

Maria Leonilda Gondim Silva

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE
MORTE CELULAR PROGRAMADA VIA TNF ALFA/TNFR1 NA
RESPOSTA AO TRATAMENTO ANTIRRETROVIRAL NA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
TIPO 1 (HIV-1)

RECIFE

2016

Maria Leonilda Gondim Silva

Caracterização Molecular do mecanismo de morte celular programada
via TNF Alfa/TNFR1 na resposta ao tratamento antirretroviral na
Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Pernambuco para obtenção do Título de
Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo
Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva

RECIFE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586c Silva, Maria Leonilda Gondim.
Caracterização molecular do mecanismo de morte celular programada via TNF Alfa/TNFR1 na resposta ao tratamento antirretroviral na Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) / Maria Leonilda Gondim Silva. – 2016.
61 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Apoptose. 2. SNPs. 3. HIV. 4. TARV. 5. TNF- α /TNFR1. I. Brandão, Lucas André Cavalcanti (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-156)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: Maria Leonilda Gondim Silva

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

NOME DA DISSERTAÇÃO: **“Caracterização Molecular do Mecanismo de Morte Celular Programada via TNF Alfa/TNFR1 na Resposta ao Tratamento Anti-Retroviral na Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1)”.**

ORIENTADORA: