduos em falha imunológica. Este fato é considerado contraditório, uma vez que com menos vírus circulante, espera-se menos células infectadas e, conseqüentemente, aumento da contagem dos linfócitos. Apesar de ser considerada multifatorial, duas características têm se mostrado associadas à falha, sendo elas a redução na síntese de novas células e a morte celular exacerbada.

Inicialmente, acreditava-se que a depleção de células T CD4+ durante o processo de infecção pelo HIV-1 e a progressão para a AIDS ocorria devido a um efeito citopático em consequência de uma infecção produtiva nas células. No entanto, estudos *in vitro* mostraram que apenas 5% das células que morrem são

permissivas à infecção viral, e acabam gerando infecções abortivas, culminando na morte por apoptose, sendo os demais 95% derivados de uma outra via de morte celular, a piroptose.

A piroptose é uma forma de morte celular programada, altamente inflamatória, que ocorre mais frequentemente após a infecção com patógenos intracelulares. Todo o mecanismo por trás desse tipo de morte é estreitamente regulado por mecanismos genéticos que determinam a expressão de genes relacionados com a ativação e bloqueio da morte celular por piroptose.

Nesse contexto, a piroptose como possível causa da falha imunológica apresenta-se bastante justificável, dada a sua importância na destruição de células T CD4+ durante o processo de infecção. Além disso, o fato de que a exacerbação da ativação desta via pode agudizar a destruição destas células, promovendo a progressão dos indivíduos para a AIDS, faz com que a análise de polimorfismos que possam estar relacionados com esse aumento torne-se necessária, dada a influência genética no controle da morte celular.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da via de piroptose e sua possível associação com a falha imunológica em indivíduos vivendo com HIV-1 em terapia antirretroviral.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência dos índices clínicos e epidemiológicos dos indivíduos vivendo com HIV-1 na ocorrência da falha imunológica;

- Avaliar a possível associação dos polimorfismos nos genes *NLRP3* (rs10754558), *CARD8* (rs2043211), *IL1B* (rs1143634), *IL18* (rs187238) e *IFI16* (rs6940) na susceptibilidade à falha imunológica;
- Comparar níveis de piroptose em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos HIV-1 em falha e sucesso imunológico, indicando se há associação com a falha imunológica;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

2.1.1 Histórico

Entre o final da década de 70 e o início dos anos 80, foi relatado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos que cinco indivíduos jovens, previamente saudáveis, todos homossexuais, apresentavam pneumonia causada por um agente comum, o *Pneumocystis carinii*. Associada a essa infecção, estavam outras comorbidades, como: o citomegalovírus, a candidíase mucocutânea e o sarcoma de Kaposi. Ainda na mesma época, foram também relatados casos de infecções em indivíduos que faziam uso de drogas injetáveis, colocando em questionamento o que poderia estar causando estes quadros clínicos. Em comum, ambos os grupos tinham uma severa depressão do sistema imune (CDC, 1982a; MASUR et al., 1981; WOROBEY et al., 2016).

Muito se especulava em torno do contato homossexual ainda como única forma de contágio pelo desconhecido agente imunossupressor, porém, surgiram então os primeiros relatos de hemofílicos e haitianos infectados, desfocando a relação homoafetiva como única forma de infecção (CDC, 1982b, 1982c; FORSTEIN, 2013).

Com o passar do tempo e a expansão de novos casos, indivíduos de países europeus também começaram a desenvolver o quadro, apontando a disseminação do agente pelo mundo. Consecutivamente, indivíduos heterossexuais, que receberam transfusões sanguíneas e profissionais da saúde que sofreram acidentes ocupacionais também foram associados à infecção. Com a primeira infecção de uma criança, após muitas especulações, chegou-se à conclusão que

havia possibilidade da transmissão vertical (CDC, 1983; ROZENBAUM et al., 1982; VILASECA et al., 1982)

O CDC decide, em 1982, nomear a desconhecida doença, determinando o termo Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), para se referir a depressão do sistema imune associada a maior susceptibilidade de desenvolver infecções oportunistas e outras doenças. Os anos seguintes foram de uma incessante busca da comunidade científica, por respostas visando elucidar os mecanismos envolvidos na AIDS, principalmente o agente etiológico, a questão mais intrigante para os pesquisadores (CDC, 1982d).

O Instituto Pasteur, da França, saiu na frente nas pesquisas identificando um vírus que nomearam *Lymphadenopathy-Associated Virus* como sendo o causador da AIDS. Por sua vez, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos também anunciou ter achado um provável agente infectante, o *Human T-lymphotropic virus III*. Após análises genéticas dos dois possíveis agentes etiológicos, conclui-se que ambos eram geneticamente semelhantes, tratando-se do mesmo vírus. Posteriormente, em 1986, foi visto que se estava diante de um novo retrovírus, ficando estabelecido pela Comissão Internacional para a Taxonomia dos Vírus que se chamaria Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; CASE, 1986; GALLO et al., 1984).

A explicação de sua origem, a sua clonagem e a obtenção de sua informação genômica foram avanços de suma importância para que se chegasse a toda gama de conhecimento atual sobre o HIV e o desenvolvimento da terapia antirretroviral (BADER et al., 2006; BARRE-SINOUSSE; ROSS; DELFRAISSY, 2013; LOS ANGELES TIME, 1996; PARSONS et al., 2006).

Após o isolamento e a compreensão dos mecanismos aos quais o vírus estava envolvido, deu-se início a busca por drogas que o combatessem, sendo as primeiras pesquisas repletas de tentativas sem êxito. Em 1987, disponibilizou-se o primeiro fármaco utilizado no tratamento contra o HIV-1, a Zidovudina ou Azitomidina (AZT), um Inibidor Nucleosídico da Transcriptase Reversa (INTR), sendo utilizado por diversos anos em como única droga terapêutica no combate à infecção. Além de INTRs, foram sendo desenvolvidos outros grupos de fármacos ao longo do tempo, como os Inibidores de Protease (IPs) e Inibidores Não-Nucleosídicos da Transcriptase Reversa (INNTRs), porém todos utilizados em esquema de monoterapia, o que trazia muitas limitações no tratamento, sendo a principal delas o desenvolvimento de resistência genética do vírus a mesma (AIDSINFO, 1987; BARRE-SINOUSI; ROSS; DELFRAISSY, 2013; MONTANER et al., 1998).

Observou-se então que, quando as classes de antirretrovirais eram combinadas, a supressão viral e o aumento no quantitativo de linfócitos T CD4+ (do inglês *thymus-derived lymphocytes* e *cluster of differentiation*) eram significativos. Assim, esquemas terapêuticos formados por mais de uma classe de medicamentos antirretrovirais eram mais indicados, originando assim o conceito de terapia antirretroviral altamente efetiva (HAART, do inglês, *Highly Active Antiretroviral Treatment*). A doença, que podia levar a morte, passou então a ser considerada uma síndrome de caráter crônico, em que há uma maior expectativa de sobrevivência para os indivíduos, desde que recebam terapia antirretroviral (TARV) e sigam todas as recomendações médicas, com uma adesão ao tratamento também satisfatória (HIRSCH et al., 1998; PALELLA et al., 1998; POLIS et al., 2001).

Apesar dos avanços na tentativa de encontrar mecanismos que debelem o vírus, a cura da AIDS continua sendo uma meta para os cientistas. Muitos questionamentos ainda estão sem respostas, necessitando cada vez mais de discussões sobre o tema, para que a terapia antirretroviral seja cada vez mais eficiente na redução da viremia, com o mínimo de efeitos adversos possíveis (BARRE-SINOUSI; ROSS; DELFRAISSY, 2013; MALATINKOVA et al., 2015; PALMISANO; VELLA, 2011).

2.1.2 Epidemiologia

De acordo com a Junta das Nações Unidas para HIV-AIDS (UNAIDS), em seu relatório anual divulgado em 2017, com dados referentes ao ano de 2016, a estimativa é de que existam 36,7 milhões de casos de pessoas vivendo com HIV em todo o mundo, onde foram relatados 1,8 milhões de novas infecções, e um total de 1 milhão de mortes por causas relacionadas à AIDS (UNAIDS, 2017a).

Embora os números sejam considerados elevados dentro do contexto da AIDS (Figura 1), a análise comparativa entre os anos de 2010 a 2016 aponta uma redução de aproximadamente 16% no número de novas infecções, o que pode ser considerado bastante significativo, dado o padrão epidêmico da síndrome. Partindo da redução no número de óbitos, o *report* da Organização Mundial de Saúde traz que entre os anos de 2005 e 2016, o número de óbitos foi reduzido em 48% (UNAIDS, 2017a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

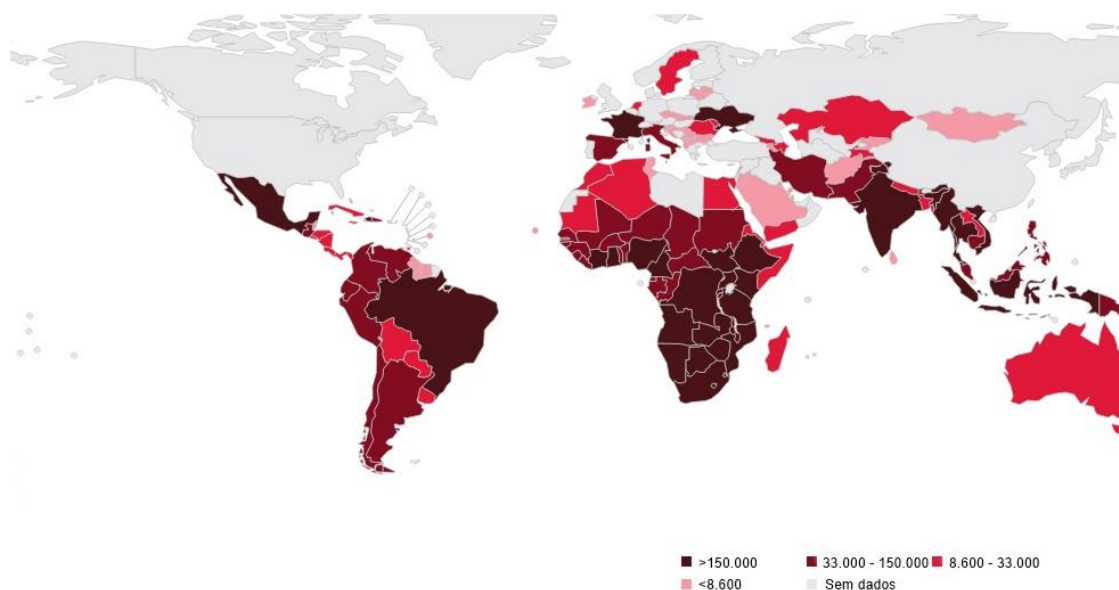


Figura 1. Número de pessoas vivendo com HIV, entre os anos de 1990 e 2016. Adaptado de <http://aidsinfo.unaids.org/> (Acesso em 25/05/2018)

A análise global envolvendo os grupos de risco, em regiões com epidemia concentrada, mostra que entre a maior parte das novas infecções, figuram homens gays e homens que fazem sexo com outros homens (12%), usuários de drogas injetáveis (8%) e profissionais do sexo (5%). Tais números, devem-se muito ao estigma social sofrido por eles, havendo até países que possuem leis que os criminalizam, fazendo com que o acesso a prevenção seja limitado (UNAIDS, 2017a).

Ainda nesse aspecto, um dado que tem chamado bastante atenção, a transmissão entre heterossexuais está sendo responsável pela maioria das infecções pelo HIV-1 em todo o mundo, com uma diminuição nos considerados grupos de risco, diferente do início da epidemia (SHAW; HUNTER, 2012; UNAIDS, 2017a).

Mulheres, entre 15 e 24 anos, tem se apresentado como um grupo, crescente, de alto risco para novas infecções entre os anos de 2010 e 2015, principalmente na Europa, nas Américas e no Oeste Mediterrâneo. Quando

comparados homens e mulheres da mesma faixa etária, o número de novas infecções foi 44% maior em mulheres que em homens. Apesar deste valor elevado, a porcentagem de novos casos nesta mesma faixa etária vem diminuindo consideravelmente, chegando a 16% e 17% em indivíduos do sexo masculino e feminino, respectivamente, entre os anos de 2010 e 2016 (UNAIDS, 2017a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Na América Latina, estima-se que o número de indivíduos infectados seja de aproximadamente 1,8 milhões. Ainda neste contexto, o relatório da UNAIDS por regiões do mundo traz que o número de novas infecções na América Latina chegou a 97.000 e o número de óbitos a 36.000 tendo a AIDS como causa base.

O Brasil é o país mais populoso da América Latina, sendo também o que concentra mais casos de infecções pelo HIV-1, chegando a quase metade deles (49%) (UNAIDS, 2015a, 2017a). Desde o início da epidemia, na década de 80, até junho de 2017, foram notificados aproximadamente 882.000 casos de AIDS no Brasil. De maneira geral, a crescente dos números epidemiológicos do HIV-1 no Brasil tem se mantido estável, tendo uma média de 40 mil novos casos nos últimos cinco anos. No ano de 2016, o número de novas infecções chegou a 48.000, a incidência a cada 1.000 pessoas é de 0,24; o número de óbitos foi de 14.000 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017; UNAIDS, 2017a).

A distribuição por regiões do país, entre 1980 e junho de 2017, mostra que há uma concentração no caso dos números de AIDS no Sudeste (52,3%) e no Sul (20,1%), seguidos da região Nordeste (15,4%), Centro-Oeste (6,1%) e Norte (6,0%). A taxa de detecção de casos de AIDS no Brasil vem sofrendo um considerado declínio. Em 10 anos (2006-2016) ocorreu uma diminuição de 5,1% nos casos. De maneira geral, a região Centro-Oeste pouco variou nesse mesmo

período, enquanto as regiões Sul e Sudeste vêm apresentando uma queda, saindo de 23,5 e 30,2 em 2006 para 17,3 e 25,3 casos/100 mil hab. em 2016. Em contrapartida, as regiões Norte e Nordeste vem apresentando um aumento, saindo de 14,9 e 11,2, respectivamente, em 2006, para 24,8 e 15,2 casos por 100 mil hab, respectivamente, em 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017).

Quanto a taxa de mortalidade, tendo a AIDS como causa base, o país, particularmente as regiões Sul e Sudeste, tiveram uma considerável diminuição nos últimos anos; enquanto as regiões Nordeste e Centro-Oeste tiveram um aumento, e a região Norte se manteve constante nesse índice (Tabela 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2016).

Tabela 1. Indicadores epidemiológicos da AIDS por regiões do Brasil.

Indicadores	Brasil	Sudeste	Sul	Nordeste	Norte	Centro-Oeste
Casos diagnosticados*	882.810	461.988	177.327	136.290	54.190	53.006
Taxa de detecção*	18,5	17,3	25,3	15,2	24,8	16,7
Óbitos*	316.088	188.340	55.681	41.065	14.749	16.250
Coeficiente de Mortalidade	5,2	5,0	6,7	4,2	7,1	4,4

*Valores compreendem o período de 1980 a 2016

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2017)

O Estado de Pernambuco ocupa o 7º lugar no ranking nacional de casos de AIDS, de acordo com os registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), com 6.937 casos, entre os anos de 2007 e 2017. O número de óbitos, neste mesmo período, foi de 10.967, sendo o primeiro no ranking entre os estados do Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2016).

A cidade do Recife apresentou um aumento na taxa de detecção passando de 34,5/100 mil habitantes em 2015, para 36,7/100 mil habitantes em 2016, ficando em 8º lugar no ranking das capitais do país. O coeficiente de mortalidade foi de

11,1, o que também apresenta um aumento quando comparado a 2015 (9,5), colocando-a em 13º lugar no ranking das capitais (Brasil/ Ministério da Saúde 2015).

Apesar da oscilação entre os variados índices epidemiológicos, e a variabilidade deles quanto aos continentes, países ou regiões, avanços vem se apresentando nas estatísticas envolvendo a infecção pelo HIV-1. A UNAIDS defende que, como 51% dos indivíduos com HIV são mulheres, existe uma tendência, visto que mulheres possuem uma melhor adesão à terapia, de um declínio significativo nestes índices. Além disso, a elevada cobertura da terapia antirretroviral em quase todo o mundo faz com que cada vez mais as novas infecções sejam diminuídas (UNAIDS, 2017a).

Muito disso deve-se ao desenvolvimento de políticas públicas como a “Meta 90-90-90” que busca até 2020, a quase erradicação das infecções pelo HIV-1 (90%), baseada em três pilares: o primeiro deles sendo o diagnóstico adequado e preciso, em seguida que estas pessoas diagnosticadas estejam em terapia, e por fim que a terapia esteja sendo eficaz, estando os indivíduos com níveis de carga viral indetectáveis. A figura 2 traz o progresso da meta entre as regiões do mundo. Nota-se que regiões mais desenvolvidas, como o Oeste e Centro Europeus, junto com a América do Norte apresentam um excelente desempenho, enquanto que regiões subdesenvolvidas e mais epidêmicas como as regiões do Oeste da África e a África Central, apresentam-se aquém do que se esperava para a meta (UNAIDS 2015b; UNAIDS 2017b).

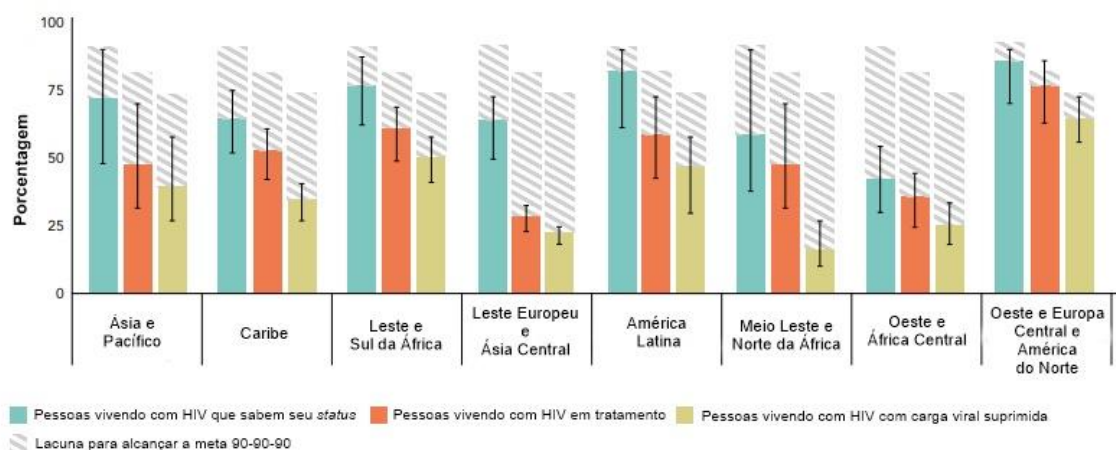


Figura 2. Dados de cobertura da meta 90-90-90, por região, no ano de 2016. Fonte: Adaptado de (UNAIDS, 2017b).

O relatório da UNAIDS traz números otimistas onde, das cidades escolhidas como alvos imediatos para o estabelecimento da meta, 70% delas alcançaram o primeiro pilar, 77% o segundo, e 82% o terceiro pilar do programa, quando analisados em sua individualidade. Ainda assim, quando olhados mais a fundo, alguns valores preocupam. A análise tendo como denominador o número de pessoas vivendo com HIV em relação aos outros dois aspectos avaliados, observa-se que o número cai para 53% e 44%, respectivamente, indicando este último, que a cada cinco indivíduos em terapia, três apresentam-se sem supressão da carga viral (Tabela 2) (UNAIDS, 2017b).

Segundo o relatório da UNAIDS, esta mudança vem sendo conduzida por uma maior compreensão dos benefícios da supressão viral, de que não só o tratamento protege as pessoas que vivem com HIV-1 de doenças relacionadas à AIDS, mas também reduz o risco de transmissão do vírus para outros. Assim, novas estratégias vêm sendo estudadas em cada um dos pilares, para que eles sejam intensificados, e o objetivo alcançado (UNAIDS, 2015c, 2017b, 2017a).

Tabela 2. Dados atualizados da Meta 90-90-90 para o Brasil, América Latina e Mundo.

Fonte: UNAIDS, 2017b.

*Valores considerando o número total de indivíduos infectados por localização.

Localização	Total de Indivíduos Infectados	Indivíduos Diagnosticados (%)*	Indivíduos em Terapia (%)*	Número de indivíduos com carga viral baixa (%)*
Brasil	830.000	-	490.000 (60)	450.000 (54)
América Latina	1.800.000	1.458.000 (81)	1.044.00 (58)	828.000 (46)
Mundo	36.700.000	25.690.000 (70)	19.451.000 (53)	16.148.000 (44)

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO – HIV-1

2.2.1 Aspectos Filogenéticos

O HIV-1 é um retrovírus da Família *Retroviridae*, Subfamília *Lentivirinae* e do Gênero *Lentivirus*, caracterizado por provocar depleção do sistema imune em diversas espécies de mamíferos. Os *Lentivirus* se encontram junto a muitas outras espécies que são filogeneticamente equidistantes, distribuídas em cinco linhagens que infectam primatas (HAHN et al., 2000; HUTCHINSON, 2001; SALEMI; RIFE, 2016).

Acredita-se que através das atividades silvícolas desenvolvidas por caçadores no Oeste da África, ao entrar em contato com sangue infectado de chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*), tenha dado início a todo o processo de infecção. Segundo Gao et al., a cepa do vírus da imunodeficiência símia que infecta chimpanzés (SIV_{cpz}) é a mais próxima ao HIV-1, reforçando que esta seria a teoria que melhor explica a origem do vírus. A origem do HIV-2 é diferente do HIV-1, advindo de um SIV_{cm} presente na espécie de primatas mangabeys, natural do oeste africano, onde se concentram até hoje os casos de infecção (GAO et al., 1999; HEMELAAR, 2012; HUTCHINSON, 2001; SANTOS; SOARES, 2010).

O HIV-1 difere do HIV-2 pela presença do gene *vpu*, enquanto o HIV-2 carrega o gene *vpx*, além de alguns outros genes possuírem menos de 25% de similaridade quando comparada a homologia entre eles. Ambas as espécies são responsáveis pela infecção em humanos, sendo HIV-1 o mais virulento, e o responsável pela pandemia (NDUNG'U; WEISS, 2012; SHARP; HAHN, 2010) .

Filogeneticamente, o HIV-1 compreende quatro linhagens, classificadas em M, N, O e P, sendo todas responsáveis por causar depleção do sistema imune (Figura 3). A linhagem M (Major) é a mais frequente, estando dividida em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), responsável por quase a totalidade dos casos. O subtipo B é o mais comum dos países do Ocidente, levado por Haitianos na década de 60. A O (Outlier) foi a segunda linhagem descoberta, responsável por uma baixa porcentagem dos casos de HIV-1, abrigando casos isolados apenas em países da África. É o grupo mais divergente, e evidências mostram que possivelmente tenha surgido da SIV de gorilas selvagens (SIV_{gor}). O grupo N (New) abriga casos que não se enquadravam nos outros dois grupos, sendo descrito apenas em um país africano. A linhagem P, a mais recente, é responsável por apenas dois casos isolados em todo o mundo, sendo também sugerido sua origem através do SIV_{gor} (D'ARC et al., 2015; GAO et al., 1999; LEOZ, 2018; SHARP; HAHN, 2011; TONGO; DORFMAN; MARTIN, 2016).

A capacidade de virulência dos subtipos virais é constituída de diferenças sutis. Sabe-se que todos os subtipos do grupo M, por exemplo, são capazes de causar AIDS. Porém, tem sido visto que os subtipos D apresentam um maior risco de progressão a AIDS quando comparado com o subtipo A presente na mesma população. Tem se observado também uma evolução desde o início da epidemia pelo vírus nas cepas que promovem a infecção, estando estas cada vez mais

capacitadas em provocar depleção de células T CD4+, sobretudo as do subtipo B (HERBECK et al., 2012; NDUNG'U; WEISS, 2012).

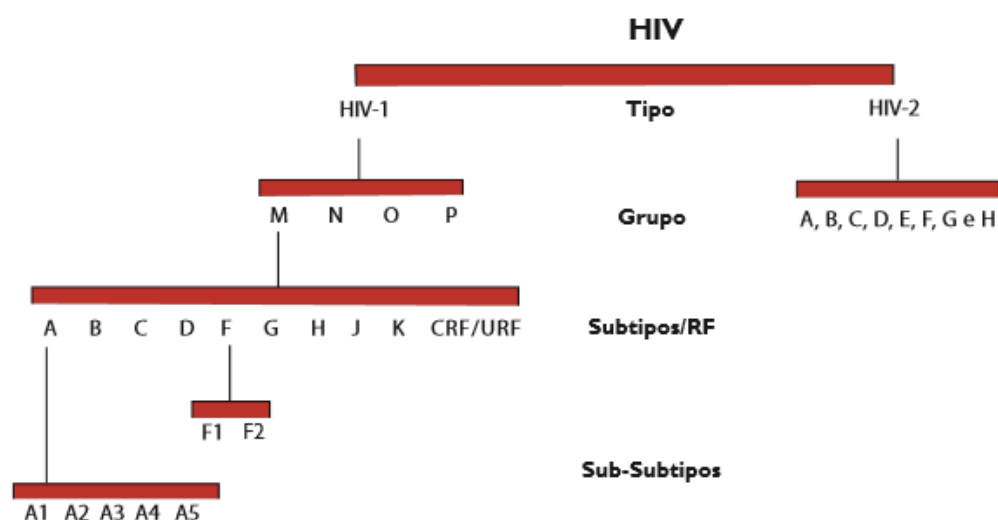


Figura 3. Esquematização filogenética do HIV. (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

O HIV passa por constantes processos de recombinação genética no momento em que mais de uma cepa infecta a mesma célula hospedeira, formando as cepas recombinantes circulantes ou CRFs. Ademais, a expansiva variabilidade genética do HIV deriva também da capacidade mutacional que a enzima viral Transcriptase Reversa (TR) possui durante o ciclo do HIV. O conjunto de mecanismos virais resulta na rápida geração de populações virais geneticamente diversas em cada indivíduo infectado, podendo a taxa de variação entre as cepas chegar a 10% em um mesmo indivíduo (HEMELAAR, 2013; LUFT; GILL; CHURCH, 2011; SMYTH; DAVENPORT; MAK, 2012).

Evidências apontam que isto ocorre para que as cepas virais adquiram uma capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro, a partir de mutações em sequências que codificam proteínas reconhecidas pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Dessa forma, mesmo com a grande variação de MHCs na espécie humana, e com a ampla variação nos subtipos virais, observa-se uma

clara seleção hospedeiro-patógeno durante a transmissão do vírus (HEMELAAR, 2013; HEMELAAR et al., 2011; KAWASHIMA et al., 2009; NDUNG'U; WEISS, 2012).

Vem sendo observado também que existe uma correlação entre os subtipos virais e as vias de contaminação. Homens gays e homens que fazem sexo com homens geralmente estão associados ao subtipo viral B, o qual também tem sido associado aos usuários de drogas injetáveis. A transmissão heterossexual está ligada a subtipos não-B e CRFs nas Américas, Europa e Austrália, enquanto que no Sul da África e na Índia, o subtipo C é o mais frequente. O subtipo C também está mais associado a mucosa vaginal feminina que outros subtipos, podendo da mesma forma estar relacionado a transmissão vertical e heterossexual. Apesar destas correlações serem evidenciadas, está claro que elas podem variar a depender da prevalência demográfica de cada grupo (HEMELAAR, 2013; LI et al., 2015).

Um outro aspecto no qual a filogenia do HIV-1 é estudada, é o fato da capacidade de as cepas influenciarem diretamente na terapia, sobretudo na resistência a mesma. A grande maioria dos estudos que fazem análise das mutações de resistência as drogas (DMRs) têm sido voltadas ao subtipo viral B. Porém, tem-se notado que em algumas regiões, onde a epidemia está concentrada (como em países africanos), a grande prevalência nos indivíduos infectados é de cepas tipo não-B. Outras regiões do mundo, como a Europa Ocidental, tem perdido a hegemonia das cepas B, com um aumento significativo de CRFs, o que faz com que o desafio da terapia antirretroviral venha aumentando cada vez mais, se distanciando do cenário da erradicação do vírus (GATELL, 2011; PALMA et al., 2007; SANTOS; SOARES, 2010).

2.2.2 Aspectos Morfológicos

O HIV-1 (Figura 4) é um vírus esférico, medindo cerca de 100nm de diâmetro e envolvido por uma bicamada lipídica derivada da própria membrana celular do hospedeiro, constituindo o envelope viral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018; HUTCHINSON, 2001).

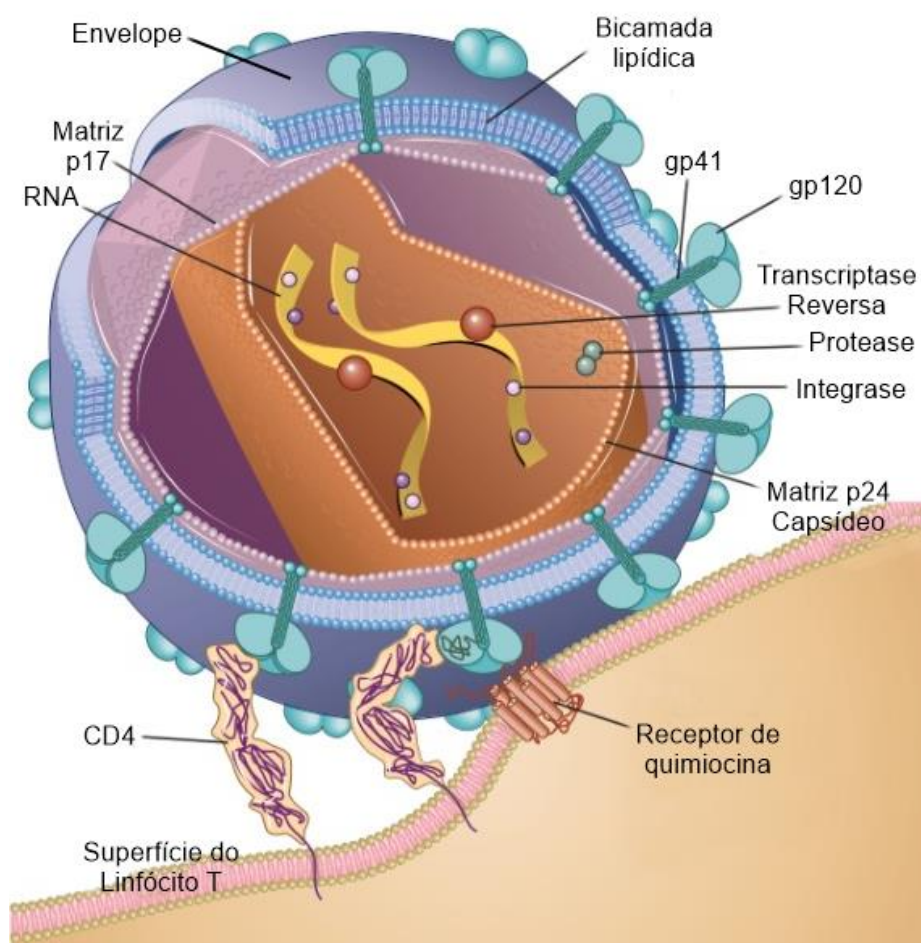


Figura 4. Estrutura Morfológica do HIV. Adaptado de (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018).

A superfície viral é formada de glicoproteínas, a gp120 e gp41, constituídas de quatro domínios cada. Estas glicoproteínas interagem entre si de forma não covalente no processo de ancoragem, atuando no reconhecimento da célula a ser infectada. Abaixo da bicamada lipídica, encontra-se a matriz p17, uma camada proteica que auxilia na associação do complexo gp120-gp41 e de fundamental

importância para a formação de novos vírus (ENGELMAN; CHEREPANOV, 2013; HUTCHINSON, 2001; PRAKASH et al., 2012).

A região central do vírus é composta por uma estrutura cônica proteica, formada pela matriz p24, com a função de abrigar o genoma do vírus, o capsídeo. O material genético do HIV-1 alberga duas moléculas de RNA fita simples, característico a todos os retrovírus. Ainda formando o núcleo-capsídeo, encontramos outras duas proteínas, a p6 e a p7, estando esta última associada a estabilidade do RNA viral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018; ENGELMAN; CHEREPANOV, 2013).

Por fim, também presentes no núcleo-capsídeo, encontram-se as três enzimas fundamentais ao ciclo viral: Transcriptase Reversa (TR), Integrase (I) e Protease (P) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018; HUTCHINSON, 2001).

2.2.3 Aspectos Genéticos

O genoma do HIV-1 é composto por aproximadamente 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 (Figura 5) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018; WATTS et al., 2009).

O gene *gag* é responsável pela síntese de quatro das proteínas que auxiliam na sustentação e regulação, (p17, p24, p6, p7) e o gene *env* pelas glicoproteínas da superfície do envelope (gp120 e gp41). Além destes, existem outros seis genes acessórios (*vif*, *tat*, *rev*, *vpr*, *nef*, *vpu*) que atuam de forma direta no processo de regulação, infecção e patogênese do HIV-1 (LEITNER et al., 2017; LI; DE CLERCQ, 2016).

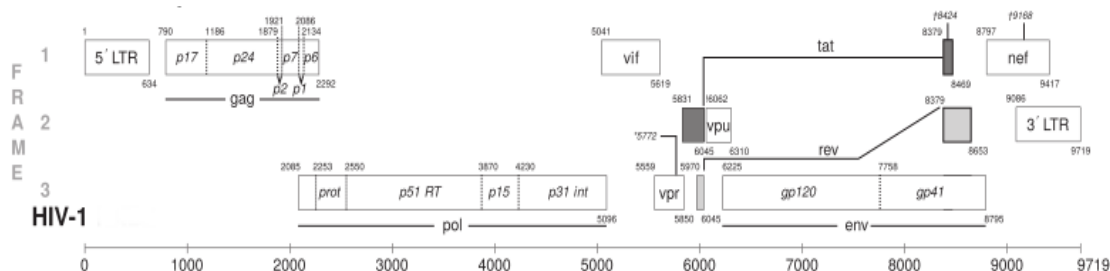


Figura 5. Estrutura Genética do HIV-1. Os genes responsáveis pela síntese das proteínas virais: estruturais (gp120 e gp41; p17 p24, p6 e p7), relacionadas com a replicação (TR, I e P) e relacionadas com a regulação (*vif*, *rev*, *tat*, *vpr*, *vpu*, *nef*). Nas extremidades 5' e 3', regiões longas terminais (LTR) flanqueiam o genoma, atuando em sua regulação. Adaptado de (LEITNER et al., 2017)

Dentre as matrizes abertas de leitura (ORF), a *gag-pol* é responsável por codificar uma cadeia polipeptídica que contém as três enzimas (TR, I e P), estando estas associadas, respectivamente, ao processo de transcrição viral, integração do material genético viral ao genoma do hospedeiro e processamento de proteínas do vírus (GANSER-PORNILLOS; YEAGER; SUNDQUIST, 2008; LEITNER et al., 2017; WATTS et al., 2009).

Nas extremidades 5' e 3' encontram-se elementos estruturais do genoma do HIV, denominadas regiões terminais de repetição (LTR), responsáveis por papéis regulatórios fundamentais nos processos de iniciação e transcrição, de modo a induzir a integração do genoma viral no DNA do hospedeiro e a conclusão de seu ciclo (LI; DE CLERCQ, 2016; WATTS et al., 2009).

2.2.4 Transmissão

A transmissão do HIV-1 tem início com a exposição dos indivíduos através de duas formas principais, as mucosas ou a inoculação percutânea. Apenas o contato com fluidos potencialmente infectantes como sêmen ou fluido pré-seminal, secreção retal ou vaginal, sangue e leite materno são capazes de transmitir o vírus. Assim, as vias de entrada podem ser divididas em três grandes grupos: a

transmissão sexual, a transmissão pela corrente sanguínea e a transmissão vertical ou materno-fetal (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014; SHAW; HUNTER, 2012).

A relação sexual sem proteção segue até os dias atuais sendo a principal via de transmissão. O mecanismo acontece devido a não integridade das mucosas genitais dos indivíduos, devido a microfissuras que podem ser geradas durante o ato sexual. O contato homossexual apresenta-se, ainda, mais frequente que a relação heterossexual em relação a transmissão. Uma análise estimativa sobre o tipo de relação sexual demonstrou que a relação anal receptiva é estimada em aproximadamente 138 indivíduos infectados a cada 10.000 indivíduos, enquanto que indivíduos sexualmente insertivos estão estimados em 11 a cada 10.000. Na relação heterossexual, mulheres possuem duas vezes mais risco de se infectar que homens (BAGGALEY; WHITE; BOILY, 2008; PATEL et al., 2014; ROMERO et al., [s.d.]).

Diversos fatores biológicos também têm sido relacionados com a infecção pelo HIV-1 pela via de transmissão sexual, sendo a carga viral plasmática, o mais importante deles. Estudos têm demonstrado que níveis de 1.500 cópias de RNA/mL de plasma é suficiente para transmitir o vírus. Vale ressaltar ainda que mesmo indivíduos com carga viral indetectável (<50 cópias) ainda são passíveis de transmitir infecções, uma vez que os valores não estão zerados. Outro fator é o estágio da doença, de modo que tanto os estágios iniciais quanto os últimos estágios estão associados com um maior risco de infecção por via sexual, devido a elevada carga viral. Além disso, muitas vezes nos estágios iniciais os indivíduos não têm ciência da infecção, continuando assim com a vida sexual ativa desprotegida, tornando-o, além de vetor do vírus, susceptível a outras infecções (ABU-RADDAD, 2015; FOX; FIDLER, 2010; VERNAZZA et al., [s.d.]).

As coinfeções do trato genital também se apresentam como um fator chave na transmissão viral. Úlceras do trato genital provocadas pela sífilis, gonorreia, dentre outros, terminam por ser porta de entrada para o vírus. Especificamente para mulheres, infecções por candidíase vaginal, a menstruação e o uso de contraceptivos orais, que acabam provocando corrimento vaginal, têm sido associadas ao risco de transmissão. No caso dos homens, a circuncisão tem se demonstrado um fator protetivo à transmissão, uma vez que o contato com o sêmen é diminuído (CHUN et al., 2013; FOX; FIDLER, 2010; WAWER et al., 2009).

O sangue também é considerado potencialmente infectante. O acesso do vírus através desta via se dar, corriqueiramente, através do uso compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas, transfusões sanguíneas sem triagem prévia para HIV-1, uso de drogas injetáveis e ferimentos com materiais perfurocortantes contaminados. A cada 10.000 indivíduos expostos a estimativa de indivíduos infectados é de 9.250 para a transfusão sanguínea, 63 por compartilhamento de agulhas por uso de drogas injetáveis e 23, seringas de injeção percutânea. Na maioria das vezes, um risco concomitante nestes indivíduos é o de infecções por outros patógenos (KARIUKI et al., 2017; PATEL et al., 2014).

Diversos estudos têm demonstrado que a contaminação pelo HIV-1 pela corrente sanguínea se associa com mais de 70 tipos de outros agentes infecciosos. Dentre estes, destacam-se outros dois tipos de vírus, o da Hepatite B e C, formando os *bloodborne viroses* (BBVs). Dada a severidade da coinfeção destes vírus, que atuam provocando desordens crônicas e fatais, centros de atendimento a soropositivos são frequentemente instruídos a realização da sorologia para estas enfermidades, numa tentativa de diagnosticar e tratar o quanto antes, já que é bastante claro que a presença de BBVs promovem uma progressão mais rápida

para a AIDS (CHANG et al., 2013; MENEZES BRUNETTA et al., 2013; TESSEMA et al., 2010).

A transmissão vertical, evento em que a mãe passa o vírus para o filho durante a gestação constitui a principal forma de infecção pelo HIV-1 em crianças, podendo ser em três momentos: a gravidez, o parto, ou amamentação. Estima-se que aproximadamente existam 2.260 indivíduos acometidos com a infecção a cada 10.000 expostos. Alguns fatores individuais tem se mostrado como de maior risco para a transmissão vertical, tais quais a idade da genitora, a contagem de células T CD4+, e a carga viral materna durante a gravidez (CHARURAT et al., 2009; FORBES et al., 2012; PATEL et al., 2014).

Uma característica observada em uma parte considerável dos casos de transmissão vertical, é de que a mãe não sabe que possui o vírus, e acaba por descobrir durante o pré-natal. Porém, caso haja boa adesão as recomendações terapêuticas para mulheres grávidas, o risco de transmissão pode ser reduzido a 1%, realidade já presente em alguns países europeus e estados americanos, e que vem sendo aplicado a regiões de maior concentração da epidemia, como o Norte da África (FORBES et al., 2012; HAMPANDA, 2013).

Apesar de considerados satisfatórios os índices acerca da transmissão materno-fetal, muito ainda precisa de avanços. A indicação de que a amamentação seja parada faz com que mães sofram um estigma social ainda nos dias de hoje, fazendo com que não haja adesão das recomendações clínicas. Aliado a isso, o diagnóstico falho das mulheres grávidas e a má adesão ao tratamento faz com que haja uma barreira no combate à transmissão vertical (MORENO; REA; FILIPE, 2006; RUBIO, 2013).

2.2.5 Ciclo do HIV-1

Uma vez em contato direto com mucosas e/ou tecidos lesados, o vírus adentra o tecido, onde encontra células residentes (macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4+), dando início ao processo de replicação. Tal processo é dividido em sete etapas: adsorção/ entrada, desnudamento, transcrição reversa, integração do provírus, síntese proteica, morfogênese e brotamento (Figura 6) (CARTER; EHRLICH, 2008; FANALES-BELASIO, 2010; HAASE, 2005).

A infecção pelo HIV-1 tem início com a ligação das glicoproteínas presentes no envelope, a gp120 e a gp41, as quais são proteínas de superfície e transmembrana, respectivamente. A gp120 é composta por 5 domínios conservados e cinco domínios variantes, que tem por função promover a ligação à molécula de CD4+ presente na superfície do linfócito, expondo o domínio v3, que é altamente conservado e que fornece a capacidade de ligação a receptores de quimiocinas, sendo os mais conhecidos o CXCR4 e o CCR5. Esses co-receptores ativados promovem, então, uma alteração conformacional no complexo gp120-gp41, expondo na gp41 uma região chamada peptídeo de fusão, promovendo a ligação do envelope viral com a membrana celular (Figura 7). Uma vez fusionados, ocorre o desnudamento do capsídeo viral, com liberação do material genético e das enzimas necessárias à replicação viral no citoplasma da célula (GRINGHUIS et al., 2010; KAPLAN et al., 2016; PRAKASH et al., 2012).

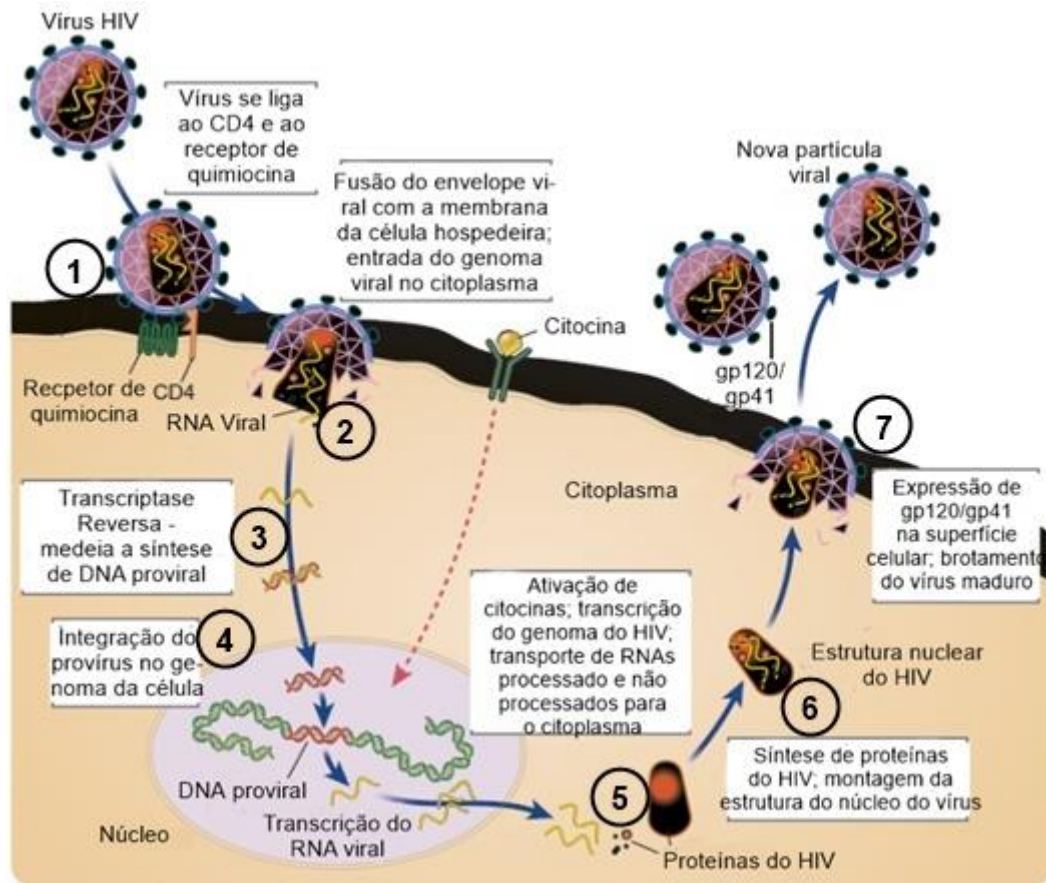


Figura 6. Ciclo do HIV-1. Após o reconhecimento inicial, há exposição do material genético no citoplasma, onde ocorre a transcrição reversa em DNA, que é posteriormente integrado ao genoma do hospedeiro. Em seguida as proteínas virais são formadas, dando as estruturas que compõem o vírus, havendo posterior liberação da nova partícula viral. Adaptado de (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018).

Por ação da TR, o RNA viral é então convertido em DNA dupla fita. Devido à falta de mecanismos de reparação da TR, muitas mutações virais podem vir a ser inseridas nesse processo (FENG et al., 2014; HUTCHINSON, 2001; WANG et al., 2012).

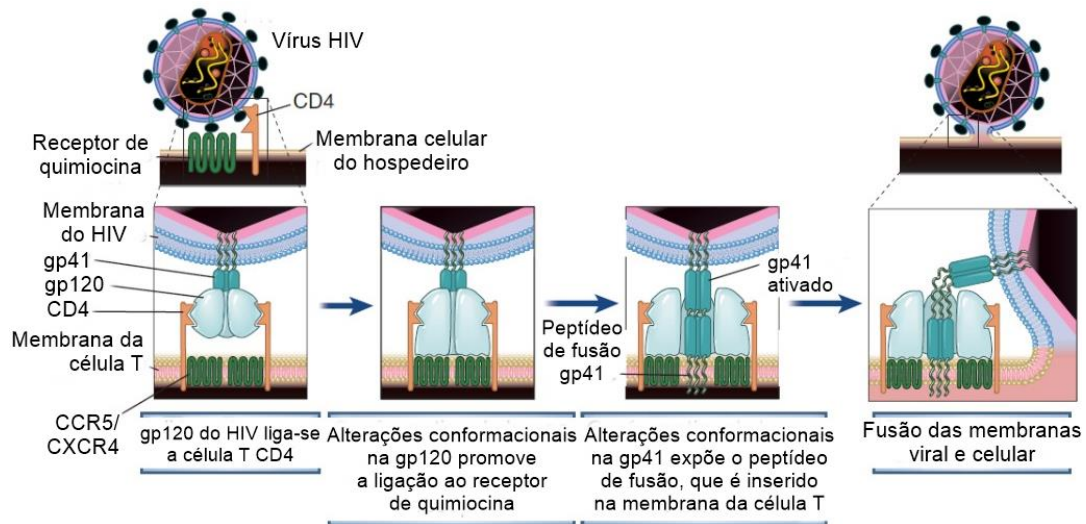


Figura 7. Reconhecimento e fusão do vírus. Após reconhecimento via receptor CD4, ocorrem mudanças conformacionais essenciais nas glicoproteínas gp120 e gp41 do envelope, culminando na fusão do vírus com a membrana do hospedeiro. Adaptado de (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018).

Uma vez a transcrição reversa realizada, o DNA segue então para o núcleo, onde ocorre a integração ao genoma do hospedeiro, graças a atividade da Integrase, formando o DNA proviral. O ponto de partida para a replicação do material viral é a ligação dos LTRs na extremidade 5' do DNA proviral por fatores de transcrição derivados do próprio hospedeiro, como o Sp1 e o NF- κ B. Primariamente são produzidas proteínas não-estruturais, que irão atuar em processos regulatórios; continua-se então a produção dos transcritos chegando ao RNA genômico e as proteínas estruturais, que seguirão para dar origem as novas partículas virais (CAMPBELL; HOPE, 2015; HUTCHINSON, 2001; LIU et al., 2010; MOHAMMADI et al., 2013).

Os transcritos produzidos seguem do núcleo para o citoplasma onde são traduzidos em cadeias polipeptídicas. Duas moléculas de transcritos de RNA se juntam a um complexo nucleoproteína, onde estão contidas as enzimas virais, necessárias para próximas infecções, e proteínas estruturais nucleares. O capsídeo então formado se aproxima da superfície celular, onde se associa com a

membrana plasmática, formando um novo envelope e gerando o brotamento de novas partículas virais (FANALES-BELASIO, 2010; HINZ et al., 2010; PEREZ-CABALLERO et al., 2009).

Já no espaço extracelular ocorre a clivagem de cadeias polipeptídicas pela protease viral, sendo este passo necessário para a formação de novas partículas capazes de promover infecção (FANALES-BELASIO, 2010; FREED, 2015; WILEN et al., 2012).

2.2.6 Patogênese

A patogenia do HIV-1 depende de muitos fatores, sendo determinantes para o sucesso da infecção variantes tanto do hospedeiro, quanto do vírus, destacando-se o tropismo viral e as propriedades dos co-receptores de superfície CCR5 (R5) e o CXCR4 (X4) (BARRE-SINOUSSE; ROSS; DELFRAISSY, 2013; SWANSTROM; COFFIN, 2012).

O HIV-1 apresenta três tipos de tropismo diferentes, sendo responsáveis por definir os tipos de células a serem infectadas. O tropismo M é responsável pela infecção de monócitos, macrófagos e linfócitos circulantes, estando frequentemente associado ao R5 e presente nas fases iniciais da doença. Já o tropismo T é o responsável por infectar precursores linfoides, utilizando principalmente co-receptores X4, presentes nas fases finais da infecção e estando relacionado com uma rápida progressão. Por fim, o tropismo M-T acontece quando ambos os grupos celulares podem estar infectados, sendo também utilizados os dois co-receptores (FRASER et al., 2014; NAIF, 2013; SAGAR, 2014).

As células recém infectadas começam a migrar para linfonodos locais, onde se dar início ao processo de disseminação, com a expansão da replicação viral. A

fase aguda se caracteriza por alta súbita da carga viral plasmática, com uma significativa diminuição de linfócitos circulantes. Nesta fase, muitas pessoas possuem sintomas característicos como: febre, dor de garganta, linfadenopatia, dores musculares, que por muitas vezes serem considerados sintomas brandos. São facilmente confundidos com outras infecções virais, não sendo realizados testes de triagem para o HIV. Um curioso fato neste período é que, apesar da destruição e células T serem restritas ao trato gastrointestinal nas primeiras semanas, geralmente não se encontram sintomas associados a ele (LACKNER; LEDERMAN; RODRIGUEZ, 2012; MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014; WEISS, 2008).

Cerca de três meses após o início da infecção, com o desenvolvimento da resposta imune, anticorpos contra o vírus podem ser encontrados no plasma dos indivíduos infectados, provocando uma leve estabilização nos níveis de carga viral. Os níveis de anticorpos são considerados baixos, impedindo assim a detecção por testes como ELISA ou *immunoblotting*, sendo o diagnóstico realizado por detecção de níveis de RNA no plasma. Ademais, as altas taxas de mutação do vírus fazem com que, haja escape do reconhecimento dos anticorpos, fazendo com que se estabeleça uma infecção crônica e o indivíduo entre no estágio de latência (FANALES-BELASIO, 2010; HOEHN et al., 2015; LACKNER; LEDERMAN; RODRIGUEZ, 2012).

Uma vez as células infectadas deslocadas para os demais órgãos, dá-se início a fase crônica da infecção, sendo assintomática e podendo se estender por anos. Nota-se, nesta fase, uma baixa taxa de replicação viral, alternada por picos de viremia, desde a níveis indetectáveis pelos *kits* comerciais, no caso dos denominados controladores de elite, até valores altíssimos, de 100.000 cópias por

mL de plasma. As taxas de linfócitos T CD4⁺ sofrem uma diminuição progressiva durante esta fase, tanto circulantes quanto em linfonodos. Mesmo com a diminuição de células de defesa, o sistema imune ainda consegue reagir contra determinados patógenos, porém de maneira menos eficiente. Acredita-se que o tempo médio entre a infecção primária e o desenvolvimento da AIDS seja cerca de 10 anos, sendo variável de acordo com cada caso (Figura 8) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018; LACKNER; LEDERMAN; RODRIGUEZ, 2012; MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

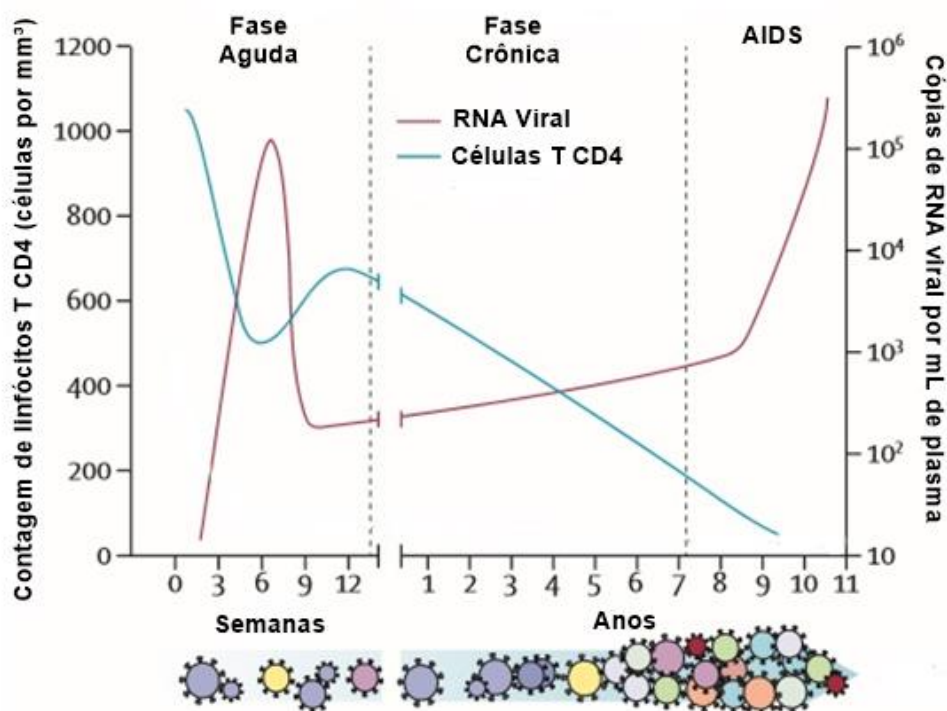


Figura 8. Progressão clínica da infecção pelo HIV-1. Adaptado de (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

A AIDS é o estágio final de uma infecção de caráter progressivo, em que a taxa de linfócitos T CD4⁺ está abaixo de 200 células/ μ L de sangue, devido a um exacerbado efeito citopático nos linfócitos. Nesta fase, o sistema imune do indivíduo se encontra extremamente debilitado, tornando-o susceptível a diversas infecções

oportunistas como por *Pneumocystis sp.*, micobactéria, citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, além de neoplasias, como Sarcoma de Kaposi e linfoma não-Hodgkin. Devido a sua severidade, uma vez os indivíduos infectados não recebendo o tratamento com antirretrovirais de forma adequada, podem vir a óbito (LACKNER; LEDERMAN; RODRIGUEZ, 2012; VIDYA VIJAYAN et al., 2017).

2.3 ANTIRRETROVIRAIS

2.3.1 Terapia Antirretroviral (TARV)

Segundo orientações da ONU adotadas pelo Ministério da Saúde brasileiro, a TARV deve ser iniciada logo após o diagnóstico, evitando reduções significativas na contagem de linfócitos T CD4+, principalmente nos grupos de risco (crianças e mulheres grávidas). Tais orientações objetivaram otimizar o tratamento, promovendo assim importantes reduções em coeficientes de morbidade e mortalidade resultantes da infecção pelo HIV-1 (PINTO et al., 2007; VELLA et al., 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

No mercado mundial, mais de 30 tipos de fármacos são disponíveis para serem utilizados na terapia anti-HIV, tendo como alvo principal a diminuição da carga viral, com um consequente aumento da taxa de células T CD4+, uma vez que menos células estão sendo infectadas. Os medicamentos são distribuídos em seis classes diferentes, de acordo com o papel inibitório que exercem no ciclo viral (Figura 9), sendo elas (ARTS et al., 2012; PALMISANO; VELLA, 2011):

- Inibidores de entrada (antagonistas de CCR5): ligam-se a sítios específicos do co-receptor CCR5, impedindo a entrada da partícula viral na célula.
- Inibidores de Fusão (IF): ligam-se a proteína de membrana celular gp41, impedindo a fusão do vírus na membrana da célula hospedeira.

- Inibidores Nucleosídeos da Transcrição Reversa (INTR): são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos que interrompem a síntese do material genético do vírus.
- Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcrição Reversa (INNTR): impedem a síntese do material genético do vírus por se ligarem a sítios alostéricos da transcriptase reversa, inibindo sua atividade.
- Inibidores de Integrase: impedem a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro.
- Inibidores de Protease (IP): interagem com a protease viral, impedindo o processamento correto das proteínas, abolindo sua infectividade.

A maioria das drogas antirretrovirais são administradas por via oral e absorvidas via intestinal. Para que cheguem aos tecidos em concentrações séricas e desenvolvam a eficácia pretendida, além de evitarem efeitos tóxicos ao organismo, os fármacos precisam então passar por processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Nestes processos, muitas variantes podem influenciar no objetivo final, como a integridade das enzimas necessárias nestas reações, fatores genéticos, propriedades virais, interação medicamentosa, e comorbidades associadas (ROMANO et al., 2013; TSENG; SEET; PHILLIPS, 2014).

De acordo com orientações clínicas, atualmente prescrevem-se três drogas em combinação. Como primeiro esquema terapêutico, duas delas, são obrigatoriamente INTRs, e uma terceira das demais classes farmacológicas usadas na TARV. Os esquemas são baseados em características que obedecem a critérios de eficácia e tolerância, de modo a se obter uma firme aderência ao tratamento. Em casos em que há falha no primeiro esquema, aconselha-se a troca deste para

novos regimes, buscando assim uma melhora clínica e efeitos colaterais menos expressivos que as estratégias anteriores (BARTLETT et al., 2001, 2006; BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b; VELLA et al., 2012).

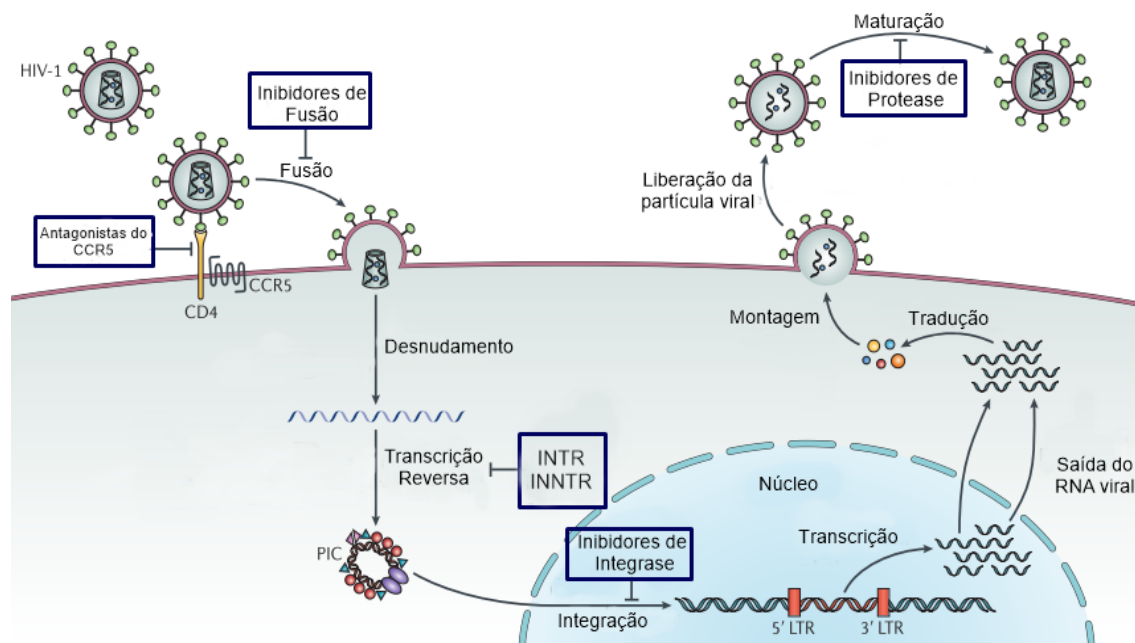


Figura 9. Mecanismo de ação das drogas TARV. Destacam-se os pontos aos quais cada classe de fármaco se liga respectivamente durante o ciclo viral, impedindo assim a entrada do vírus, a transcrição e integração dele na célula hospedeira, bem como sua maturação, evitando a formação de novas partículas virais. Adaptado de (BARRE-SINOUSI; ROSS; DELFRAISSY, 2013).

No Brasil, desde o ano de 1996, pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) tem acesso gratuito à TARV, sendo pioneiro, dentre os países em desenvolvimento. Atualmente, 22 fármacos são disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no tratamento contra o vírus, em 38 apresentações farmacêuticas (tabela 3). Aproximadamente metade das pessoas infectadas fazem uso da terapia, o que tem refletido diretamente na redução dos índices epidemiológicos no país (UNAIDS, 2014, 2017a).

Tabela 3. Medicamentos fornecidos pelo SUS aos pacientes soropositivos.

	Medicamento	Siglas	Posologia	Unidade de Fornecimento
1	Abacavir	(ABC)	300mg	Comprimido revestido
2	Abacavir	(ABC)	solução oral	Frasco
3	Atazanavir	(ATV)	200mg	Cápsula gelatinosa dura
4	Atazanavir	(ATV)	300mg	Cápsula gelatinosa dura
5	Darunavir	(DRV)	75mg	Comprimido revestido
6	Darunavir	(DRV)	150mg	Comprimido revestido
7	Darunavir	(DRV)	600mg	Comprimido revestido
8	Dolutegravir	(DTG)	50mg	Comprimido revestido
9	Efavirenz	(EFZ)	200mg	Cápsula gelatinosa dura
10	Efavirenz	(EFZ)	600mg	Comprimido revestido
11	Efavirenz	(EFZ)	solução oral	Frasco
12	Enfuvirtida	(T20)	-	Frasco-ampola
13	Entricitabina + Tenofovir	-	200mg + 300mg	Comprimido revestido
14	Estavudina	(d4T)	pó para solução oral	Frasco
15	Etravirina	(ETR)	100mg	Comprimido revestido
16	Etravirina	(ETR)	200mg	Comprimido revestido
17	Fosamprenavir	(FPV)	50mg/mL	Frasco
18	Lamivudina	(3TC)	150mg	Comprimido revestido
19	Lamivudina + Zidovudina	(AZT) + (3TC)	150 + 300mg	Comprimido revestido
20	Lamivudina	(3TC)	solução oral	Frasco
21	Lopinavir + Ritonavir	(LPV/r)	100mg + 25mg	Comprimido revestido
22	Lopinavir + Ritonavir	(LPV/r)	80mg/mL + 20mg/mL - solução oral	Frasco
23	Lopinavir/ritonavir	(LPV/r)	200mg + 50mg	Comprimido revestido
24	Maraviroque	(MVC)	150mg	Comprimido revestido
25	Nevirapina	(NVP)	200mg	Comprimido simples
26	Nevirapina	(NVP)	suspensão oral	Frasco
27	Raltegravir	(RAL)	100mg	Comprimido mastigável
28	Raltegravir	(RAL)	400mg	Comprimido revestido
29	Ritonavir	(RTV)	100mg	Comprimido revestido
30	Ritonavir	(RTV)	80mg/mL	Frasco
31	Tenofovir	(TDF)	300mg	Comprimido revestido
32	Tenofovir + Efavirenz	(TDF) + (EFZ)	300mg + 300mg	Comprimido revestido
33	Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	(TDF) + (3TC) + (EFZ)	300mg + 300mg + 600mg	Comprimido revestido
34	Tipranavir	(TPV)	100mg/mL	Frasco
35	Tipranavir	(TPV)	250mg	Cápsula gelatinosa mole
36	Zidovudina	(AZT)	100mg	Cápsula gelatinosa dura
37	Zidovudina	(AZT)	solução injetável	Frasco-ampola
38	Zidovudina	(AZT)	xarope	Frasco

Fonte: Adaptado de <http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-e-hiv/tratamento-para-o-hiv> (Acesso em 22/05/2018).

O Ministério da Saúde no seu relatório nacional de medicamentos (RENAME), lançado em 2017, trouxe o Dolutegravir, um Inibidor de Integrase, como mais uma droga no combate à infecção pelo HIV-1. Em contrapartida, algumas outras drogas foram excluídas do quadro de medicamentos fornecidos, como o fosamprenavir e a didanosina, além da apresentação termolábil do ritonavir, garantindo medicamentos que apenas possuam uma melhor eficácia, segurança e comodidade posológica, de modo a evitar maiores efeitos colaterais.

Um outro aspecto também observado no Brasil, bem recente, é a profilaxia pós-exposição (PrPE), que tem reduzido bastante o número de infecções. O medicamento utilizado é denominado Truvada, sendo uma combinação de dois medicamentos, o Tenofovir e a Entricitabina. O principal objetivo desta profilaxia, é permitir que pessoas que convivem diretamente com indivíduos infectados possam manter relações, sem que haja infecção pelo vírus, principalmente nos denominados grupos de risco como homossexuais, mulheres trans, profissionais do sexo e casais sorodiscordantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2017).

Mesmo com uma grande quantidade de fármacos disponíveis no controle da viremia, tratamentos voltados para a recuperação imunológica ainda são desafiadores às pesquisas. Assim, novas abordagens, a exemplo da farmacogenética, vem sendo fundamentais para uma melhor compreensão dos mecanismos atuantes no insucesso imunológico, e a obtenção de formas para se chegar ao sucesso terapêutico, de modo a reduzir os índices de morbimortalidade da doença (PINZONE et al., 2012; SEMPA et al., 2013).

Essa nova abordagem visa a análise de alterações em genes específicos que atuam na dinâmica do processo patogênico, desde o desenvolvimento ao tratamento. Diversas patologias vêm utilizando a farmacogenética como alvo

terapêutico, como o câncer, as doenças cardiovasculares e a infecção pelo HIV-1. Como exemplo, no uso da terapia antirretroviral atualmente, para que o paciente passe a utilizar o Abacavir se faz necessária a genotipagem para o complexo maior de histocompatibilidade HLA-B*5701, visto que 5 a 8% dos pacientes apresentam uma forte reação de hipersensibilidade a este medicamento durante as 6 primeiras semanas de tratamento (ACETI et al., 2015; HERTZ; RAE, 2014; JOHNSON; CAVALLARI, 2013; MALLAL et al., 2008; TANGAMORNSUKSAN et al., 2015).

Na terapia antirretroviral, a partir da farmacogenética, testes para avaliar a eficácia e toxicidade têm sido aplicados. A possibilidade da terapia personalizada tem sido uma saída para os contras que a terapia oferece, sobretudo os expressivos efeitos colaterais, e que, muitas vezes, torna-se motivo de abandono dos pacientes com a subsequente falha terapêutica (MICHAUD et al., 2012; OWEN et al., 2006).

2.3.2 Sucesso e Falha terapêuticos

Considera-se sucesso terapêutico quando se tem uma boa resposta a critérios virológicos, imunológicos e clínicos. Embora a definição de falha englobe todas essas variáveis, o parâmetro virológico segue como padrão ouro na caracterização da terapia, uma vez que a redução da carga viral é o principal objetivo da TARV (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Define-se como sucesso virológico a supressão da replicação viral, resultando em baixos níveis de carga viral plasmática (comumente <50 cópias/mL de plasma, nível inferior de detecção de muitos exames de carga viral disponíveis), com uma considerável recuperação das taxas de células T CD4+ (sucesso

imunológico), estendendo-a por longos períodos sem sintomatologia clínica associada à AIDS. Quando este padrão não é observado, denomina-se falha terapêutica (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a; PRABHAKAR et al., 2011).

A falha virológica precede a terapêutica e a clínica. A falha virológica ocorre quando não há supressão da carga viral, com valores excedendo 1000 cópias por mL de plasma em duas análises consecutivas após seis meses de terapia, segundo diretrizes da OMS. No Brasil, o limite para considerar o indivíduo em falha virológica é de >50 cópias de RNA viral por mL de plasma. Outras situações semelhantes que se adequam a ausência da supressão viral são indivíduos que não demonstram o quadro terapêutico esperado após a mudança do primeiro esquema, bem como aqueles que respondiam ao tratamento, e após um certo período, voltam a apresentar aumento da viremia, quadro denominado rebote. A falha virológica é fundamental para que se decidam os próximos passos nos esquemas de tratamento (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b; HASSAN et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014; VALLABHANENI et al., 2013).

A falha clínica ocorre quando os indivíduos, após seis meses de terapia antirretroviral, apresentam sintomas que caracterizam a evolução para a síndrome. Este processo está diretamente relacionado com o mecanismo de falha imunológica (FI), uma vez que alguns sintomas decorrem da depleção de células T. Apesar de se acreditar que baixa na carga viral está diretamente associada ao ganho de células T CD4+, uma parcela dos indivíduos em terapia antirretroviral, cerca de 15 a 30%, não obtém o sucesso imunológico, mesmo obtendo o virológico (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b; CORBEAU; REYNES, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

O insucesso dos esquemas terapêuticos possui caráter multifatorial, em que se destacam variantes como: a má adesão do paciente aos fármacos, que quase sempre se apresenta associada aos efeitos colaterais, bem como resistência da cepa viral infectante, e características genéticas do hospedeiro (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b; KURITZKES et al., 2008).

Especificamente na falha imunológica, diversos fatores têm sido relatados na literatura, porém, muito ainda nesse aspecto é uma incógnita, tornando necessário, assim, um aprofundamento, na tentativa de elucidar este mecanismo, uma vez que apresenta-se como principal parâmetro na progressão para a AIDS (GAARDBO et al., 2012; PRABHAKAR et al., 2011).

2.3.3 Falha Imunológica

São considerados em falha imunológica (FI) indivíduos que, de maneira geral, após um ano de TARV, apresentam uma baixa recuperação na taxa de linfócitos T CD4+. Diversas classificações podem ser consideradas para a falha imune. Segundo o Ministério da Saúde brasileiro, são considerados em FI, pacientes que após um ano de terapia apresentam um nível de recuperação abaixo de 30% do valor inicial. Segundo a OMS, são considerados indivíduos em falha imunológica, aqueles que após o início da terapia, os níveis de T CD4+ voltam à *baseline* ou que mantêm os níveis de abaixo de 100 células/ μ L por aproximadamente seis meses. Na literatura, diversos estudos apontam valores inferiores a 200 células/ μ L e/ou 350 células/ μ L para caracterização dos não respondedores imunológicos (INRs) (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a; GAARDBO et al., 2012; PRABHAKAR et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Os linfócitos T são as principais células que medeiam a resposta imune. Existem diversos tipos de células T, de acordo com o CD (do inglês, *cluster of differentiation*) que expressam. As células T CD4⁺ são conhecidas por atuar como auxiliares ou *helper* durante os processos infecciosos, tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Sua ativação ocorre a partir da interação do receptor de célula T (TCR) e a molécula CD4 (atuando como co-receptor) com o MHC tipo II presente nas células apresentadoras de antígenos (APCs). De acordo com o tipo de patógeno envolvido, diversas respostas imunes são geradas, destacando-se as respostas Th1, Th2 e Th17 (LUCKHEERAM et al., 2012; STRUTT; MCKINSTRY; SWAIN, 2011).

Uma vez ativadas, estas células atuam a partir da secreção de citocinas e quimiocinas, que são moléculas inflamatórias que atuam na emissão de sinais durante o desencadeamento da resposta imune, promovendo a migração de células para o sítio de infecção, a maior expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, o controle temporal da resposta imune, dentre outras funções (ALMEIDA et al., 2016; LUCKHEERAM et al., 2012; OESTREICH; WEINMANN, 2012).

A depleção das células T CD4⁺ tem início com a infecção e posterior destruição de células residentes nos sítios de entrada do vírus; a depleção segue com a infecção de células do sangue periférico, até alcançar as células dos reservatórios, sobretudo as células T de memória. Estima-se que cerca de 1 bilhão de partículas virais são formadas diariamente, acentuando a destruição das células com o curso da infecção. Dessa forma, a diminuição destas células durante o processo de infecção pelo HIV-1 acaba acarretando no indivíduo uma depleção do sistema imune bastante severa, o que justifica a busca pelo entendimento dos

mecanismos acerca dos não respondedores imunológicos (GAARDBO et al., 2012; MISHRA et al., 2009; SANT; MCMICHAEL, 2012).

Fatores como idade avançada, baixo nível de células T CD4+ antes da TARV, replicação persistente do HIV-1 em tecidos linfoides, fase progressiva da doença, coinfeções, mecanismos intrínsecos ao vírus, disfunção tímica e medular, ativação imune e polimorfismos genéticos têm sido associados a depleção do sistema imune nos casos de infecção pelo HIV-1. Logo, observa-se que o caráter imunológico é variável a cada indivíduo, onde a ausência da produção de novas células T CD4+ e a incessante destruição são pontos chaves em um quadro multifatorial (AIUTI; MEZZAROMA, 2006; BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b; CORBEAU; REYNES, 2011; PINZONE et al., 2012).

No contexto da morte celular, inicialmente, acreditava-se que a depleção de células T CD4+ ocorria devido a um efeito citopático da célula pela via da apoptose, em consequência de uma infecção produtiva das mesmas. Adicionalmente, mecanismos intrínsecos poderiam estar associados com essa destruição, como proteínas não estruturais do vírus, fatores de transcrição e citocinas do hospedeiro. Atualmente, sabe-se que outras vias de morte celular possuem um papel fundamental na depleção das células T CD4+, refletindo diretamente na dinâmica da falha imunológica dos indivíduos em terapia (DOITSH; GREENE, 2016; FÉVRIER; DORGHAM; REBOLLO, 2011; GANDHI et al., 1998; HERBEUVAL et al., 2008).

2.4 MORTE CELULAR

2.4.1 Vias de Morte Celular

A morte celular possui um papel crucial na regulação de diversos mecanismos biológicos, desde a embriogênese até os processos imunológicos, promovendo assim a homeostase dos organismos. Acredita-se que cerca de 50 bilhões de células sofram morte celular programada diariamente, sendo este um mecanismo completamente eficaz e silencioso, até mesmo em tecidos em que se observa uma alta taxa de morte, como o timo (TAIT; ICHIM; GREEN, 2014; YANG et al., 2015).

Comumente, a morte celular pode ser dividida em duas formas, a passiva, que decorre de um dano maior que independe da célula, e a ativa, quando a célula estimula a sua própria morte. Descrevem-se três subtipos de morte celular: a morte celular acidental (ACD), ativada por agentes químicos, físicos ou mecânicos, sendo esta uma forma descontrolada de morte; a morte celular regulada (RCD), que depende da codificação de uma maquinaria genética, estando associada a medicamentos e intervenções genéticas; a morte celular programada (PCD), que atua a partir do estímulo de RCDs que ocorrem a partir da morte programada ou na manutenção da homeostase tecidual (GALLUZZI et al., 2014; KROEMER et al., 2009).

Inicialmente, acreditava-se que a morte celular derivava de duas vias: a programada que era apenas decorrente da apoptose e caspase dependente, e a necrose, como forma não dependente de caspase. À medida que os estudos avançaram, outras vias de morte celular foram sendo identificadas, como: a autofagia, a piroptose (formas de morte celular programada), e as associadas à

necrose, como: a oncose, uma morte que precede a necrose, e a necroptose, uma via de regulação da necrose, caracterizada pela ligação a receptores, dentre outros (Figura 10). Ademais, alguns pesquisadores defendem o termo necrose associado à célula ou tecido já morto (FINK et al., 2005; TRUMP et al., 1997; YANG et al., 2015).

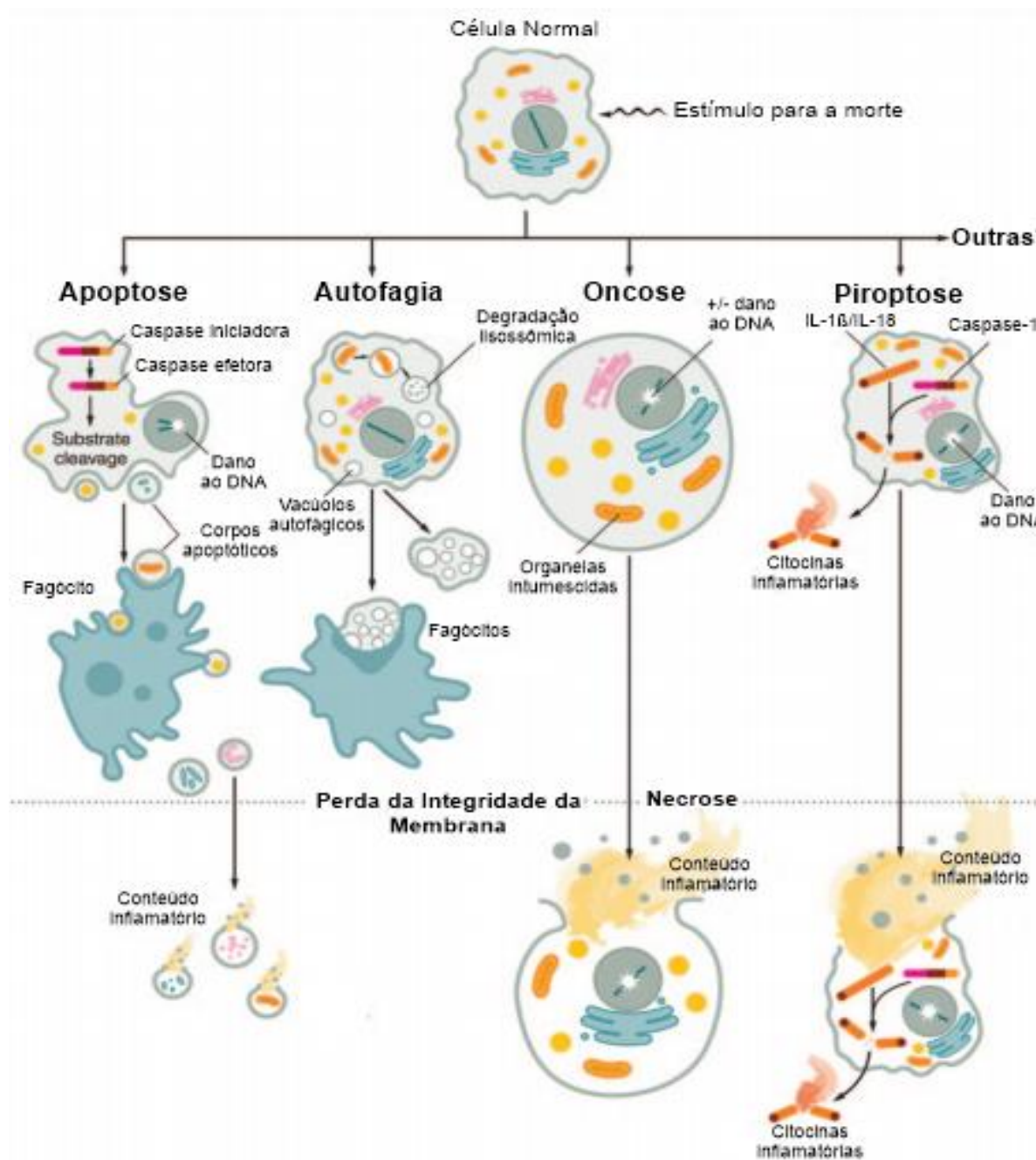


Figura 10. Vias de morte celular. Adaptado de (FINK et al., 2005)

Uma vez a apoptose como primeiro modelo de morte celular relatado na década de 40, os aspectos morfológicos foram primariamente descritos para esta via. Assim, as primeiras características descritas foram: encolhimento citoplasmático, condensação da cromatina (inicialmente próximo da membrana nuclear, seguido por todo o núcleo, processo chamado picnose), fragmentação do núcleo (cariorrexe), pequenas modificações nas organelas e a presença dos corpos apoptóticos (DUPREZ et al., 2009; KROEMER et al., 2009; TAIT; ICHIM; GREEN, 2014; YANG et al., 2015).

Notou-se que alguns tipos de morte apresentavam características diferentes, como a morte autofágica, que apresenta uma extensiva vacuolização citoplasmática, e a necrose, que apresenta a tumefação do citoplasma e das organelas, além de aspectos peculiares quanto a condensação da cromatina e a dilatação da membrana nuclear. Apesar destas características serem, geralmente, consideradas específicas, de acordo com o subtipo da morte (se ACD, RCD ou PCD), podem ser alteradas ou se apresentarem conjuntas (BATTISTELLI et al., 2011; EIDET et al., 2014; KROEMER et al., 2009).

Um outro aspecto observado, é que as células não seguem diretamente para a morte propriamente dita. Alguns tipos de morte conseguem ser reversíveis, enquanto não se chega ao “*point-of-no-return*” da via. Porém, algumas características são cruciais para indicar que a célula deve morrer, sendo elas a perda da integridade da membrana plasmática, a célula em sua totalidade sofrer fragmentação, formando os já citados corpos apoptóticos e/ou o “cadáver” da célula a ser fagocitado por células adjacentes (ELMORE, 2007a; GALLUZZI et al., 2014; KROEMER et al., 2009).

Embora a morte de algumas células seja devido ao impacto do dano na mesma, a grande maioria das células do organismo são dependentes de cascatas bioquímicas de sinalização, que culminam nas alterações morfológicas que levam à morte. Como características comuns a qualquer tipo de morte, sempre será necessário um receptor de morte (DR) e uma proteína efetora dentro da via. Além disso, cada via é ativada por antígenos diferentes, podendo ser padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (ASHIDA et al., 2011; GREEN; LLAMBI, 2015).

Dada a complexidade destas cascatas, cada passo é estritamente regulado por uma gama de outras proteínas, uma vez que tanto a diminuição quanto o aumento da morte celular pode promover a quebra da homeostase, estando associada com diversos processos patológicos, como: câncer, doenças autoimunes, processos neurodegenerativos, desordens hematológicas e a resposta imunológica frente a infecções bacterianas e virais (AGOSTINI; TUCCI; MELINO, 2011; ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

Nos processos infecciosos, a morte celular constitui na forma mais efetiva de combate a patógenos pela imunidade inata. Nas infecções virais, devido ao fato destes organismos não possuírem maquinaria própria para se desenvolverem, o final do ciclo acarreta na morte celular por provocarem alterações na membrana plasmática da célula hospedeira, lise celular e indução de morte celular programada. É curioso, porém, que quando em estágio de latência, nenhum dano é observado nas células (DANTHI, 2016; KAMINSKY; ZHIVOTOVSKY, 2010).

Características que tangem tanto ao hospedeiro quanto aos vírus são cruciais no curso da infecção. Os interferons são citocinas que possuem atividade antiviral, antitumoral, e imunomodulatória, sendo uma das formas que tenta

combater o vírus, bem como as granzimas presentes em células NK e linfócitos T CD8+. Alguns vírus, apesar de dependerem da célula para se replicar, trazem consigo algumas formas de combater a resposta do hospedeiro, como proteínas que impedem a ação antiviral mediada por interferon e que inibem a apoptose (KAMINSKY; ZHIVOTOVSKY, 2010; MCLEAN et al., 2008).

Durante muito tempo acreditou-se que a depleção de células T CD4+ provocada pelo HIV-1 era característica exclusiva da morte por apoptose. Atualmente, sabe-se que, dada a bagagem proteica que o vírus pode interagir e secretar, outras vias de morte celular podem ser utilizadas, como: a necrose, a morte autofágica e a piroptose (MCLEAN et al., 2008; PICERNO et al., 2010).

Estudos *in vitro* tem demonstrado que a apoptose atua apenas como coadjuvante na depleção das células T CD4+. Os resultados observados por Doitsh e seu grupo demonstraram que a principal via de morte celular associada com a AIDS é de responsabilidade, em sua maioria, de um outro tipo de morte celular programada, a piroptose (DOITSH et al., 2014; MONROE et al., 2014).

2.4.2 Piroptose: uma via de morte celular altamente inflamatória

A piroptose é uma morte celular programada altamente inflamatória, utilizada pela imunidade inata no combate a patógenos intracelulares. O termo “piro” remete a fogo, revelando a natureza inflamatória da via, e “ptose” significa cair, utilizado para se referir a outras vias de morte celular (BOUCHER; CHEN; SCHRODER, 2016; JORGENSEN; MIAO, 2015).

Os primeiros relatos desta via datam de 1992, onde ensaios utilizando macrófagos infectados com bactérias do gênero *Shigella* demonstraram características semelhantes a apoptose. Posteriormente, testes com outros

patógenos observaram características como poros na membrana, inchaço e influxo de cálcio, aspectos observados na necrose. Apenas em 2001, Cookson e Brennan utilizaram o termo piroptose para descrever a morte que mesclava traços apoptóticos e necróticos (BOUCHER; CHEN; SCHRODER, 2016; COOKSON; BRENNAN, 2001).

A principal característica distintiva da piroptose é a ativação da caspase-1, por isso também é conhecida como via caspase-1 dependente ou via canônica. As caspases (do inglês *cysteine-aspartic-acid-proteases*) são proteases baseadas em cisteínas que clivam outras proteínas a partir de um resíduo de ácido aspártico. Baseado nas suas funções fisiológicas, as caspases podem ser divididas em dois grupos: as que estão relacionadas com a iniciação e a execução da apoptose (a exemplo das caspases-2, -3, -6, -7, -8 e -10) e as que conseguem desencadear a inflamação, como a caspase-1, -4 e -5 em humanos, e a caspase-11 em ratos, estas três últimas constituem a via da piroptose independente de caspase-1 ou via não canônica (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017).

A ativação da caspase-1 se dá através do inflamassoma, um complexo multiproteico de sinalização montado em resposta a detecção de perturbações da célula ou infecções por patógenos intracelulares. Diversos tipos de inflamassoma podem ativar a caspase-1, sendo bem caracterizadas três famílias de proteínas: as *nod-like receptors* (NLRs), sendo bem descritos os inflamassomas NLRC4 e NLRP3, os *AIM2-like receptors* (ALRs), sendo o AIM2 o inflamassoma mais estudado desse tipo, e o *tripartite motif family* (TRIM). Estruturalmente, o complexo inflamassoma varia de acordo com cada subtipo (Figura 11). Os NLRs geralmente são subdivididos em dois grupos, de acordo com o domínio que expressam. Podendo

ser um domínio de pirina (PYD), comumente denominado NLRPs, enquanto que outros possuem o domínio de ativação e recrutamento de caspase (CARD). Existem ainda outras estruturas formadas apenas pelo PYD, como é o caso do AIM2. Para que haja a ativação da caspase, nos casos de inflamassoma em que não se tem a ligação do CARD, existe um adaptador, denominado ASC, (do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain*) responsável por essa função (KESAVARDHANA; KANNEGANTI, 2017; MIAO, 2011).

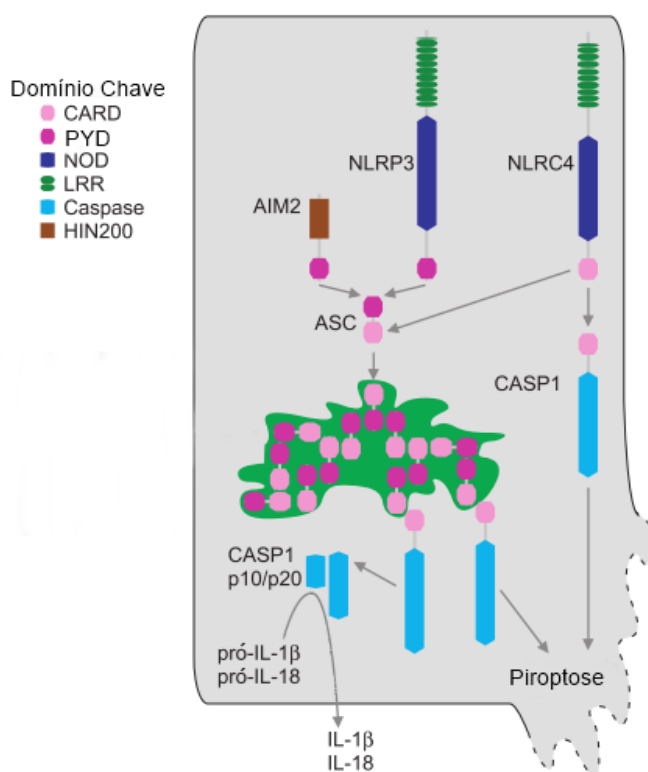


Figura 11. Dinâmica de ativação da caspase. Adaptado de (MIAO, 2011).

AIM2: do inglês, *Absent in melanoma 2*; **ASC:** do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain*; **CARD:** domínio de recrutamento e ativação de caspase; **CASP1:** Caspase 1; **IL-1β:** Interleucina 1 beta; **IL-18:** Interleucina 18; **LRR:** domínio de repetição rico em leucina; **NLRP3:** do inglês, *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*; **NLRC4:** do inglês, *NOD-like receptor Family containing 4*; **NOD:** do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors*; **PYD:** domínio de pirina;

Uma vez a caspase ativada, sua atividade catalítica está diretamente associada com a clivagem de proteínas que estão na sua forma inativa. Assim,

tanto a via dependente quanto a via independente de caspase-1 têm em comum a ativação de duas citocinas pró-inflamatórias, a pró-IL-1 β e a pró-IL-18, dando início a piroptose. Uma vez clivadas e convertidas, a IL-1 β é dotada de uma alta capacidade de desenvolver inflamação, vasodilatação e extravasamento de células do sistema imune, bem como atuar na modulação da resposta imune adaptativa, enquanto a IL-18 promove a produção de IFN- γ pela resposta Th1, células NK e T citotóxicas, estimula a resposta Th2 e a inflamação local. Assim, as citocinas ativadas pela caspase-1 são liberadas durante a piroptose pelos poros formados na membrana, apesar de outros mecanismos serem sugeridos, como a exocitose de lisossomos e a saída de microvesículas (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; MIAO, 2011).

Outra clivagem realizada pela caspase-1 é a da gasdermina D, uma família de proteínas que foram recentemente descritas como executoras da via da piroptose. A clivagem da região N-terminal na proteína promove a indução da piroptose a partir da formação de poros na membrana, quebrando sua integridade. Ainda não se sabe como, mas estudos apontam que a clivagem da região C-terminal bloqueia a morte celular através de um mecanismo de auto inibição (KOVACS; MIAO, 2017; MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017).

A via não canônica da piroptose utiliza as caspases-11 e -12 e é bem descrita em modelos murinos. Em humanos, a caspase-11 é dividida em caspase-4 e -5, e sua ativação, mediada IFN- γ , na presença de lipopolissacarídeos (LPS) no citosol. Junto a isso, ocorre a liberação de IL-1 β e IL-18 a partir da interação da caspase-11 com o NLRP3, ASC e caspase-1, mecanismo ainda não muito bem esclarecido. Em humanos, a caspase-4 foi associada com a piroptose de células epiteliais e queratinócitos, enquanto que a caspase-5 foi descrita em monócitos da medula

óssea, sugerindo uma variação na resposta imune célula-dependente. Assim como na caspase-11, a caspase-5 também precisa de IFN- γ para ser ativada. A figura 12 demonstra as vias de ativação da piroptose pelas vias canônica e não-canônica (JORGENSEN; MIAO, 2015; RATHINAM et al., 2012).

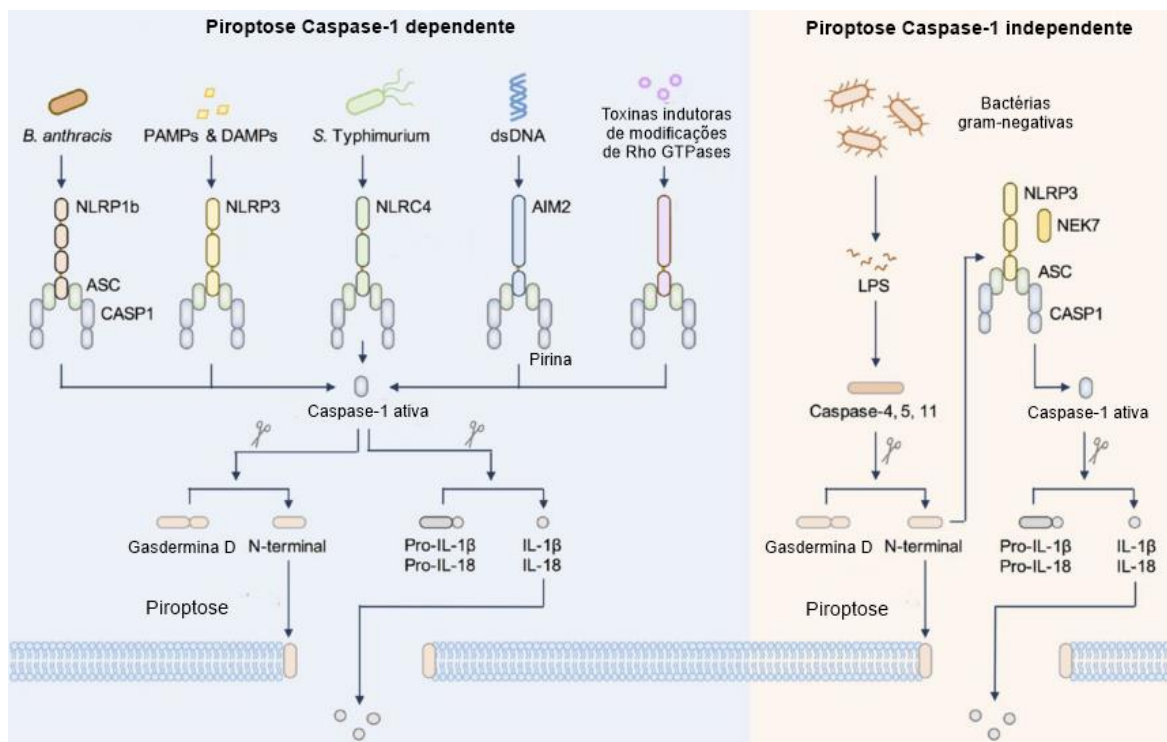


Figura 12. Ativação, desencadeamento e execução da piroptose. Adaptado de (MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017).

Sabe-se que cada padrão de reconhecimento de patógeno desencadeia a ativação de um tipo de inflamassoma diferente. Por exemplo, o NLRP3 ativa tanto DAMPs quanto PAMPs na via canônica e (LPS) na via não canônica; o AIM2 está associado a presença de ácido nucleico no citoplasma; O NLRP1b associa-se com a resposta contra o *Toxoplasma gondii*; O NLRC4 é ativado na presença de três conteúdos antigênicos da *Salmonella Typhimurium*. Logo, diversos sensores antigênicos dependentes são responsáveis por um objetivo comum, a ativação da piroptose (BOUCHER; CHEN; SCHRODER, 2016; JORGENSEN; MIAO, 2015).

Na morte celular por piroptose em casos de infecções virais, dois modelos de inflamassoma são destacados, o NLRP3 e o AIM2. Apesar do NLRP3 estar associado a diversos PAMPs, na defesa contra vírus, pode ser ativado a partir da detecção do material genético do vírus. Estudos têm demonstrado que o RNA viral é capaz de ativá-lo na infecção pelo Influenza A e HIV-1, bem como a via do AIM2, que é ativada a partir do reconhecimento de DNA dupla fita no citosol (ALLEN et al., 2009; AMSLER; MALOULI; DEFILIPPIS, 2013; GRAM; FRENKEL; RESSING, 2012).

2.4.3 Papel da piroptose na infecção pelo HIV-1

Durante muitos anos, acreditou-se que a grande parcela da depleção do sistema imune na infecção pelo HIV era devido a morte celular por apoptose, das chamadas células permissivas. Neste processo, as células permitem a entrada do HIV-1 e após o ciclo viral concluído, a célula ativa a apoptose via caspase-3, promovendo sua autodestruição. Como resultado, se tem a morte das células CD4+, juntamente com a produção de novas partículas virais (ELMORE, 2007b; MHAWEJ et al., 2009).

Ensaios, utilizando cultura de tecido linfóide humano agregados, demonstraram que a infecção pelo HIV-1 produzia uma perda massiva de células T CD4+, porém não através de células permissivas, mas sim de células denominadas abortivas, na proporção de 5% e 95%, respectivamente. Adicionalmente, a morte celular acontecia de maneira dependente de caspase-1, não de caspase-3, como na apoptose (DOITSH et al., 2010).

Atualmente, sabe-se que este mecanismo de células abortivas se dá através da atenuação do processo de transcrição reversa no ciclo viral, onde o acúmulo de

transcritos de DNA incompletos promove a ativação de sensores celulares, como o IFI16, que atua na ativação de interferon e outras moléculas mediadoras da resposta imune inata. Posteriormente, ocorre a formação do inflamassoma (semelhante ao AIM2), desenvolvendo assim toda a interação e ativação de proteínas que culmina na morte celular por piroptose (Figura 13).

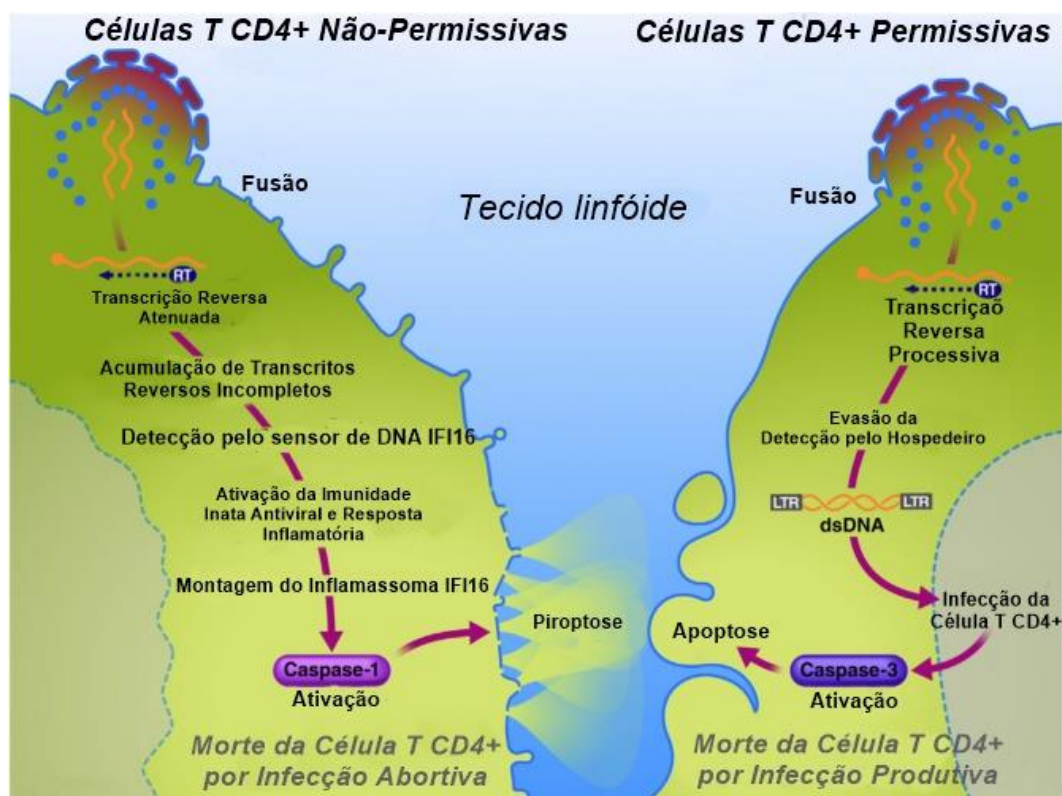


Figura 13. Mecanismo das células permissivas e não-permissivas a infecção pelo HIV-1. Adaptado de (DOITSH; GREENE, 2016).

Como características deste processo, são formados poros na membrana promovendo liberação de conteúdo celular, bem como liberação de citocinas para recrutamento de novas células e desenvolvimento de inflamação. Assim sendo, a diferença entre apoptose e piroptose pode afetar, consideravelmente, a patogênese viral, sobretudo o estado inflamatório e a ativação imune nos indivíduos infectados (DELL'OSTE et al., 2015; DOITSH et al., 2014; MONROE et al., 2014).

Apesar de diversos estudos associarem apenas a montagem do inflamassoma IFI16 na via da piroptose mediada pela infecção do HIV-1, a

interação com o NLRP3 tem sido postulada a partir da capacidade que o RNA viral tem de interagir com os TLRs 7 e 8 em diferentes tipos celulares. Estudos utilizando monócitos apontaram que a produção de IL-1 β necessita da ativação de caspase-1, e que NLRP3 é necessário para a maturação da IL-1 β . Outro estudo com células T CD4+, que expressavam o co-receptor CCR5, demonstrou que estas produziam pró-IL-1 β e outros componentes da formação de NLRP3, sugerindo que NLRP3 é uma das vias de ativação da piroptose durante o processo de infecção pelo HIV-1 (BRUCHARD et al., 2015; GUO et al., 2014; HERNANDEZ; LATZ; URCUQUI-INCHIMA, 2014).

A piroptose constitui uma das principais vias de defesa em diversos organismos celulares, porém, na infecção pelo HIV-1, aparentemente, isto não ocorre. Acredita-se que a piroptose se apresenta como um ciclo patogênico vicioso, em que são liberados estímulos inflamatórios, recrutando mais células nos sítios de infecção, promovendo mais morte celular. Dessa forma, diz-se que a ativação da via da piroptose acaba por ser uma forma de ativação imunológica crônica nos tecidos linfoides, contribuindo assim para o desenvolvimento da AIDS (Figura 14) (DOITSH et al., 2014; DOITSH; GREENE, 2016; GAIHA; BRASS, 2014).

Apesar da carga viral ser mensurada no sangue, o principal sítio de replicação do HIV-1 se dá nos tecidos linfoides, de modo que, na ausência de patógenos, células T naives (ou virgens) podem permanecer por horas dentro dos tecidos linfoides antes de migrar para a corrente sanguínea. Uma vez que nos tecidos linfoides as células T estão em contato direto, a liberação de citocinas e a ativação célula-célula faz com que a quantidade de morte nestes tecidos seja maior, quando comparado com as células T do sangue, que podem permanecer num

estágio de células permissivas, gerando uma infecção produtiva (DOITSH; GREENE, 2016; MUÑOZ-ARIAS et al., 2015).

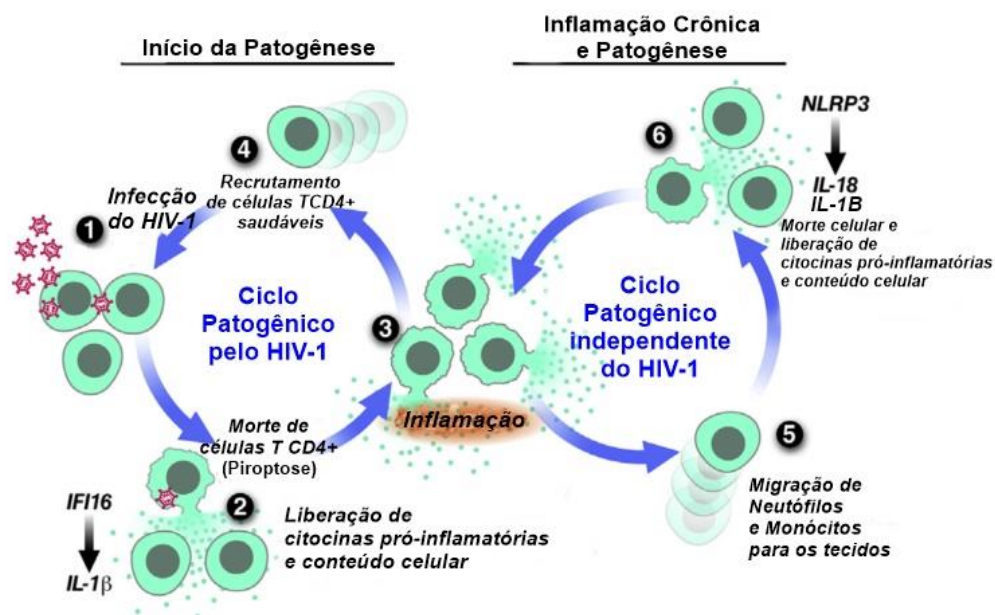


Figura 14. Mecanismo geral da piroptose na problemática do HIV-1. Ativação da piroptose no tecido linfóide e persistência da inflamação independente da replicação viral, promovendo um estágio crônico de inflamação e ativação imunológica. Adaptado de (DOITSH et al., 2014).

Ainda no aspecto da interação entre células durante a infecção pelo HIV-1, a interação célula-célula compõe uma abordagem significativa. Estudos observaram que as células permissivas ao vírus se apresentam como unidades de morte para as células abortivas nos tecidos linfóides, demonstrando assim que estas não constituem vias independentes, mas sim uma cascata entrelaçada de morte por piroptose, através de um mecanismo denominado sinapse virológica entre estas células (DOITSH et al., 2014; GALLOWAY et al., 2015).

A sinapse virológica é constituída através do recrutamento de moléculas de adesão, como: o LFA-1 (do inglês, *integrin leukocyte function-association antigen 1*) e seu ligante, a molécula de adesão intracelular tipo 1 (ICAM-1), garantindo a estabilidade da interação célula-célula, promovendo a disseminação da infecção viral. Curiosamente, enquanto ocorre a estreita relação entre estas células, ocorre

concomitante a ativação da infecção abortiva, mediando assim a inflamação e a progressão na destruição através da piroptose (DOITSH; GREENE, 2016; GALLOWAY et al., 2015).

Dado todo o contexto da piroptose na infecção pelo HIV-1, e como as vias de morte desempenham um papel crucial na modulação da resposta imunológica, a investigação de como variáveis genéticas podem influenciar no desenvolvimento e exacerbação desta, via torna-se uma abordagem relevante. Dessa forma, a análise de polimorfismos em genes da via da piroptose é justificável, propiciando a execução de estudos com o intuito de esclarecer aspectos tanto teóricos quanto clínicos na falha imunológica dos indivíduos que fazem uso de terapia antirretroviral.

2.4.4 Genes e proteínas da via da piroptose

2.4.4.1 NLRP3

A proteína NLRP3, do inglês, *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*, é sintetizada a partir do gene *NLRP3*, localizado no braço longo do cromossomo 1 (q44), sendo descritos pelos bancos de dados entre 10 e 11 éxons (9 e 10 íntrons, respectivamente), no qual são produzidos 8 transcritos *splicing* variantes (Figura 15).



Figura 15. Localização e estrutura do gene *NLRP3*. Adaptado de (<http://www.genecards.org>, acesso em 22 de maio de 2018).

Estruturalmente, o inflamassoma NLRP3 é formado por um domínio central de ligação a nucleotídeo (NOD), um domínio de repetição rico em leucina na região C-terminal, e o domínio N-terminal constituído por pirina. Devido a essa estrutura, a região N-terminal precisa interagir com o ASC para determinar a ativação das caspases e posterior piroptose. O modelo do inflamassoma formado a partir do NLRP3 é um dos modelos mais bem caracterizados e amplamente expressos, sendo observado em monócitos, macrófagos, células dendríticas, astrócitos, linfócitos, neutrófilos, dentre outros tipos celulares, além de ser também o inflamassoma com maior capacidade de ligação a PAMPs e DAMPs dentre os demais (BRUCHARD et al., 2015; ELLIOTT; SUTTERWALA, 2015; SONG et al., 2015).

São descritos como potenciais ativadores do NLRP3 parede celular de microorganismos, ácidos nucleicos, toxinas formadoras de poros, poluentes ambientais cristalinos (sílica, amianto ou alúmen) e ainda sinais de perigo endógenos (ATP e ácido úrico). Devido a esta vasta capacidade de iniciadores,

mecanismos exatos aos quais cada um está diretamente ligado ainda são desconhecidos (PARAMEL; SIRSJÖ; FRANSÉN, 2015).

A ativação do NLRP3 pode ser dividida em dois passos, sendo o primeiro deles, a ligação de PAMPs e DAMPs aos receptores de membrana do tipo *toll like* (TLRs). Esta primeira interação promove na célula uma cascata de sinalização que ativa o fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$), que por sua vez regula a transcrição de componentes ligados ao inflamassoma, como o NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18. O segundo passo é a oligomerização do NLRP3, com a formação do inflamassoma, interação com o ASC e a ativação da caspase, seguindo com todo o curso da piroptose. Nesse aspecto, outros modelos têm sido postulados, sendo o primeiro deles baseado no ATP como agonista do NLRP3, o segundo considerando que espécies reativas de Oxigênio (ROS) como responsáveis pela ativação, e o terceiro relacionado a danos ou disfunção mitocondrial (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; SONG et al., 2015).

Devido à importância do NLRP3 em processos inflamatórios, crônicos e infecciosos, diversos polimorfismos têm sido avaliados na tentativa de avaliar a susceptibilidade dos indivíduos às diversas patologias. Assim, polimorfismos tanto que atuam na estrutura da proteína quanto que regulem a expressão dos genes têm sido descritos. O polimorfismo (rs10754558 C>G) no gene *NLRP3* (região 3'UTR) tem sido estudado em processos infecciosos (infecção pelo HIV-1, HTLV-1) (KAMADA et al., 2014; PONTILLO et al., 2010), processos neoplásicos (mesotelioma) (PONTILLO et al., 2012c), bem como doenças hematológicas (síndrome mielodisplásica) (MIAN et al., 2015), inflamatórias (doença celíaca e a doença arterial coronariana) (PONTILLO et al., 2011; ZHOU et al., 2016) e autoimunes (SHAW et al., 2011).

Funcionalmente, este polimorfismo tem sido descrito como sítio de ligação para diversos micro-RNAs, podendo ter consequências na expressão gênica. O banco de PoliMRTS Database 3.0 (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/search.php> acessado em 11 de setembro de 2017) traz 6 possibilidades de miRNA que podem se ligar na posição do SNP (miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-589-5p, miR-7153-5p, miR-549a e miR-3529-3p).

2.4.4.2 CARD8

O gene *CARD8* está localizado no braço longo do cromossomo 19 (q13.33), constituído de cerca de 20 éxons, e sendo descritos mais de 12 transcritos *splicing* variantes (Figura 16), sendo principalmente expresso em células mononucleares do sangue periférico, tecidos linfoides e baço. Destas isoformas geradas, cinco tem sido bem descritas, estando alguns associadas a funções discordantes, como a isoforma de 48kDa, que interage diretamente com a caspase-1, enquanto a de 54kDa está associada com a supressão da ativação caspase-1 dependente (RAZMARA et al., 2002; TANGI et al., 2012).

Estruturalmente, o CARD8 é uma proteína da família CARD, sendo composto por uma região N-terminal com um domínio denominado FIIND (do inglês, *N-terminal domain function to find*) e um domínio CARD na região C-terminal. Duas formas de interação para a ativação da caspase-1 são descritas, sendo inicialmente postulada a partir da interação homofílica CARD-CARD como regulador negativo da ativação da caspase-1. A segunda se dá a partir da interação do domínio FIIND do CARD8 com o NOD do NLRP3; outros modelos de interação ainda são sugeridos, sendo ainda a forma de interação considerada uma incógnita (ITO; HARA; KUBOTA, 2014; VON KAMPEN et al., 2010).

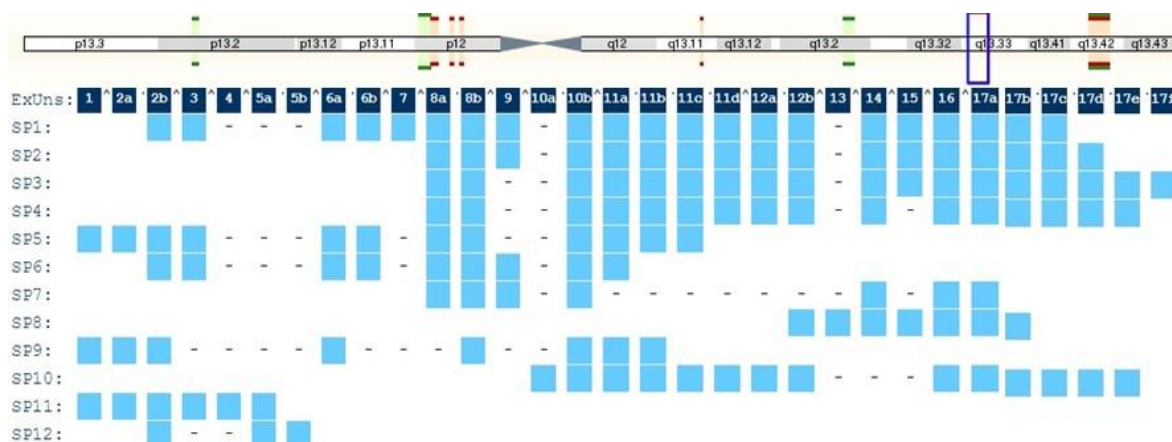


Figura 16. Localização e estrutura do gene *CARD8*. Adaptado de (<http://www.genecards.org>, acesso em 22 de maio de 2018).

Estudos têm demonstrado que a proteína de ativação e recrutamento de caspases tipo 8 denominada *CARD8* atua como regulador negativo do inflamassoma NLRP3 de duas formas. Na primeira, a proteína *CARD8* se liga estruturalmente no NOD e PRR do NLRP3, e interage também com o ASC, fazendo com que, atue como regulador negativo do NF- κ B, não ocorrendo ativação de caspase-1. A outra forma se dá através da inibição específica do NOD, sobretudo o NOD2, impedindo a oligomerização e consequente ativação do inflamassoma (ITO; HARA; KUBOTA, 2014; ROBERTS et al., 2010; VON KAMPEN et al., 2010).

O polimorfismo rs2043211 ocasiona uma alteração de A>T na sequência do gene *CARD8*, promovendo uma troca de um resíduo de cisteína na posição 10 do éxon 5 para um stop códon, produzindo, assim, uma proteína truncada, ou seja, com perda de função (KO et al., 2009). Assim como no *NLRP3*, alguns estudos têm associado o SNP rs2043211 com diversas doenças (BAI et al., 2014; JENKO et al., 2016; KIM et al., 2016; YI et al., 2015).

2.4.4.3 *IL1 β*

A interleucina IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória da família das IL-1, responsável por atuar contra infecções e injúrias no processo de defesa patógeno-hospedeiro. Dada sua potente e multivariada função na modulação do sistema imunológico, esta se apresenta como a principal interleucina desta família, sendo alvo principal de inúmeros estudos. O gene *IL1B* (Figura 17) está localizado na região 2q14.1, sendo composto por 8 éxons e 7 íntrons. Esta citocina é produzida e secretada numa forma inativa de 31kDa, antes de ser clivada (chegando a 17 kDa) e ativada (DAING et al., 2017; HAZUDA et al., 1991; SOBKOWIAK et al., 2017; TAYLOR et al., 2002).

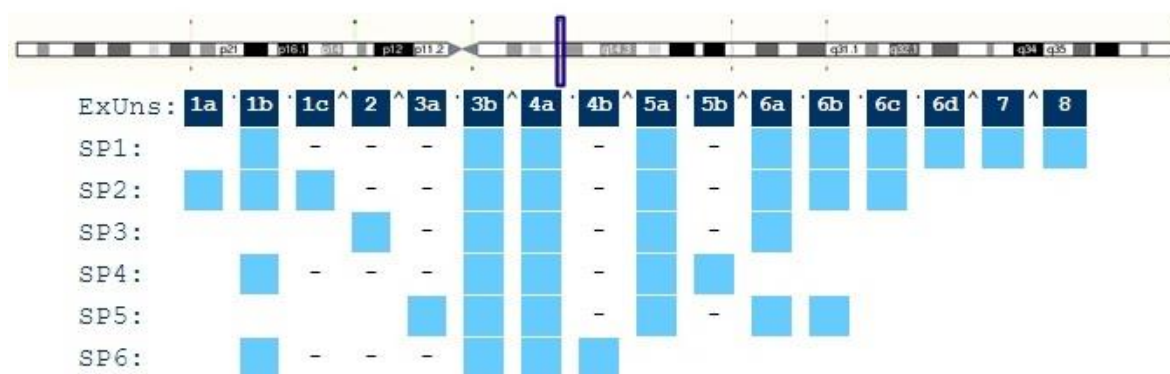


Figura 17. Localização e estrutura do gene *IL1B*. Adaptado de (<http://www.genecards.org>, acesso em 22 de maio de 2018).

A secreção da IL-1 β se dá, em sua grande maioria, através de monócitos ativados, sendo bastante amplo seu mecanismo de ação e papel que desempenha no processo da resposta imune, sobretudo no processo de ativação de diversos tipos celulares, dentre eles linfócitos T e B, neutrófilos, células do sistema imune imaturas, além de atuar na produção de proteínas de fase aguda nos hepatócitos, e secreção de proteases e prostaglandinas pelos fibroblastos e células epiteliais

(AFONINA et al., 2015; HAZUDA et al., 1991; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

Dado seu importante destaque modulação do sistema imune, a IL-1 β tem sido alvo de diversos estudos correlacionados com distúrbios presentes neste sistema, sobretudo estudos de associação em variantes no gene *IL1B* com doenças crônicas (CAMPA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014; QIAN et al., 2010), autoimunes (BORZANI et al., 2010; DOMÍNGUEZ-PÉREZ et al., 2017) e infecciosas (AHIR et al., 2013; KASZTELEWICZ et al., 2017; PONTILLO et al., 2012b).

Uma alteração sinônima (Phe105Phe) no éxon cinco (+3954) do gene *IL1B*, uma troca de G>A, tem sido destacado nos estudos de associação. Este polimorfismo apresenta-se como um possível sítio de regulação no processo de *splicing*. Além disso, também apresenta-se como tagSNP, estando em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs1071676, localizado na região 3'UTR do mesmo gene, sendo um possível sítio de ligação para microRNAs, como o miRNA-30 (OLIVEIRA et al., 2014; SOBKOWIAK et al., 2017).

2.4.4.4 *IL18*

O gene *IL18*, localizado na região 11q22.2-q22.3, é responsável pela codificação a citocina IL-18, sendo formado por 7 éxons e 6 íntrons, possuindo 5 transcritos alternativos (Figura 18). Inicialmente, esta citocina foi descrita como um fator indutor de IFN γ , sendo uma interleucina pró-inflamatória produzida na forma de pró-IL-18, contendo uma estrutura de 24kDa, posteriormente clivada pela Caspase-1 na sua estrutura ativa de 17.2kDa (BACK et al., 2014; MYUNG et al., 2015; NOVICK et al., 2013).



Figura 18. Localização e estrutura do gene *IL18*. Adaptado de (<http://www.genecards.org>, acesso em 22 de maio de 2018).

Estudos demonstraram que o primeiro passo na regulação da produção de IL-18 se dá a nível transcricional. Em estudos com camundongos, duas regiões promotoras foram caracterizadas uma na região 5' flanqueadora e outra no íntron 1, sendo responsável por produzir níveis basais do mRNA (SUGAMA et al., 2000; TONE et al., 1997).

Diversos tipos celulares são descritos como secretores de IL-18, como linfócitos T e B, monócitos e macrófagos, células epiteliais e alguns tipos de células tumorais. Funcionalmente, esta citocina desempenha diversos papéis na defesa hospedeiro-patógeno, sobretudo pela sua capacidade interativa com as interleucinas IL-12 e IL-15. Estudos têm demonstrado que, na ausência destas citocinas, a IL-18 não apresenta mecanismos muito bem concretos. Esta citocina desempenha papéis tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Por exemplo, pode atuar como um potente estimulador de IFN γ , aumentando a atividade citotóxica de células NK, e estimulando tanto a resposta Th1, quanto a resposta Th2, através de sinergismo com outras interleucinas, como a IL-2 (MEDINA et al., 2014; NAKANISHI; YOSHIMOTO; OKAMURA, 2001; NOVICK et al., 2013).

Polimorfismos na região promotora do *IL18* têm sido associados com processos patológicos. O SNP rs187238, localizado na posição -137 não-traduzida

do gene, apresenta-se como um dos principais SNPs descritos para o mesmo. A presença do alelo C (G>C) neste SNP confere uma alteração no sítio de ligação do fator de transcrição H4TF, podendo, assim, tornar a expressão do transcrito diminuída (BACK et al., 2014; LEON RODRIGUEZ et al., 2016; MYUNG et al., 2015; NAKANISHI; YOSHIMOTO; OKAMURA, 2001; NOVICK et al., 2013; TAVARES et al., 2013).

2.4.4.5 *IFI16*

O *IFI16* (do inglês, *interferon-inducible protein 16*), codificado pelo gene *IFI16*, é um importante sensor da imunidade inata, capaz de detectar, principalmente, dsDNA, e desencadear a montagem e ativação de inflamassomas, tanto no núcleo quando no citoplasma. O gene *IFI16*, um membro da família de genes indutores de interferon HIN200/Ifi200, localiza-se na região 1q23.1e é composto por 16 éxons, 15 íntrons e mais de 10 variantes de *splicing* (Figura 19) (DELL'OSTE et al., 2015).

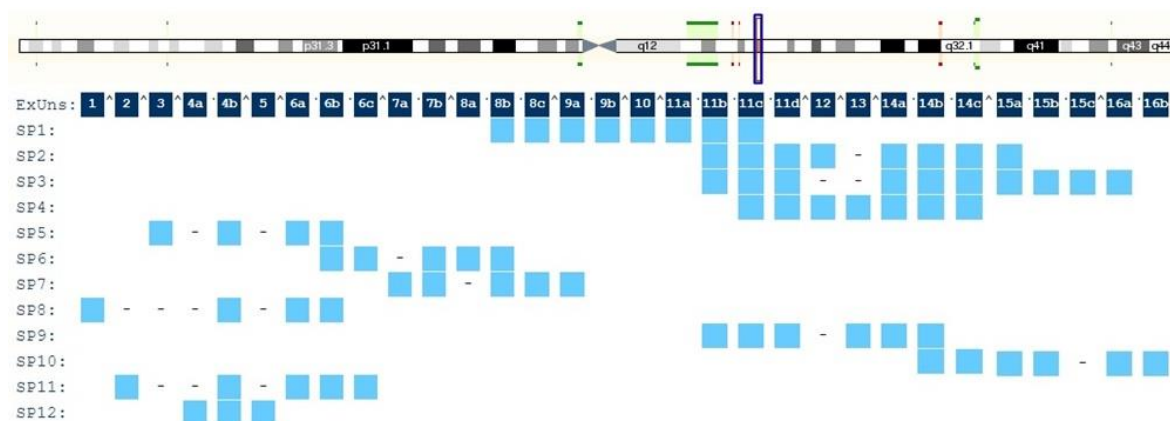


Figura 19. Localização e estrutura do gene *IFI16*. Adaptado de (<http://www.genecards.org>, acesso em 22 de maio de 2018).

Estruturalmente, o *IFI16* compartilha de um padrão de assinatura de 200 aminoácidos (HIN), sendo constituído por duas regiões HIN (denominadas A e B),

separadas por uma região espaçadora. Os domínios HIN permitem a interação entre a proteína IFI16 e as moléculas de DNA. A região espaçadora tem seu tamanho controlado por *splicing* alternativo, dadas as variantes que podem ser encontradas. Observa-se ainda um domínio PYRIN, necessário para a interação e ativação da via caspase (DELL'OSTE et al., 2015; JONSSON et al., 2017; STRATMANN et al., 2015).

Constitutivamente, o IFI16 apresenta uma ampla expressão, sendo descritas células hematopoiéticas (principalmente linfócitos), queratinócitos, o endotélio vascular, células epiteliais, fibroblastos, dentre outros. Dada sua distribuição, diversos estudos têm avaliado funções biológicas para o IFI16, como a resposta a danos ao DNA, crescimento celular, promoção de apoptose, senescência celular e regulação da diferenciação celular. Devido seu papel no desenvolvimento do sistema imune, diversos estudos têm sido realizados, buscando associação em variantes no gene *IFI16* com doenças crônicas (KONDO et al., 2012; ORTIZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; YANG et al., 2017), autoimunes (ALUNNO et al., 2015, 2016; GUERINI et al., 2014; STUNKARD, 2009) e infecciosas (BOOIMAN; KOOTSTRA, 2014; LUPFER; ANAND, 2016).

O SNP rs6940, localizado na posição +2942 do gene *IFI16*, é uma variante missense (A>T) que acarreta a troca do aminoácido treonina por serina (T723S). O aspecto funcional deste SNP ainda não está muito claro, mas por ser um *tag* SNP, estudos mostram que este se apresenta em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs2793845 do gene *AIM2*, formando um bloco haplotípico, podendo, assim, ter sua alteração influenciada por esse SNP. Ensaios *in silico* tem demonstrado que, apesar de não estar na região HIN200 do IFI16, a troca do aminoácido se localiza entre a região C-terminal do sítio de ligação HIN200-1/p53

e ao domínio de ligação nuclear HIN200-2/p53, podendo interferir na estrutura 3D da proteína, e consequentemente na sua função (MARCHESAN et al., 2017; ORTIZ-FERNÁNDEZ et al., 2015).

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DE ESTUDO E SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), o qual ofereceu toda a infraestrutura requerida para a pesquisa. Toda a metodologia do estudo foi previamente aprovada pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do IMIP (protocolo número 3629-13) (Anexo A).

Trata-se de um estudo observacional, do tipo caso-controle, em que os indivíduos que apresentam as características referentes à falha imunológica foram considerados casos, e os que não apresentaram foram considerados controles. A população utilizada no estudo consistiu em indivíduos vivendo com o HIV-1 recebendo tratamento antirretroviral em atendimento no Hospital Dia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), sendo indivíduos do Recife, Região Metropolitana e cidades do interior do Estado.

Os indivíduos foram selecionados através de amostragem por conveniência. Foram selecionados indivíduos que obrigatoriamente correspondiam aos critérios de inclusão do estudo, sendo eles: ter entre 18 e 65 anos, estar em TARV há mais de um ano sem troca do esquema terapêutico devido a falha virológica, boa adesão ao tratamento. Utilizou-se como critérios de exclusão: gravidez no momento da coleta, presença de doenças autoimunes e histórico de uso de drogas injetáveis.

Após apresentação do estudo, os indivíduos que se dispuseram a participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B e C), concedendo autorização para a coleta de amostra de sangue para a realização de procedimentos posteriores.

3.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO A FALHA/SUCESSO IMUNOLÓGICO

Os indivíduos selecionados foram, inicialmente, classificados quanto ao *status* terapêutico, ou seja, se estava em falha ou sucesso virológico. Indivíduos em sucesso virológico foram agrupados, retrospectivamente, de acordo com os ganhos na contagem de células T CD4+, comparandoos valores pré-tratamento (*baseline*) com os valores após um ano de terapia.

A classificação quanto a falha imunológica foi realizada de acordo com os critérios de Li et al. (2011), no qual sucesso imunológico foi definido como ganho igual ou superior a 200 células/ μ L com supressão da replicação viral (ou seja, níveis abaixo dos limites de detecção de carga viral plasmática <50 céls/ μ L), enquanto a falha imunológica seria o ganho inferior a 200 células/ μ L, apesar de terem apresentado supressão viral. Os indivíduos para os quais não foi possível encontrar a *baseline* de células T CD4+ durante revisão dos prontuários clínicos, foram classificados de acordo com os critérios do Ministério da Saúde (2013), que considera o sucesso imunológico quando a porcentagem de células T CD4+ (a relação entre linfócitos T CD4+ e o total de linfócitos) atinge níveis de 30% ou maiores após um ano de tratamento, e em falha os que obtiveram valores abaixo disso.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Após o indivíduo aceitar o convite para participar da pesquisa com assinatura do TCLE, foram coletados 4 mL de sangue periférico em tubos EDTA para a realização da extração do DNA genômico através do protocolo de *mini salting-out*, estabelecido por Miller et al. (1988).

A pureza do DNA foi avaliada utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (ThermoFisher), considerando a razão entre as absorvâncias 260/280nm e 260/230nm. As amostras consideradas satisfatórias apresentaram valor igual ou superior a 100 ng/ul de DNA, a razão 260/280 nm entre 1.8 e 2.2 e a razão 260/230 ao redor de 2.0. Após isso, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.4 SELEÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPS)

Os critérios de seleção foram a frequência do alelo minoritário (MAF) ser maior que 10% nas populações europeia, ameríndia e africana, considerando as respectivas subpopulações CEU, PUR e YRI, além do impacto funcional dos SNPs. Estas populações foram escolhidas uma vez refletem o padrão miscigenado do país, baseado no seu processo de colonização. A tabela 4 demonstra as frequências observadas para cada um dos genes e os respectivos polimorfismos selecionados.

Tabela 4. Frequência alélica mínima dos SNPs selecionados para o estudo.

Polimorfismo	MAF global	MAF CEU	MAF YRI	MAF PUR
<i>NLRP3</i> rs10754558 (C>G)	35%	22%	33%	38%
<i>CARD8</i> rs2043211 (A>T)	32%	28%	16%	37%
<i>IL1B</i> rs1143634 (G>A)	13%	23%	10%	17%
<i>IL18</i> rs187238 (G>C)	21%	27%	20%	28%
<i>IFI16</i> rs6940 (A>T)	23%	10%	30%	10%

Fonte: Disponível em <http://phase3browser.1000genomes.org/index.html> (Acesso em 26/05/2018)

MAF – Frequência do alelo minoritário; **CEU** – população representativa dos caucasianos; **YRI** – população Yoruba, representativa africana; **PUR** – população representativa ameríndia.

3.5 GENOTIPAGEM

A genotipagem foi realizada através de PCR em tempo real, utilizando sondas alélico-específica TaqMan® para os SNPs nos genes *NLRP3* rs10754558 (c__26052028_10), *CARD8* rs2043211 (c__11708080_1), *IL18* rs187238 (c__2408543_10); *IL1B* rs1143634 (c__9546517_10) *IFI16* rs6940 (c__7483779_10), tanto em indivíduos em falha quanto em sucesso imunológico

As reações foram preparadas em um volume final de 5 µL, dos quais foi utilizando 2,5 µL de Taqman Genotyping Master Mix (Thermofisher, Foster City, EUA), 0,25 µL de sonda Taqman na concentração de 20 vezes (Thermofisher, Foster City, EUA) e 1,25 µL de H₂O ultrapura e 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL. Uma vez preparadas, a amplificação foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95° por 30 segundos e 60°C por 1:30 minutos, utilizando a plataforma em tempo real ABI® 7500 (Applied Biosystems), disponibilizada no Laboratório de Biologia Molecular do LIKA – UFPE. A análise dos resultados foi executada com o auxílio de softwares específicos acoplados à plataforma utilizada.

3.6 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS)

Após coleta de 4 mL de sangue periférico em tubo de EDTA, este foi colocado em um tubo cônico de 15 mL, acrescido de 4 mL de PBS 1X para a diluição na proporção de 1:1, com posterior homogeneização. Em seguida, foi adicionado em outro tubo cônico 5 mL de *Ficoll Histopaque* (Sigma Aldrich),

acrescido, cuidadosamente, da amostra de sangue antes diluída. A amostra foi centrifugada a 400g por 30 minutos, a 18-20°C em *no break*.

Após a centrifugação, foram observadas quatro fases: uma de hemácias, seguida pela camada de Ficoll, a nuvem de PBMCs, e a última camada, composta por plasma. Com o auxílio de pipeta Pasteur, foi aspirada a fase composta pelas células mononucleares e transferida para outro tubo cônico de 15 mL. Em seguida, realizou-se uma primeira lavagem com PBS 1x, com 3x o volume da aspiração (aproximadamente 6 mL), por 100g por 10 minutos, à temperatura de 18-20°C. Logo após, foi descartado o sobrenadante, e o *pellet* de células foi ressuspensão em 4 mL de PBS 1x, e mais uma vez centrifugado por 10 minutos a 100g, a 18-20°C. Por fim, mais uma vez foi descartado o sobrenadante, e o precipitado de células foi ressuspensão em 1 mL de tampão FACS, estando então as células prontas para uso.

3.7 CONTAGEM E VIABILIDADE DAS CÉLULAS

Após as células serem ressuspensas em tampão FACS, foi preparada a amostra para a contagem celular. Assim, 20 µL foram utilizados para a contagem de células através da Câmara de Neubauer, dos quais 18 µL foram da suspensão de células e 2 µL foram de azul de Tripán (fator de diluição 1:10). Este corante atua também na viabilidade das células, de modo que as células que possuem membrana intacta não se coram, estando então viáveis para posterior utilização, enquanto que quando há dano nas células, estas se coram, sendo então inviáveis para posterior análise. Após a homogeneização do corante com a suspensão de células, esperou-se por 5 minutos para ação do Azul de Tripán, e em seguida, iniciada a contagem de células.

Na câmara de Neubauer, adicionou-se 10 µL da diluição e realizou-se a contagem por meio de microscopia óptica na objetiva de 40x. Para a análise da concentração de células por mL, aplicou-se a fórmula abaixo, em que se considera a quantidade de células e o número de quadrantes contados, a proporção da diluição:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Número de Células} \times 10.000}{\text{Número de quadrantes} \times \text{diluição}}$$

Após a contagem, dependendo do número total de células contadas, foram separadas entre $3\text{-}5 \times 10^5$ células para posterior marcação da citometria de fluxo. Assim, se a contagem da Câmara de Neubauer foi de aproximadamente 3×10^6 (3 milhões de células), foi distribuído em cada tubo de marcação 100 µL da suspensão de células (aproximadamente 300 mil células). Nos casos em que a contagem foi inferior ao valor citado, um volume um pouco maior da suspensão de células foi colocado nos tubos, entre 150 µL e 200 µL.

3.8 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para o presente estudo, foram avaliados dois painéis de marcação de citometria de fluxo, sendo utilizado em ambos os painéis os anticorpos anti-CD4 marcado com alofococianina (APC) e anti-CD31, marcado com ficoeritrina (PE); o marcador FLICA (do inglês, *Fluorescent Labeled Inhibitors of CAspases*), marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi utilizado no painel 1 como marcador de morte por caspase-1 (Tabela 5).

Diferente dos demais marcadores, o FLICA possui um protocolo de marcação próprio. Inicialmente são adicionados ao tubo de marcação 290 µL de

células ressuspensas em tampão FACS. Em seguida, adicionou-se 10 µL de solução FLICA 30x, formando um volume final de 300 µL. Para esta, se faz a diluição do FLICA estoque na concentração de 150x, na proporção de 1:5. Assim, foi aspirado 2 µL de FLICA 150X e 8 µL de água milli-Q. Logo após as células marcadas com o FLICA são incubadas a 37°C por 30 minutos protegido da luz, com ressuspensões agitando o tubo a cada 10 minutos. Passado o tempo de incubação, foi adicionado 2 mL de *Buffer* Apoptose 1x, e centrifugado a 400g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido cuidadosamente, e o *pellet* ressuspenso em 300 µL de *Buffer* Apoptose 1x, estando agora pronto para a marcação com os demais marcadores.

Tabela 5. Marcadores e populações celulares avaliadas.

Marcador	Análise
CD4+ FLICA +	Morte por piroptose de Linfócitos T CD4+ geral
CD4+CD31/FLICA+	Morte por piroptose de Linfócitos T CD4+ recém emigrados do Timo

Foi adicionado então, para conclusão do painel 1, 5 µL de anti-CD4, e 2,5 µL de anti-CD31. No painel 2, foram adicionados também 5 µL de anti-CD4, e 2,5 µL de anti-CD31, Anexina V e PI. Em seguida, todos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente protegidos da luz. Uma vez incubados, foi adicionado 1 mL de *Buffer* Apoptose 1x ao tubo do painel 1 e 1 mL de tampão FACS ao tubo referente ao painel 2, seguidos de centrifugação a 400g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 300 µL de PBS-Formol 1% para análise no citômetro.

A análise foi realizada com o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) com obtenção de, no mínimo, 20.000 eventos por

amostra. As células foram visualizadas em gráfico de pontos (*dot plot*) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), para identificação da população celular de interesse. Em seguida, realizou-se um *gate* para delimitar a região dos linfócitos, excluindo os dupletos e debris. As análises gráficas foram realizadas no *software* FCS Express 6 Plus®.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no programa R, versão 3.5.0. As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas por contagem direta. Para verificar se as frequências estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o teste de distribuição de χ^2 . As análises de tamanho amostral foram realizadas no *software* G*Power®, onde o teste power pós-roc foi avaliado para todos os genes, verificando se o tamanho populacional está de acordo para a hipótese estabelecida.

A influência das variáveis sexo, tipo de esquema da TARV, contagem de células T CD4+, sorologias de sífilis, toxoplasmose e hepatites B e C dentre outras que podem atuar na ocorrência de falha imunológica foi verificada por meio do teste exato de Fisher de maneira univariada. A possível associação dos polimorfismos com a falha imunológica também foi avaliada pelo teste exato de Fisher. A influência da idade no início do tratamento, peso e intervalo entre diagnóstico e início da terapia para a ocorrência de falha imunológica foi avaliada com o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney, uma vez que os valores de idade não apresentaram distribuição normal.

Os dados obtidos através do citômetro de fluxo para a comparação entre os grupos foram avaliados inicialmente através do teste de Shapiro-Wilk, para avaliar se os dados apresentavam distribuição normal. Quando sim, foi utilizado o Teste-T como teste de associação entre os grupos caso e controle, e quando não se observou distribuição normal, utilizou-se o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

O nível de significância estatística foi estabelecido em $\alpha < 0.05$ para todos os testes. *Odds ratios* (OR) e seus respectivos intervalos de confiança a 95% foram calculados quando possível.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E LABORATORIAL

Foram recrutados para esse estudo 443 indivíduos, entre os anos de 2011 e 2014. Destes, 248 obtiveram sucesso virológico no primeiro ano de terapia, sendo estes inclusos nos testes de associação com a falha imunológica. Baseados no ganho de células T CD4+ após um ano de terapia como mencionado anteriormente, estes foram classificados em grupos caso e controle, sendo classificados como em falha imunológica (caso) 126 indivíduos (62 do sexo masculino e 64 do sexo feminino) e em sucesso imunológico (controles) 122 indivíduos (45 do sexo masculino e 77 do sexo feminino).

A mediana de idade ao início da terapia observada entre os indivíduos foi de 32 anos tanto no grupo caso (29 – 39) quanto no grupo controle (28 – 36). A análise do peso dos indivíduos demonstrou o grupo de falha imunológica com uma média de 61,5kg (55kg – 70,5) enquanto os indivíduos em sucesso demonstraram uma média de 64kg (54kg – 75kg). Quanto à etnia (por autodeclaração), tanto o grupo caso quanto o grupo controle demonstraram uma maioria parda, com uma frequência de 47% e 43%, respectivamente.

A análise das variáveis epidemiológicas e clínicas (Tabela 5) dos pacientes mostrou que não houve variações clínicas significativas entre os grupos caso e controle para as variáveis estudadas na população: sexo, etnia, fumo, etilismo, peso, tempo para início da terapia, idade no início da terapia, esquemas terapêuticos contendo AZT ou IP/r, troca de esquema e sorologias para sífilis, hepatites B e C e toxoplasmose. Porém, uma das variáveis mostrou significativa influência, a contagem de células T CD4+ pré-tratamento: Indivíduos que iniciaram

o tratamento com um menos de 350 células T CD4+/ μ L apresentaram uma maior probabilidade de desenvolver a falha imunológica (p -value=0,0001).

Tabela 6. Testes de associação com as variáveis demográficas, epidemiológicas e clínicas (teste Exato de Fisher, exceto para peso, idade e tempo de início da terapia).

Variável		Caso n=126 (%)	Controle n=122 (%)	p-value
Sexo (n=248/248)	Masculino	62 (49)	45 (37)	0,06*
	Feminino	64 (51)	77 (63)	
Etnia (n=248/248)	Branca	29 (23)	36 (30)	0,55
	Parda	59 (47)	53 (43)	
	Negra	37 (15)	33 (27)	
Fuma (n=98/248)	Indígena	1 (1)	0 (0)	0,09
	Sim	4 (24)	11 (11)	
Etilismo (n=98/248)	Não	45 (46)	38 (39)	0,12
	Sim	11 (11)	19 (19)	
Peso (IIQ) (n=239/248)**	Não	38 (39)	30 (31)	0,29
	Sim	61,5(55-70,5)	64 (54-75)	
Tempo para início da terapia após diagnóstico, meses (IIQ) (n=202/248)**		3 (1-18,5)	8 (1,5-27)	0,05*
Idade no início do tratamento (IIQ) (n=238/248)**		32(29-39)	32(28-36)	0,21*
Esquema com IP/r (n=196/248)	Sim	34 (17)	44 (22)	0,11*
	Não (uso de INNTR)	66 (34)	52 (27)	
Esquema com AZT (n=195/248)	Sim	88 (45)	82 (42)	0,52*
	Não (uso de TDF)	11 (6)	14 (7)	
Troca de esquema (n=212/248)	Sim	12 (6)	4 (2)	0,07
	Não	100 (47)	96 (45)	
Contagem células T CD4+ pré-tratamento <350 cels/μL (n=232/248)	Sim	100 (49)	69 (34)	<0,001*
	Não	7 (3)	29 (14)	
Sorologias – Status de coinfeções				
Sífilis (teste VDRL) (n=152/248)	Positivo	13 (8)	10 (6)	0,65
	Negativo	64 (42)	65 (43)	
Toxoplasmose IgG (n=36/248)	Positivo	10 (28)	15 (42)	0,48
	Negativo	6 (16)	5 (14)	
CMV IgG (n=35/248)	Positivo	14 (40)	19 (54)	0,20
	Negativo	2 (6)	0 (0)	
Hepatite C (n=87/248)	Positivo	0 (0)	2 (3)	0,18
	Negativo	50 (57)	35 (40)	
Hepatite B (n=118/248)	Suscetível	28 (24)	18 (15)	0,09
	Imune:Natural/Vacinação	32 (27)	40 (34)	

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

**Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. AZT = zidovudina/azidotimidina; CMV = citomegalovírus; IIQ = intervalo interquartil; IgG = imunoglobulina G; IP/r = inibidor de protease com ritonavir; TDF = Tenofovir; VDRL = Venereal Disease Research Laboratory.

4.2 ANÁLISE GENOTÍPICA

Foram genotipadas cinco principais variantes de cinco genes que atuam direta ou indiretamente na ativação da via de morte celular por piroptose: *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18* e *IFI16* (Tabela 6). O número amostral (N) variou entre os genes, uma vez que algumas sondas específicas conseguiram um melhor desempenho durante o procedimento de amplificação, e em outros casos o DNA dos indivíduos esgotou-se no estoque, impossibilitando a análise. Todas as frequências avaliadas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e o teste power pós-roc foi avaliado para todos os genes, onde o N amostral da população apresentou-se representativo para a análise.

A análise do polimorfismo rs10754558 no gene *NLRP3* incluiu 206 indivíduos, sendo eles 103 do grupo caso e também 103 no grupo controle. As frequências do alelo variante G nos grupos analisados foi de 39%. A análise pelo teste exato de Fisher demonstrou que não há associação deste gene com a falha imunológica na população analisada, tanto do alelo G (OR=1,00; IC-95%=0,66 – 1,51; $p=1,00$) quanto do genótipo GG (OR=1,03; IC-95%=0,42 – 2,53; $p=1,00$).

O polimorfismo rs2043211 do *CARD8* também não demonstrou associação com a falha imunológica, nem do alelo T, nem do genótipo TT (OR=0,97; IC-95%=0,25 – 3,69; $p=1,00$ e OR=1,21; IC-95%=0,74 – 1,98; $p=0,41$, respectivamente). As frequências observadas no grupo caso foi de 26% e 30% no grupo controle, sendo analisados 181 indivíduos (88 em falha imunológica e 93 em sucesso).

A análise dos genes *IL1B* e *IFI16* contaram com um N amostral de 195 e 187 indivíduos, respectivamente. A frequência alélica da variante A (G/A) no gene *IL1B* no grupo caso foi de 23%, enquanto no grupo controle foi de 19%. A análise de

associação para este gene não demonstrou associação do genótipo AA (OR=0,39; IC-95%=0,03 – 2,5; $p=0,44$), bem como do alelo A (OR=0,81; IC-95%=0,48 – 1,36; $p=0,46$). Já para o gene *IFI16*, as frequências observadas para o alelo T foram 19% no grupo em falha imunológica e 15% no grupo em sucesso. A hipótese de que a variante no gene *IFI16* poderia estar associada com a falha imunológica na população em estudo não foi encontrada, com valores de OR=0,94; IC-95%=0,12 – 7,28; $p=1,00$ para o genótipo TT e OR=0,72; IC-95%=0,40 – 1,29; $p=0,27$ para o alelo T.

A análise realizada da variante do gene *IL18*, rs187238 G>C apresentou uma frequência do alelo C no grupo caso de 22% e no grupo controle de 33%. O teste de Fisher usado para demonstração de associação estatística com a falha imunológica apresentou que tanto o genótipo CC (OR=0,22; IC-95%=0,05 – 0,75; $p=0,009$) quanto o alelo C (OR=0,13; IC-95%= 0,08 – 0,22; $p>0,001$) estão associados com proteção a ocorrência de falha imunológica na população avaliada.

Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos avaliados entre casos e controles.

Gene SNP (ID)	Frequências Grupo Falha	Frequências Grupo Sucesso	OR (IC-95%)	p-value
<i>NLRP3</i> rs10754558	n=103/206 (%)	n=103/206 (%)		
		<i>Genótipos</i>		
CC	39 (38)	40 (39)	Referência	-
CG	48 (47)	46 (45)	0,93 (0,49 – 1,77)	0,88
GG	16 (15)	17 (16)	1,03 (0,42 – 2,53)	1,00
	n= 206/412 (%)	n= 206/412 (%)		
		<i>Alelos</i>		
C	126 (61)	126 (61)	1 (0,66 – 1,51)	1,00
G	80 (39)	80 (39)		
<i>CARD8</i> rs2043211	n= 88/181 (%)	n=93/181 (%)		
		<i>Genótipos</i>		
AA	49 (56)	43 (46)	Referência	-
AT	32 (36)	44 (47)	1,56 (0,81 – 3,02)	0,16
TT	7 (8)	6 (7)	0,97 (0,25 – 3,69)	1,00
	n= 176/362 (%)	n= 186/362 (%)		
		<i>Alelos</i>		
A	130 (74)	130 (70)	1,21 (0,74 – 1,98)	0,41
T	46 (26)	56 (30)		

Continuação

Gene SNP (ID)	Frequências Grupo Falha	Frequências Grupo Sucesso	OR (IC-95%)	p-value
<i>IL1B</i> rs1143634	n= 99/195 (%)	n=96/195 (%)		
		<i>Genótipos</i>		
GG	59 (60)	61 (64)	Referência	-
GA	35 (35)	33 (34)	0,91 (0,48 – 1,73)	0,88
AA	5 (5)	2 (2)	0,39 (0,03 – 2,5)	0,44
	n= 198/380 (%)	n= 192/380 (%)		
		<i>Alelos</i>		
G	153 (77)	155 (81)	0,81 (0,48 – 1,36)	0,46
A	45 (23)	37 (19)		
<i>IL18</i> rs187238	n= 101/194 (%)	n= 93/194 (%)		
		<i>Genótipos</i>		
GG	61 (60)	46 (49)	Referência	-
GC	36 (36)	33 (36)	1,21 (0,63 – 2,33)	0,54
CC	4 (4)	14 (15)	0,22 (0,05 – 0,75)	0,009
	n= 202/388 (%)	n= 186/388 (%)		
		<i>Alelos</i>		
G	158 (78)	125 (62)	0,13 (0,08 – 0,22)	<0,001
C	44 (22)	61 (33)		
<i>IFI 16</i> rs6940	n= 97/187 (%)	n= 90/187 (%)		
		<i>Genótipos</i>		
AA	62 (64)	66 (73)	Referência	-
AT	32 (33)	21 (23)	0,62 (0,30– 1,23)	0,19
TT	3 (3)	3 (4)	0,94 (0,12 – 7,28)	1,00
	n= 194/374 (%)	n= 180/374 (%)		
		<i>Alelos</i>		
A	156 (80)	153 (85)	0,72 (0,40 – 1,29)	0,27
T	38 (19)	27 (15)		

SNP= single nucleotide polymorphism.

OR= Odds Ratio.

IC= Intervalo de Confiança.

4.3 ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA

Realizou-se um modelo de regressão logística com os genótipos do gene *IL18* cuja variante demonstrou-se associada com a falha imunológica, integrando-o com algumas variáveis de importância clínica já relacionadas a ocorrência de falha imunológica.

Assim, como observado na análise univariada dos parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, foi observado no modelo de regressão logística que a variável que já havia demonstrado significância na primeira análise, começar tratamento com níveis baixos de linfócitos, continuou demonstrando associação

com a falha, com um risco de aproximadamente três vezes mais chance de desenvolvê-la, porém agora com a contagem de linfócitos T CD4 <350 (OR=2,60; IC de 95%= 1,20 – 5,63; *p-value*= 0,01). O sexo masculino passou a apresentar associação também com o risco de falha duas vezes maior que indivíduos do sexo feminino (OR= 2,36; IC de 95%= 1,07 – 5,16; *p-value*= 0,04). Ademais, foi observada a associação com a proteção ao desenvolvimento da falha imune em indivíduos que fazem uso da terapia utilizando Inibidores de Protease (OR= 0,47; IC de 95%= 0,23 – 0,99; *p-value*= 0,04) (Tabela 7).

Tabela 8. Variáveis utilizadas no modelo de regressão logística para explicar a ocorrência de falha imunológica.

Variáveis	OR	IC de 95%		p-value
<i>IL18</i> GG	0,9	0,38	2,15	0,82
<i>IL18</i> GC	0,98	0,35	2,72	0,97
<i>IL18</i> CC	0,30	0,06	1,40	0,13
Sexo Masculino	2,36	1,07	5,16	0,03
Idade ao Início da Terapia	1,00	0,96	1,05	0,76
Esquema terapêutico com AZT	2,66	0,71	9,94	0,15
Esquema terapêutico com IP/r	0,47	0,23	0,98	0,04
Tempo de Terapia	1,00	0,99	1,01	0,78
Contagem de linfócitos T CD4 <350+ células	2,60	1,20	5,63	0,01
Intercepto	-	-	-	0,18

OR = odds ratio.

IC = Intervalo de confiança

IP/r = inibidor de protease com ritonavir.

AZT = zidovudina/azidotimidina.

4.4 ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA

Após a aquisição de células dos pacientes dos grupos caso e controles, foram avaliadas as características das células através dos parâmetros de complexidade (SSC) e tamanho (FSC) para a caracterização adequada da população celular a ser estudada. A figura 20 mostra as características SSC e FSC observadas para a caracterização dos linfócitos, onde a área de coloração mais avermelhada representa esta população.

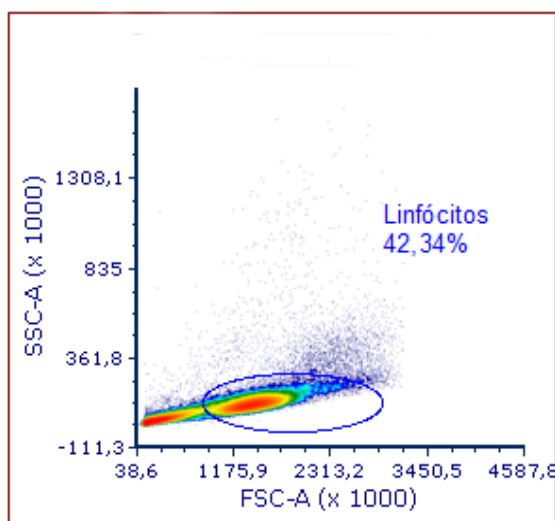
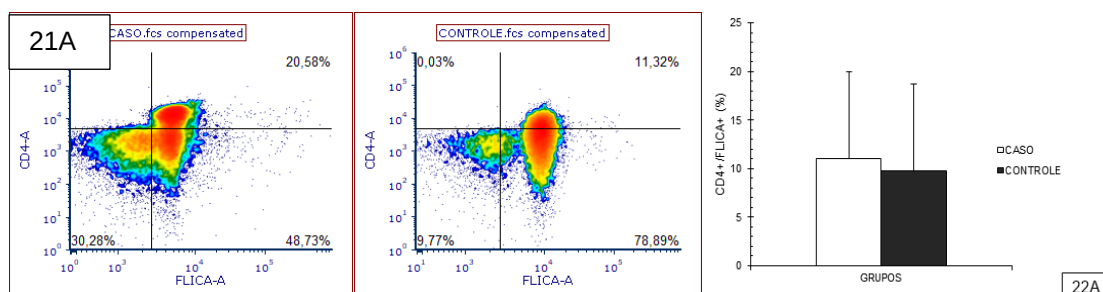


Figura 20. Dot plot por densidade da região dos linfócitos com aumento de 1000 vezes. Em vermelho, maior densidade de células expressando o marcador CD4+. SSC: Side-scattered light. FSC: Forward-scattered light;

Foram avaliadas duas populações celulares. A primeira análise considerou morte geral dos linfócitos T CD4 por piroptose (CD4+FLICA+) e a segunda consistiu em morte de linfócitos recém emigrados do timo (CD4+/CD31+FLICA+). Para estas análises, foram avaliados 17 indivíduos no grupo caso e 24 indivíduos no grupo controle. As figuras 21A e 21B mostram a porcentagem em média da população geral de linfócitos em morte celular por piroptose nos grupos caso e controle, respectivamente, enquanto as figuras 21C e 21D demonstram os valores médios dos linfócitos recém migrados do timo.



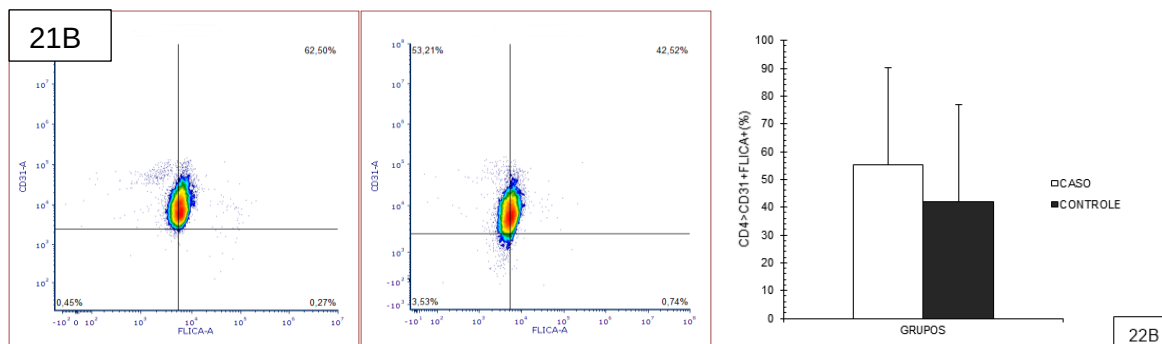


Figura 21. Populações celulares avaliadas. 21A – porcentagem de morte celular por piroptose dos linfócitos T CD4+ gerais para o grupo caso e controle, seguidos da comparação gráfica da frequência de morte por piroptose entre os grupos. 21B – morte celular de linfócitos recém emigrados do timo nos grupos caso e controle, e gráficos comparativos entre as populações de morte por piroptose de linfócitos recém emigrados do timo.

A análise comparativa entre os grupos para a primeira análise demonstrou uma média de 11,01% no grupo caso e 9,76% no grupo controle. Não foi observada diferença estatística entre a caracterização imunofenotípica dos grupos ($p=0,673$). Para a análise da segunda população, a mediana entre os grupos caso e controle foram de 56,89% e 34,50%, não apresentando também associação estatística entre os grupos ($p=0,221$).

Apesar de não demonstrarem associação estatística, a análise gráfica considerando valores de média e desvio padrão para ambas as populações apresentadas nas figuras 22A e 22B, foi observada uma maior taxa de morte por piroptose entre os indivíduos casos quando comparados aos controles para ambas as análises.

5 DISCUSSÃO

Apesar de muitos avanços na TARV na busca de uma maior eficácia na qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV-1, algumas abordagens no âmbito da terapia antirretroviral ainda permanecem sem esclarecimento (MISGENA, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A falha imunológica nos indivíduos que fazem uso da terapia é um aspecto de forte relevância, visto que a depleção de células T CD4+ é o fator determinante na susceptibilidade dos indivíduos a AIDS (PRABHAKAR et al., 2011).

De acordo com os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais obtidos dos pacientes, foi avaliado se algumas destas variáveis apresentavam associação com o desenvolvimento da falha imunológica.

A idade ao início da terapia é um dos fatores que poderia possuir significativa influência na recuperação da taxa de células T CD4+, mas, em nosso estudo, o potencial dessa variável não foi observado. Segundo Lederman et al. (2000), a recuperação da taxa de células T é inversamente proporcional à idade ao início da terapia, mesmo assim, alguns estudos não apresentam nenhuma associação, e corroboram com nossas análises (DESAI; GROLLEAU-JULIUS; YUNG, 2010; KAUFMANN et al., 2002; VIARD et al., 2001).

A presença de coinfeções como fator de prejuízo na recuperação imune dos pacientes tem sido reportada em diversos estudos (DIBYENDU et al., 2011; GONZALEZ et al., 2009; GREUB et al., 2000; LASKUS et al., 2000; LYRA et al., 2014). Por exemplo, no estudo realizado por Potter et al. (2010), foi observado que a recuperação da taxa de células T CD4+ sofre influência negativa pela presença de HCV em indivíduos coinfectados recebendo terapia. Apesar disso, a população

observada em nosso estudo não demonstrou nenhuma associação com este parâmetro.

Na análise de associação do sexo com a falha imunológica, estudos demonstraram que indivíduos do sexo masculino apresentam um maior risco de falha em relação ao sexo oposto, corroborando com os nossos dados (AIUTI; MEZZAROMA, 2006; CASTILHO; MELEKHIN; STERLING, 2014; GANDHI et al., 2006; HUNT et al., 2003). Apesar desta associação não ser muito bem compreendida, no estudo realizado por Pido-Lopez et al. (2001) foi observada uma melhor função tímica nas mulheres em comparação com a visualizada nos homens. No entanto, pesquisas têm demonstrado resultados conflitantes com os acima citados (LI et al., 2011; MOORE et al., 2001).

O esquema terapêutico utilizado na HAART possui um aspecto fundamental na recuperação imune, seja ele por toxicidade medicamentosa ou pelo desenvolvimento de resistência (CORBEAU; REYNES, 2011; KAPESA et al., 2014). Alguns estudos têm demonstrado que o AZT é um inibidor de células progenitoras hematopoieticas por ser tóxico às mesmas, dificultando a recuperação dos valores de células T CD4+. Outros estudos têm demonstrado associação do esquema com IP/r com uma proteção ao risco de desenvolver falha imunológica, indo de acordo com os resultados encontrados na regressão logística (MACARTHUR et al., 2006).

A observação de que iniciar a terapia com a contagem de células T CD4+ baixa é um importante fator de risco para a ocorrência da falha imunológica, foi de acordo com diversos outros estudos (HUNT et al., 2003; KELLEY et al., 2009; LI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2001). Isto ocorre, segundo Aiuti et al. (2006), devido a um processo induzido pelo próprio vírus, que de alguma maneira consegue atuar

na inibição da produção de novas células pelo órgãos linfóides primários ou potencializam a destruição periférica destas células.

No aspecto de alterações genéticas influenciarem na morte por piroptose como possível causa associada à ocorrência da falha imunológica, cinco variantes polimórficas em genes que atuam na ativação ou como produto dessa via de morte celular foram avaliadas, *NLRP3* (rs10754558), *CARD8* (rs2043211), *IL1B* (rs1143634), *IL18* (rs187238) e *IFI16* (rs6940).

O polimorfismo rs10754558 (C>G) está localizado na região 3'UTR do *NLRP3*, estando associado com a ligação de miRNAs. Para a população em estudo, nem o alelo variante G do polimorfismo, nem o genótipo GG apresentaram-se associados com a falha imunológica para o polimorfismo rs10754558. Estudos utilizando populações brasileiras demonstraram a associação do SNP com proteção à infecção pelo HIV-1 e HTLV-1 (KAMADA et al., 2014; PONTILLO et al., 2012a). Já estudos envolvendo populações Caucásicas - japonesas e chinesas – mostraram-se associados ao risco de desenvolvimento de doenças (HITOMI et al., 2009; ZHOU et al., 2016). Porém, assim como nossos dados, outros estudos corroboram com a não associação do polimorfismo na fisiopatologia das doenças como o mesotelioma, gota e doenças neurológicas (KIM et al., 2016; PONTILLO et al., 2012c; WANG et al., 2017).

O papel funcional da proteína CARD8 ainda se apresenta controverso, estando alguns estudos relacionados com a inibição da ativação do inflamassoma via NF- κ B, enquanto que outros assumem a ativação do mesmo. Sabe-se, porém, que o polimorfismo rs2043211 (A>T) que produz uma proteína com perda de função tem se demonstrado associado ao risco do desenvolvimento de co-infecções HIV-1/Tuberculose, doença de Crohn e infarto isquêmico, assumindo, assim, que a

proteína possui um papel inibitório na ativação do inflamassoma (BAI et al., 2014; PONTILLO et al., 2013; ROBERTS et al., 2010).

Porém, na população em estudo, não foi observada associação de ambos, genótipo e alelo variantes. O estudo desenvolvido por Bai et al. (2014), analisando a influência do SNP rs2043211 no infarto isquêmico em coortes chinesas demonstrou associação do modelo dominante, porém, quando ajustado o *p-value*, a associação foi perdida. No estudo desenvolvido por Kastbom et al. (2013) em uma população sueca encontrou-se associação do alelo e do genótipo heterozigoto, e posteriormente ao se aplicar também o modelo dominante, com proteção ao desenvolvimento de espondilite anquilosante.

A análise genotípica para o gene *IL1B* não demonstrou associação do variante rs1143634 (G>A) com a ocorrência de falha imunológica na nossa população. Assim como em nosso estudo, a avaliação da associação deste polimorfismo na ocorrência de algumas doenças não foi encontrada. O estudo de Naranjo-Galvis et al. (2018) avaliando a influência de SNPs em citocinas com o processo de toxoplasmose ocular em populações colombianas também não encontrou associação, assim como o desenvolvido por Ślebioda et al. 2017, em uma população polonesa com uma estomatite. Porém, estudos com populações caucasianas da Espanha e populações indianas demonstraram associação com um alto risco de desenvolvimento de câncer de pulmão não-pequenas células (DOMÍNGUEZ-PÉREZ et al., 2017) e proteção ao desenvolvimento de Doença Grave (SHEHJAR et al., 2018), respectivamente.

Para o gene *IL18*, a análise do polimorfismo rs187238 (G>C) demonstrou tanto o alelo C quando o genótipo CC associados com a proteção a falha imunológica nos indivíduos da população analisada. A análise funcional deste SNP

localizado na posição -137 da região promotora do gene *IL18* altera o sítio de ligação do fator de transcrição nuclear H4TF-1. Assim, a alteração do alelo G para o alelo C faz com que a ligação a este fator seja perdida, diminuindo a expressão do gene *IL18* (GIEDRAITIS et al., 2001).

O aumento do nível transcricional de alguns genes na via da piroptose, dentre eles o gene *IL18*, em indivíduos em falha imunológica foi observado em alguns estudos, como o de (BANDERA et al., 2018), podendo a transcrição basal no grupo de sucesso imunológico ser explicada devido a presença do alelo variante.

Outros processos infecciosos, como o estudo desenvolvido por (LEON RODRIGUEZ et al., 2016) em uma população colombiana também demonstraram associação deste polimorfismo, bem como estudos que encontraram associação deste genótipo com o risco de desenvolvimento de doenças como eczema atópico e diabetes melitus tipo 1 (NOVAK et al., 2005; TAVARES et al., 2013).

A análise do gene *IFI16* não demonstrou associação da variante rs6940 (A>T) com a ocorrência de falha imunológica nos indivíduos de nossa população. Resultado semelhante foi encontrado na análise desenvolvida por (MARCHESAN et al., 2017), em indivíduos do Norte da Europa com periodontite, enquanto que a associação desta mesma variante com o risco de desenvolvimento foi observada em populações hispânicas com Doença de Behçet. Apesar de sua função ainda não ser bem esclarecida, os estudos sugerem que ocorre uma alteração conformacional no produto deste gene, que poderia alterar sua função. Possivelmente devido ao fato de se tratar de um gene bastante conservado, poucos estudos têm buscado associação de variantes neste gene.

Pode-se notar que muitas das associações discutidas tratam-se de populações substancialmente caucasianas, o que poderia influenciar diretamente

na comparação dos resultados apresentados na população em estudo, dado o padrão miscigenado observado no Brasil. Porém, isto torna-se justificável, uma vez que em análises de ancestralidade, estudos tem demonstrado que a constituição genética brasileira é, em quase todas as regiões, composta em maioria por caucasianos, seguidos de africanos e ameríndios (RODRIGUES DE MOURA et al., 2015).

A influência da análise da morte celular por piroptose no âmbito do sangue periférico apresenta-se bastante contraditória. Nossos achados não apresentaram associação estatística entre a diferença nos níveis de morte celular entre os grupos analisados na nossa população. Porém, foi observada uma maior frequência nos grupos casos quando comparados aos controles.

O estudo desenvolvido por Muñoz-Arias et al. 2015 apresenta que linfócitos T CD4+ presentes no sangue periférico apresentam uma resistência à morte celular por piroptose, uma vez que, quando comparadas culturas de tecidos e culturas de PBMCs ocorre uma perda de ativação de linfócitos durante o tráfico destes pela corrente sanguínea, por perda de interação célula-célula, o que é contrário a nosso estudo, que observou uma maior taxa de morte, tanto em células gerais presentes na corrente sanguínea, quanto em células recém emigradas do timo.

Uma recente análise em nível transcricional desenvolvida por (BANDERA et al., 2018) demonstrou que comparando indivíduos HIV positivos respondedores e não respondedores imunológicos a partir de cultura de PBMCs estimuladas com o vírus, houve um aumento na expressão de genes relacionados à via da piroptose, sugerindo que o microambiente em que a célula infectada está, seja ele em tecido linfóide ou seja a nível de circulação periférica, não altera o padrão da piroptose nas células infectadas, podendo sim estar ocorrendo este tipo de morte. Seguindo

este raciocínio, um possível aumento no N amostral da nossa população, visto que a análise geral de média e desvio padrão demonstrou uma maior morte por piroptose nos indivíduos casos quando comparados aos controles, poderia vir a corroborar com este estudo, demonstrando a influência da piroptose na falha imunológica.

Tendo em vista os aspectos apresentados, o caráter multifatorial da falha imunológica requer uma melhor compreensão desse aspecto, sendo necessários o desenvolvimento de mais estudos no intuito de fornecer subsídios para a avaliação na prática clínica dos indivíduos infectados em terapia.

6 CONCLUSÃO

I. A análise univariada das variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais demonstraram a associação da variável contagem de células T CD4+ <350 no início a terapia com está associado com a ocorrência de falha imunológica.

II. A análise genotípica das variantes rs10754558 do gene *NLRP3*, rs2043211 do *CARD8*, rs1143634 do *IL1B* e rs6940 do *IFI16* não demonstraram associação estatística com a falha imunológica na população avaliada.

III. Tanto o alelo variante C do gene *IL18*, quanto o genótipo CC demonstraram-se associados com proteção à falha imunológica na população em estudo.

IV. A análise imunofenotípica das células T CD4+ não demonstrou representação estatística quanto a ocorrência de maior nível de morte entre os grupos caso e controle, porém, observou-se uma maior taxa de morte por piroptose no grupo em falha imunológica, quando comparado àquele em sucesso.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 9th editio ed. Philadeplhia: Elsevier, 2018.

ABU-RADDAD, L. J. Role of Acute HIV Infection in Driving HIV Transmission: Implications for HIV Treatment as Prevention. **Plos Medicine**, v. 12, n. 3, p. 1–4, 2015.

ACETI, A. et al. Pharmacogenetics as a tool to tailor antiretroviral therapy: A review. **World journal of virology**, v. 4, n. 3, p. 198–208, 2015.

AFONINA, I. S. et al. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 991–1004, 2015.

AGOSTINI, M.; TUCCI, P.; MELINO, G. Cell death pathology: Perspective for human diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 3, p. 451–455, 28 out. 2011.

AHIR, S. et al. Polymorphisms in IL-1 gene cluster and its association with the risk of perinatal HIV transmission, in an Indian cohort. **Immunology Letters**, v. 153, n. 1–2, p. 1–8, jun. 2013.

AIDSINFO. **Approval of AZT**. [s.l: s.n.].

AIUTI, F.; MEZZAROMA, I. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. **Aids Reviews**, v. 8, p. 88–97, 2006.

ALLEN, I. C. et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 556–565, abr. 2009.

ALMEIDA, L. et al. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. **Seminars in Immunology**, v. 28, p. 514–524, 2016.

ALUNNO, A. et al. Interferon gamma-inducible protein 16 in primary Sjögren's syndrome: a novel player in disease pathogenesis? **Arthritis research & therapy**, v. 17, p. 208, 2015.

- ALUNNO, A. et al. Circulating Interferon-Inducible Protein IFI16 Correlates with Clinical and Serological Features in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Care and Research**, v. 68, n. 4, p. 440–445, 2016.
- AMSLER, L.; MALOULI, D.; DEFILIPPIS, V. The inflammasome as a target of modulation by DNA viruses. **Future virology**, v. 8, n. 4, p. 357–370, 1 abr. 2013.
- ARTS, E. J. et al. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy BASIC PRINCIPLES OF ANTIRETROVIRAL ir. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, p. 1–23, 2012.
- ASHIDA, H. et al. Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 6, p. 931–942, 2011.
- ASHKENAZI, A.; SALVESEN, G. Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 337–356, 11 out. 2014.
- BACK, L. K. C. et al. Functional polymorphisms of interleukin-18 gene and risk. **Tissue Antigens**, v. 84, p. 229–233, 2014.
- BADER, A. et al. An adherence typology: Coping, quality of life, and physical symptoms of people living with HIV/AIDS and their adherence to antiretroviral treatment. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 12, p. CR493–CR500, 2006.
- BAGGALEY, R. F.; WHITE, R. G.; BOILY, M.-C. Systematic review of orogenital HIV-1 transmission probabilities. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, p. 1255–1265, 2008.
- BAI, Y. et al. Regulation of CARD8 Expression by ANRIL and Association of CARD8 Single Nucleotide Polymorphism rs2043211 (p.C10X) With Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 45, p. 383–388, 2014.
- BANDERA, A. et al. The NLRP3 inflammasome is upregulated in HIV-infected antiretroviral therapy-treated individuals with defective immune recovery. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–8, 2018.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868–871, 1983.
- BARRE-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nat Rev Micro**, v. 11, n. 12, p. 877–883, 2013.
- BARTLETT, J. A. et al. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-1 infected adults. **AIDS (London, England)**, v. 15, n. 11, p. 1369–77, 27 jul. 2001.
- BARTLETT, J. A. et al. An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-infected adults. **AIDS (London, England)**, v. 20, n. 16, p. 2051–64, 24 out. 2006.

BATTISTELLI, M. et al. Cell death induced by physical agents: morphological features. **Microscopie**, v. 15, n. 1, p. 45–53, 31 mar. 2011.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 99–109, 2009.

BOOIMAN, T.; KOOTSTRA, N. A. Polymorphism in IFI16 affects CD4+ T-cell counts in HIV-1 infection. **International Journal of Immunogenetics**, v. 41, n. 6, p. 518–520, 2014.

BORZANI, I. et al. The interleukin-1 cluster gene region is associated with multiple sclerosis in an Italian Caucasian population. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 7, p. 930–938, 2010.

BOUCHER, D.; CHEN, K. W.; SCHRODER, K. Burn the house, save the day: pyroptosis in pathogen restriction. **Inflammasome**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2016.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. 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, 2013a.

BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.aids.gov.br>.

BRUCHARD, M. et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 859–870, 2015.

CAMPA, D. et al. Lack of Association for Reported Endocrine Pancreatic Cancer Risk Loci in the PANDORA Consortium. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 8, p. 1349–1351, 2017.

CAMPBELL, E. M.; HOPE, T. J. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 471–483, 2015.

CARTER, C. A; EHRLICH, L. S. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. **Annual review of microbiology**, v. 62, p. 425–443, 2008.

CASE, K. Nomenclature: Human Immunodeficiency Virus. **Annals of Internal Medicine**, v. 105, n. 1, p. 133, 1986.

CASTILHO, J. L.; MELEKHIN, V. V; STERLING, T. R. Sex Differences in HIV Outcomes in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era: A Systematic Review. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 5, p. 446–456, 2014.

CDC. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 31, n. 23, p. 305–7, 1982a.

CDC. Opportunistic Infections and Kaposi ' s Sarcoma among Haitians in the United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 26, p. 353–354, 1982b.

CDC. Epidemiologic Notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 27, p. 365–367, 1982c.

CDC. Current Trends Update : Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) -- United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 32, n. 35, p. 465–467, 1982d.

CDC. Current Trends Update : Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) -- United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 32, n. 35, p. 465–467, 1983.

CHANG, C. C. et al. HIV and co-infections. **Immunological Reviews**, v. 254, n. 1, p. 114–142, jul. 2013.

CHARURAT, M. et al. Timing and determinants of mother-to-child transmission of HIV in Nigeria. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 106, n. 1, p. 8–13, jul. 2009.

CHUN, H. M. et al. The Role of Sexually Transmitted Infections in HIV-1 Progression: A Comprehensive Review of the Literature. **Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v. 2013, p. 15, 2013.

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 113–4, 1 mar. 2001.

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.

D'ARC, M. et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. E1343–E1352, 2015.

DAING, A. et al. Single nucleotide polymorphisms at interleukin (IL)-1 β + 3954 and vitamin D receptor (VDR) TaqI in chronic periodontitis patients: A pilot study in North Indian population Anika. **Original Research**, v. 7, n. 1, p. 18–23, 2017.

DANTHI, P. Viruses and the Diversity of Cell Death. **Annu. Rev. Virol**, v. 21, n. 1, p. 1–21, 2016.

DELL'OSTE, V. et al. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: A key player in the antiviral response. **New Microbiologica**, v. 38, n. 1, p. 5–20, 2015.

DESAI, A.; GROLLEAU-JULIUS, A.; YUNG, R. Leukocyte function in the aging immune system. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 6, p. 1001–9, jun. 2010.

DIBYENDU, D. et al. Incidence and risk factors of immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-TB coinfecting patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 553–559, 2011.

DOITSH, G. et al. Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and

Inflammation in Human Lymphoid Tissue. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 789–801, nov. 2010.

DOITSH, G. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509–14, 2014.

DOITSH, G.; GREENE, W. C. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost during HIV Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 3, p. 280–291, 2016.

DOMÍNGUEZ-PÉREZ, R. A. et al. Association of cytokines polymorphisms with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis in a Mexican population. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 75, n. 4, p. 243–248, 2017.

DUPREZ, L. et al. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 1050–1062, 2009.

EIDET, J. R. et al. Objective assessment of changes in nuclear morphology and cell distribution following induction of apoptosis. **Diagnostic Pathology**, v. 9, p. 1–9, 2014.

ELLIOTT, E. I.; SUTTERWALA, F. S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 35–52, maio 2015.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007a.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 25 jun. 2007b.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The Structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. v. 10, p. 279–290, 2013.

FANALES-BELASIO, E. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Ann Ist Super Sanità**, v. 46, n. 1, p. 5–14, 2010.

FENG, Y. et al. Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by Vif. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 450, 26 ago. 2014.

FÉVRIER, M.; DORGHAM, K.; REBOLLO, A. CD4 +T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: Role of apoptosis. **Viruses**, v. 3, n. 5, p. 586–612, 2011.

FINK, S. L. et al. Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 2005.

FORBES, J. C. et al. A national review of vertical HIV transmission. **AIDS**, v. 26, n. 6, p. 757–763, mar. 2012.

FORSTEIN, M. AIDS: A History. **Journal of Gay and Lesbian Mental Health**, v. 17, n. 1, p. 40–63, 2013.

FOX, J.; FIDLER, S. Sexual transmission of HIV-1. **Antiviral Research**, v. 85, n. 1, p. 276–285, 2010.

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

FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 8, p. 484–496, 2015.

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

GAIHA, G. D.; BRASS, A. L. The Fiery Side of HIV-Induced T Cell Death. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 383–384, 2014.

GALLO, R. VIC et al. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. **Science**, v. 224, p. 500–503, 1984.

GALLOWAY, N. L. K. et al. Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells. **Cell Reports**, v. 12, n. 10, p. 1555–1563, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, p. 58–73, 2014.

GANDHI, R. T. et al. HIV-1 Directly Kills CD4+ T Cells by a Fas-independent Mechanism. **J. Exp. Med.**, v. 187, n. 7, p. 1113–1122, 1998.

GANDHI, R. T. et al. Effect of baseline- and treatment-related factors on immunologic recovery after initiation of antiretroviral therapy in HIV-1-positive subjects: results from ACTG 384. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 42, n. 4, p. 426–34, 1 ago. 2006.

GANSER-PORNILLOS, B. K.; YEAGER, M.; SUNDQUIST, W. I. The structural biology of HIV assembly. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 2, p. 203–217, 2008.

GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436–441, 1999.

GATELL, J. M. Antiretroviral therapy for HIV: Do subtypes matter? **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 11, p. 1153–1155, 2011.

GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter : a possible role of polymorphisms in expression regulation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 112, p. 146–152, 2001.

GONZALEZ, V. D. et al. High Levels of Chronic Immune Activation in the T-Cell Compartments of Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and Human

Immunodeficiency Virus Type 1 and on Highly Active Antiretroviral Therapy Are Reverted by Alpha Interferon and Ribavirin Treatment. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 83, n. 21, p. 11407–11411, 2009.

GRAM, A. M.; FRENKEL, J.; RESSING, M. E. Inflammasomes and viruses: Cellular defence versus viral offence. **Journal of General Virology**, v. 93, n. PART 10, p. 2063–2075, 2012.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, p. a006080, 1 dez. 2015.

GREUB, G. et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. **The Lancet**, v. 356, n. 9244, p. 1800–1805, 2000.

GRINGHUIS, S. I. et al. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 419–426, 2010.

GUERINI, F. R. et al. No association of IFI16 (interferon-inducible protein 16) variants with susceptibility to multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 271, n. 1–2, p. 49–52, 2014.

GUO, H. et al. HIV-1 infection induces interleukin-1 β production via TLR8 protein-dependent and NLRP3 inflammasome mechanisms in human monocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 31, p. 21716–21726, 2014.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, 29 jun. 2015.

HAASE, A. T. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 10, p. 783–792, 2005.

HAHN, B. H. et al. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607–614, 2000.

HAMPANDA, K. Vertical Transmission of HIV in Sub-Saharan Africa : Applying Theoretical Frameworks to Understand Social Barriers to PMTCT. **ISRN infectious diseases**, v. 2013, p. 5, 2013.

HASSAN, A. S. et al. HIV-1 virologic failure and acquired drug resistance among first-line antiretroviral experienced adults at a rural HIV clinic in coastal Kenya: a cross-sectional study. **AIDS research and therapy**, v. 11, p. 9, 2014.

HAZUDA, D. et al. Structure-Function mapping of interleukin 1 Precursors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 11, p. 7081–7086, 1991.

HEMELAAR, J. et al. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. **Aids**, v. 25, n. 5, p. 679–689, 2011.

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

HEMELAAR, J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. **Journal of Infection**, v. 66, n. 5, p. 391–400, 2013.

HERBECK, J. T. et al. Is the virulence of HIV changing? A meta-analysis of trends in prognostic markers of HIV disease progression and transmission. **AIDS (London, England)**, v. 26, n. 2, p. 193–205, 2012.

HERBEUVAL, J. et al. CD4 + T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1 : role of type 1 interferon – dependent , TRAIL / DR5-mediated apoptosis. v. 106, n. 10, p. 1–12, 2008.

HERNANDEZ, J. C.; LATZ, E.; URCUQUI-INCHIMA, S. HIV-1 Induces the First Signal to Activate the NLRP3 Inflammasome in Monocyte-Derived Macrophages. **Intervirology**, v. 57, n. 1, p. 36–42, 2014.

HERTZ, D. L.; RAE, J. Pharmacogenetics of Cancer Drugs. 2014.

HINZ, A. et al. Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/tetherin ectodomain. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 4, p. 314–23, 22 abr. 2010.

HIRSCH, M. S. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel. **JAMA**, v. 279, n. 24, p. 1984–91, 24 jun. 1998.

HITOMI, Y. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin- induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 4, p. 779–785.e6, 2009.

HOEHN, K. B. et al. Dynamics of immunoglobulin sequence diversity in HIV-1 infected individuals. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1676, p. 20140241-, 2015.

HUNT, P. W. et al. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. **AIDS (London, England)**, v. 17, n. 13, p. 1907–15, 5 set. 2003.

HUTCHINSON, J. F. THE BIOLOGY AND EVOLUTION OF HIV. **Annual Review of Anthropology**, v. 30, p. 85–108, 2001.

ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 1, p. R52, 2014.

JENKO, B. et al. NLRP3 and CARD8 Polymorphisms Influence Higher Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. **Journal of medical biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 319–323, set. 2016.

JOHNSON, J. A.; CAVALLARI, L. H. Pharmacogenetics and cardiovascular disease--implications for personalized medicine. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 3, p. 987–1009, jul. 2013.

JONSSON, K. L. et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages

by promoting production and function of cGAMP. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–17, 2017.

JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 130–142, 2015.

KAMADA, A. J. et al. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 957–960, nov. 2014.

KAMINSKY, V.; ZHIVOTOVSKY, B. To kill or be killed: how viruses interact with the cell death machinery. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 5, p. 473–482, maio 2010.

KAPESA, A. et al. Determinants of immunological failure among clients on the first line treatment with highly active antiretroviral drugs in Dar es Salaam, Tanzania. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. Suppl 2, p. S620–S624, 2014.

KAPLAN, G. et al. The range of CD4-bound conformations of HIV-1 gp120, as defined using conditional CD4-induced antibodies. **Journal of Virology**, n. February, p. JVI.03206-15, 2016.

KARIUKI, S. M. et al. The HIV-1 transmission bottleneck. **Retrovirology**, v. 14, 2017.

KASTBOM, A. et al. Genetic variants in *CARD8* but not in *NLRP3* are associated with ankylosing spondylitis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 42, n. 6, p. 465–468, 2 nov. 2013.

KASZTELEWICZ, B. et al. Cytokine gene polymorphism associations with congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 1811–1818, 2017.

KAUFMANN, G. R. et al. The extent of HIV-1-related immunodeficiency and age predict the long-term CD4 T lymphocyte response to potent antiretroviral therapy. **AIDS (London, England)**, v. 16, n. 3, p. 359–67, 15 fev. 2002.

KAWASHIMA, Y. et al. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 641–645, 2009.

KELLEY, C. F. et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 6, p. 787–94, 15 mar. 2009.

KESAVARDHANA, S.; KANNEGANTI, T. Mechanisms governing inflammasome activation , assembly and pyroptosis induction. **International Immunology**, v. 29, n. 901, p. 201–210, 2017.

KIM, S.-K. et al. THU0532 Genetic Analysis for P2x7R rs3751142 and CARD8

rs2043211 Polymorphisms for Susceptibility of Gout in Male Korean Population. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. Suppl 2, p. 384.2-384, 15 jun. 2016.

KO, D. C. et al. A Genome-wide In Vitro Bacterial-Infection Screen Reveals Human Variation in the Host Response Associated with Inflammatory Disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 2, p. 214–227, 2009.

KONDO, Y. et al. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. **Cancer Science**, v. 103, n. 4, p. 782–790, abr. 2012.

KOVACS, S. B.; MIAO, E. A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 9, p. 673–684, 2017.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 10 jan. 2009.

KURITZKES, D. R. et al. Preexisting Resistance to Nonnucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitors Predicts Virologic Failure of an Efavirenz-Based Regimen in Treatment-Naïve HIV-1–Infected Subjects. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 6, p. 867–870, 2008.

LACKNER, A. A.; LEDERMAN, M. M.; RODRIGUEZ, B. HIV pathogenesis: The host. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 9, p. 1–24, 2012.

LASKUS, T. et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 2, p. 442–8, fev. 2000.

LEDERMAN, M. M. et al. Cellular restoration in HIV infected persons treated with abacavir and a protease inhibitor: age inversely predicts naïve CD4 cell count increase. **Aids**, v. 14, n. 17, p. 2635–2642, 2000.

LEITNER, T. et al. HIV Sequence Compendium 2017 Editors. **La-Ur-17-25240**, p. 1–454, 2017.

LEON RODRIGUEZ, D. A. et al. IL18 Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2016.

LEOZ, M. Origin, diffusion and evolution of HIV-1 group O viruses. v. 21, n. 1, p. 1–11, 2018.

LI, G.; DE CLERCQ, E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 80, n. 3, p. 679–731, 2016.

LI, 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, X. et al. HIV-1 genetic diversity and its impact on baseline CD4+T cells and viral loads among recently infected men who have sex with men in Shanghai, China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 2015.

LIU, S. et al. Initiation complex dynamics direct the transitions between distinct phases of early HIV reverse transcription. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 4, p. 5–3, 2010.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–195, 2011.

LOS ANGELES TIME. **Studies of Combined HIV Drugs Promising**. [s.l: s.n.].

LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4 +T cells: Differentiation and functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

LUFT, L. A. M.; GILL, M. J.; CHURCH, D. L. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: Review of current platforms. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. e661–e670, 2011.

LUPFER, C.; ANAND, P. K. Integrating Inflammasome Signaling in Sexually Transmitted Infections. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 10, p. 703–714, 2016.

LYRA, M. R. et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV and sporotrichosis coinfection: report of two cases and review of the literature. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 806–809, dez. 2014.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **The Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 2014.

MACARTHUR, R. D. et al. A comparison of three highly active antiretroviral treatment strategies consisting of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, protease inhibitors, or both in the presence of nucleoside reverse transcriptase inhibitors as initial therapy (CPCRA 058 FIRST Study): a long-term randomised trial. **The Lancet**, v. 368, n. 9553, p. 2125–2135, 16 dez. 2006.

MALATINKOVA, E. et al. Impact of a decade of successful antiretroviral therapy initiated at HIV-1 seroconversion on blood and rectal reservoirs. **eLife**, v. 4, n. OCTOBER2015, p. 1–17, 2015.

MALLAL, S. et al. HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 6, p. 568–579, 2008.

MAN, S. M.; KARKI, R.; KANNEGANTI, T. D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. **Immunological Reviews**, v. 277, n. 1, p. 61–75, 2017.

MARCHESAN, J. T. et al. Common Polymorphisms in *IFI16* and *AIM2* Genes Are

Associated With Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 7, p. 663–672, 2017.

MASUR, H. et al. An Outbreak of Community- Acquired Pneumocystis carinii Pneumonia. **The New England**, v. 305, n. 24, p. 1431–1437, 1981.

MCLEAN, J. et al. Viral Manipulation of Cell Death. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 3, p. 198–220, 1 jan. 2008.

MEDINA, L. et al. Expression of IL-18, IL-18 binding protein, and il-18 receptor by normal and cancerous human ovarian tissues: Possible implication of il-18 in the pathogenesis of ovarian carcinoma. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

MENEZES BRUNETTA, D. et al. Hematological particularities and co-infections in injected drug users with AIDS. v. 1, n. 76, p. 654–656, 2013.

MHAWEJ, M. J. et al. Apoptosis characterizes immunological failure of HIV infected patients. **Control Engineering Practice**, v. 17, n. 7, p. 798–804, 2009.

MIAN, S. A. et al. NLRP3 Inflammosome Polymorphisms Are Enriched in Myelodysplastic Syndrome Patients with Autoimmune Disorders. **Blood**, v. 126, n. 23, 2015.

MIAO, E. A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. **Immunological Reviews**, v. 243, p. 206–214, 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. 803–33, 2012.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Para manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes. p. 240, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP) for Risk of HIV Infection. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Hiv/Aids. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 1, p. 52, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Hiv, aids. **HIV Aids Boletim Epidemiológico**, p. 64, 2017.

MISGENA, D. K. The pattern of immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral treatment (HAART): Does success bring further challenges? **Ethiopian Journal of Health Development**, v. 25, n. 1, p. 61–70, 2011.

MISHRA, S. et al. Immune Response and Possible Causes of CD4+T-cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) - 1 Infection. **The Open**

Nutraceuticals Journal, v. 2, n. 1, p. 46–51, 2009.

MOHAMMADI, P. et al. 24 Hours in the Life of HIV-1 in a T Cell Line. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T-cells Abortively Infected with HIV. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 428–432, 2014.

MONTANER, J. S. et al. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients: the INCAS Trial. Italy, The Netherlands, Canada and Australia Study. **JAMA**, v. 279, n. 12, p. 930–7, 25 mar. 1998.

MOORE, A. L. et al. Gender differences in virologic response to treatment in an HIV-positive population: a cohort study. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 26, n. 2, p. 159–63, 1 fev. 2001.

MORENO, C. C. G. S.; REA, M. F.; FILIPE, E. V. Mães HIV positivo e a não-amamentação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, n. 2, p. 199–208, jun. 2006.

MUÑOZ-ARIAS, I. et al. Blood-Derived CD4 T Cells Naturally Resist Pyroptosis during Abortive HIV-1 Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 4, p. 463–470, 2015.

MYUNG, D.-S. et al. Association between interleukin-18 gene polymorphism and Helicobacter pylori infection in the Korean population. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11535, 22 set. 2015.

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

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; OKAMURA, H. I NTERLEUKIN-18 REGULATES BOTH TH1 AND TH2 RESPONSES. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 423–474, 2001.

NARANJO-GALVIS, C. A. et al. Genetic Polymorphisms in Cytokine Genes in Colombian Patients with Ocular Toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 4, p. e00597-17, 2018.

NDUNG'U, T.; WEISS, R. A. On HIV diversity. **Aids**, v. 26, n. 10, p. 1255–1260, 2012.

NOVAK, N. et al. Single nucleotide polymorphisms of the IL18 gene are associated with atopic eczema. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 4, p. 828–833, 2005.

NOVICK, D. et al. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 439–448, 2013.

OESTREICH, K. J.; WEINMANN, A. S. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 2, p.

191–195, abr. 2012.

OLIVEIRA, A. et al. Interleukin-1 β genotype and circulating levels in cancer patients : Metastatic status and pain perception. **Clinical Biochemistry**, p. 5–9, 2014.

ORTIZ-FERNÁNDEZ, L. et al. Variants of the IFI16 gene affecting the levels of expression of mRNA are associated with susceptibility to Behet disease. **Journal of Rheumatology**, v. 42, n. 4, p. 695–701, 2015.

OWEN, A. et al. Pharmacogenetics of HIV therapy. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 16, n. 10, p. 693–703, 2006.

PALELLA, F. J. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **The New England journal of medicine**, v. 338, n. 13, p. 853–60, 26 mar. 1998.

PALMA, A. C. et al. Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 3, p. 391–398, jun. 2007.

PALMISANO, L.; VELLA, S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. **Ann Ist Super Sanità**, v. 47, n. 1, p. 44–48, 2011.

PARAMEL, G. V.; SIRSJÖ, A.; FRANSÉN, K. Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

PARSONS, T. D. et al. Better quality of life with neuropsychological improvement on HAART. **Health and quality of life outcomes**, v. 4, p. 11, 2006.

PATEL, P. et al. Estimating per-act HIV transmission risk. **Aids**, v. 28, n. 10, p. 1509–1519, 2014.

PEREZ-CABALLERO, D. et al. Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 499–511, out. 2009.

PICERNO, I. et al. Lymph node involution, T-cell adaptation and T-cell death in HIV infection. **HIV Therapy**, v. 4, n. 6, p. 629–637, 2010.

PIDO-LOPEZ, J.; IMAMI, N.; ASPINALL, R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. **Clinical and experimental immunology**, v. 125, n. 3, p. 409–13, set. 2001.

PINTO, A. C. S. et al. C Omprensão Da P Andemia Da a Ids Nos Ú Ltimos 25 a Nos U Nderstanding the a Ids P Andemia in the L Ast 25 Y Ears. v. 19, n. 1, p. 45–50, 2007.

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

POLIS, M. A. et al. Correlation between reduction in plasma HIV-1 RNA concentration 1 week after start of antiretroviral treatment and longer-term efficacy. **Lancet (London, England)**, v. 358, n. 9295, p. 1760–5, 24 nov. 2001.

PONTILLO, A. et al. A 3'UTR SNP in NLRP3 Gene is Associated With Susceptibility to HIV-1 Infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, v. 54, n. 3, p. 236–240, 2010.

PONTILLO, A. et al. The Missense Variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 Gene and an NLRP1 Haplotype Are Associated With Celiac Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 3, p. 539–544, 18 mar. 2011.

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in In fl ammasome ' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, v. 59, n. 2, p. 121–125, 2012a.

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 59, n. 2, p. 121–125, fev. 2012b.

PONTILLO, A. et al. NLRP1 and NLRP3 polymorphisms in mesothelioma patients and asbestos exposed individuals a population-based autopsy study from North East Italy. **Infectious Agents and Cancer**, v. 7, n. 1, p. 25, 1 ago. 2012c.

PONTILLO, A. et al. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis Infection in HIV-Positive Patients Is Associated With CARD8 Genetic Variant. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 63, n. 2, p. 147–151, 1 jun. 2013.

POTTER, M. et al. Impact of hepatitis C viral replication on CD4+ T-lymphocyte progression in HIV-HCV coinfection before and after antiretroviral therapy. **AIDS (London, England)**, v. 24, n. 12, p. 1857–65, 31 jul. 2010.

PRABHAKAR, B. et al. Immunological failure despite virological suppression in HIV seropositive individuals on antiretroviral therapy. **Indian journal of sexually transmitted diseases**, v. 32, n. 2, p. 94–8, 2011.

PRAKASH, S. S. et al. Diversity of HIV type 1 envelope (V3-V5) sequence in HIV type 1-infected Indian children. **AIDS research and human retroviruses**, v. 28, n. 5, p. 505–509, 2012.

QIAN, N. et al. Circulating IL-1 β levels, polymorphisms of IL-1B, and risk of cervical cancer in Chinese women. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 5, p. 709–716, 11 maio 2010.

RATHINAM, V. A. K. et al. TRIF Licenses Caspase-11-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation by Gram-Negative Bacteria. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 606–619, 3 ago. 2012.

RAZMARA, M. et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13952–13958, 2002.

ROBERTS, R. L. et al. Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn ' s disease. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 351–356, 2010.

RODRIGUES DE MOURA, R. et al. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. **American Journal of Human Biology**, v. 27, n. 5, p. 674–680, 10 set. 2015.

ROMANO, J. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in HIV prevention; current status and future directions: a summary of the DAIDS and BMGF sponsored think tank on pharmacokinetics (PK)/pharmacodynamics (PD) in HIV prevention. **AIDS research and human retroviruses**, v. 29, n. 11, p. 1418–27, 2013.

ROMERO, J. DEL et al. Natural conception in HIV-serodiscordant couples with the infected partner in suppressive antiretroviral therapy A prospective cohort study. [s.d.].

ROZENBAUM, W. et al. MULTIPLE OPPORTUNISTIC INFECTION IN A MALE HOMOSEXUAL IN FRANCE. **The Lancet**, p. 572–573, 1982.

RUBIO, E. V. HIV/AIDS: Vertical Transmission. In: **Current Perspectives in HIV Infection**. [s.l: s.n.]. v. 3p. 302–324.

SAGAR, M. Origin of the transmitted virus in HIV infection: infected cells versus cell-free virus. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. Suppl 3, p. S667–S673, 2014.

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

SANT, A. J.; MCMICHAEL, A. Revealing the role of CD4+ T cells in viral immunity. **J. Exp. Med**, v. 209, n. 8, p. 1391–1395, 2012.

SANTOS, A. F.; SOARES, M. A. HIV genetic diversity and drug resistance. **Viruses**, v. 2, n. 2, p. 503–531, 2010.

SEMPA, J. B. et al. Among Patients with Sustained Viral Suppression in a Resource-Limited Setting, CD4 Gains Are Continuous Although Gender-Based Differences Occur. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1552, p. 2487–94, 2010.

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

SHAW, G. M.; HUNTER, E. HIV transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1–23, 2012.

SHAW, P. J. et al. Inflammasomes and autoimmunity. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 2, p. 57–64, 16 fev. 2011.

SHEHJAR, F. et al. Association of polymorphic variants of IL-1 β and IL-1RN genes in the development of Graves' disease in Kashmiri population (North India). **Human Immunology**, 2018.

ŚLEBIODA, Z. et al. The absence of an association between Interleukin 1 β gene polymorphisms and recurrent aphthous stomatitis (RAS). **Archives of Oral Biology**, v. 84, n. September, p. 45–49, 2017.

SMYTH, R. P.; DAVENPORT, M. P.; MAK, J. The origin of genetic diversity in HIV-1. **Virus Research**, v. 169, n. 2, p. 415–429, 2012.

SOBKOWIAK, P. et al. Interleukin 1 β polymorphism and serum level are associated with pediatric asthma. **Pediatric Pulmonology**, v. 52, n. 12, p. 1565–1571, 2017.

SONG, W. et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. 2015.

STRATMANN, S. A. et al. The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex. **eLife**, v. 4, n. DECEMBER2015, p. 1–13, 2015.

STRUTT, T. M.; MCKINSTY, K. K.; SWAIN, S. L. Control of Innate Immunity by Memory CD4 T Cells. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.: s.n.]. v. 780p. 57–68.

STUNKARD, A. J. Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus. **Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes**, v. 162, n. 3, p. 214–220, 2009.

SUGAMA, S. et al. Tissue-Specific Expression of Rat IL-18 Gene and Response to Adrenocorticotrophic Hormone Treatment. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 11, p. 6287–6292, 1 dez. 2000.

SWANSTROM, R.; COFFIN, J. HIV-1 pathogenesis: The virus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 12, p. 1–18, 2012.

TAIT, S. W. G.; ICHIM, G.; GREEN, D. R. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. Pt 10, p. 2135–44, 2014.

TANGAMORNSUKSAN, W. et al. Association of HLA-B*5701 genotypes and abacavir-induced hypersensitivity reaction: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 68–76, 2015.

TANGI, T. N. et al. Role of NLRP3 and CARD8 in the regulation of TNF- α induced IL-1 β release in vascular smooth muscle cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 3, p. 697–702, 2012.

TAVARES, N. A. C. et al. Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine**, v. 62, n. 2, p. 286–289, 2013.

TAYLOR, S. L. et al. Genomic organization of the interleukin-1 locus. **Genomics**, v. 79, n. 5, p. 726–733, 2002.

TEIXEIRA, L. et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. **AIDS (London, England)**, v. 15, n. 14, p. 1749–56, 28 set. 2001.

TESSEMA, B. et al. Seroprevalence of HIV, HBV, HCV and syphilis infections among blood donors at Gondar University Teaching Hospital, Northwest Ethiopia: declining trends over a period of five years. 2010.

TONE, M. et al. Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 12, p. 6156–63, 15 dez. 1997.

TONGO, M.; DORFMAN, J. R.; MARTIN, D. P. High Degree of HIV-1 Group M (HIV-1M) Genetic Diversity within Circulating Recombinant Forms: Insight into the Early Events of HIV-1M Evolution. **Journal of Virology**, v. 90, n. 5, p. 2221–2229, 2016.

TRUMP, B. E. et al. The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis*. **Toxicologic pathology**, v. 25, n. 1, p. 82–88, 1997.

TSENG, A.; SEET, J.; PHILLIPS, E. J. The evolution of three decades of antiretroviral therapy: Challenges, triumphs and the promise of the future. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 182–194, 2014.

UNAIDS. **Estatísticas UNAIDS**.

UNAIDS. The Brazilian Response to HIV and AIDS. Global AIDS Reponse Progress Reporting (GARPR). 2015a.

UNAIDS. 90-90-90 Uma meta ambiciosa de tratamento para contribuir para o fim da epidemia de AIDS. p. 38, 2015b.

UNAIDS. On the Fast-Track to end AIDS. **UNAIDS**, 2015c.

UNAIDS. UNAIDS Data 2017. **UNAIDS**, 2017a.

UNAIDS. Ending AIDS: Progress towards the 90-90-90 targets. p. 1–198, 2017b.

VALLABHANENI, S. et al. Evaluation of WHO immunologic criteria for treatment failure: Implications for detection of virologic failure, evolution of drug resistance and choice of second-line therapy in India. **Journal of the International AIDS Society**, v. 16, n. 2, p. 1–7, 2013.

VELLA, S. et al. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. **AIDS (London, England)**, v. 26, n. 10, p.

1231–41, 2012.

VERNAZZA, P. et al. Les personnes séropositives ne souffrant d'aucune autre MST et suivant un traitement antirétroviral efficace ne transmettent pas le VIH par voie sexuelle. [s.d.].

VIARD, J. P. et al. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 8, p. 1290–4, 15 abr. 2001.

VIDYA VIJAYAN, K. K. et al. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. May, p. 580, 2017.

VILASECA, J. et al. KAPOSI'S SARCOMA AND TOXOPLASMA GONDII BRAIN ABSCESS IN A SPANISH HOMOSEXUAL. **The Lancet**, p. 1981, 1982.

VON KAMPEN, O. et al. Caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8) negatively regulates NOD2-mediated signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 26, p. 19921–19926, 2010.

WANG, H. et al. Association between NLPR1, NLPR3, and P2X7R Gene Polymorphisms with Partial Seizures. **BioMed research international**, v. 2017, p. 9547902, 2017.

WANG, X. et al. The cellular antiviral protein APOBEC3G interacts with HIV-1 reverse transcriptase and inhibits its function during viral replication. **Journal of virology**, v. 86, n. 7, p. 3777–86, 1 abr. 2012.

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

WAWER, M. J. et al. Circumcision in HIV-infected men and its effect on HIV transmission to female partners in Rakai, Uganda: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 374, n. 9685, p. 229–237, jul. 2009.

WEISS, R. A. Special Anniversary Review: Twenty-five years of human immunodeficiency virus research: Successes and challenges. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 152, n. 2, p. 201–210, 2008.

WILEN, C. B. et al. HIV : Cell Binding and Entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. 1–14, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO definitions of clinical , immunological and virological failure for the decision to switch ART regimens. p. 15, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress Report 2016, prevent HIV, test and treat all. **Progress Report 2016, prevent HIV, test and treat all**, p. 64, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Statistics. **World Health Organization**, p. 116, 2017.

WOROBAY, M. et al. 1970s and “Patient 0” HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. **Nature**, v. 539, n. 7627, p. 98–101, 2016.

YANG, C.-A. et al. DNA-Sensing and Nuclease Gene Expressions as Markers for Colorectal Cancer Progression. **Oncology**, v. 1, p. 115–124, 2017.

YANG, Y. et al. Programmed cell death and its role in inflammation. **Mil Med Res**, v. 2, p. 12, 2015.

YI, M. et al. rs2043211 polymorphism in *CARD8* is not associated with Tourette syndrome in a family-based association study in the Chinese Han population. **The International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 49, n. 3, p. 208–214, 28 abr. 2015.

ZHOU, D. et al. The NLRP3 rs10754558 Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Prognosis of Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population. **BioMed research international**, v. 2016, p. 3185397, 2016.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGOS SUBMETIDOS

Immunobiology Elsevier Editorial System(tm) for Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Pre-treatment CD4+ T-cell count and sex have more influence on immunological recovery than CCR5 genotype during HIV-1 antiretroviral therapy

Article Type: Short Communication

Keywords: Immunological failure; CCR5Δ32; AIDS; HAART; Chemokine receptor.

Corresponding Author: Mr. Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva,
Corresponding Author's Institution: Federal University of Pernambuco First Author:
Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva

Order of Authors: Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva; José Leandro Andrade-Santos; Antonio Victor Campos Coelho; Sergio Crovella; Rafael Lima Guimarães

Abstract: This study was performed (1) to assess the association of the CCR5Δ32 polymorphism with immunological failure and (2) to investigate the influence of sociodemographic and clinical data on immune recovery in HIV-1 positive patients receiving antiretroviral therapy. 223 HIV- positive patients at treatment were enrolled, 109 as immunological responders (IRs) and 114 as immunological non-responders (INRs). DNA extraction was performed followed by CCR5Δ32 genotyping. Other variables were evaluated from medical records. No association of CCR5Δ32 polymorphism with immunological failure was found in the patients submitted to HAART (OR=2.36, p=0.14). The logistic regression model showed that male sex and low pre-treatment CD4+ T-cell count (<500cells/μL) were statistically associated with immunological failure (OR=2.12, p=0.04 and OR=4.21, p=0.005, respectively). Additionally, we observed that there was a statistically significant trend between lower CD4+ T-cell count and INR status than the IR group (Z=-4.8703, p- value<0.001). The results of this study show to be important for a better understanding of the mechanisms involved in immune recovery

Suggested Reviewers: Amilcar Tanuri
Professor , Federal University of Rio de Janeiro
atanuri1@gmail.com

Pradeep Reddy
Research Associate, Emory
University
pradeep.babu.jagadeesh.reddy@emory.edu

Alfredo Brusco
Professor, University of
Turin alfredo.brusco@unito.it
Alessandra Pontillo
Professor, University of São
Paulo alepontillo@usp.br

ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP

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

**DECLARAÇÃO**

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

Recife, 18 de novembro de 2013


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

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

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

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

ANEXO C – 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 Coelho, 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	
Número do prontuário	Código de amostra

Inclusão no Braço (Transmissão vertical do HIV) C do estudo?	
SIM ()	NÃO ()
Se SIM, aplicar o termo de assentimento para a coleta do (a) filho (a) da paciente.	

ANEXO D – QUESTIONÁRIOS E FORMULÁRIOS DE ACOMPANHAMENTO

FORMULÁRIO A – RECRUTAMENTO: COLETA DE DADOS CLÍNICOS

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

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

2. Informações clínicas e epidemiológicas

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

3. Infecção pelo HIV

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

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

4. Perspectivas do paciente acerca do acompanhamento médico

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

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

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

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

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

ANEXO D (continuação)**FORMULÁRIO B – ACOMPANHAMENTO: REVISÃO DE DADOS CLÍNICOS**

NOME	CÓDIGO	PÁGINA

1. Informações clínicas e epidemiológicas**1.1 Peso e altura**

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

1.2 Fumo e etilismo

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

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

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

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

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

ANEXO D (continuação)**FORMULÁRIO C – ACOMPANHAMENTO DE EXAMES**

NOME	CÓDIGO	PÁGINA

4. Coinfecções, infecções oportunistas e doenças definidoras de AIDS**4.1 Sorologia de hepatites virais**

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

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

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

4.2 Infecção por Tuberculose

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

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

4.3 Doenças definidoras de AIDS

Se houver mudança de status, indicar a data

Doença	Status	Data
Candidíase oral		
Febre ou diarreia por 1 mês ou mais		
Herpes simples por 1 mês ou mais		
Infecção pelo CMV		

Pneumonia		
Candidíase do esôfago		
Demência pela AIDS		
Perda de peso acentuada		
Toxoplasmose		

5. Acompanhamento de carga viral e contagem de linfócitos

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

6. Medição de adesão ao tratamento anti-HIV

CÓDIGO DE AMOSTRA: _____

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

7. Controle de esquemas e trocas

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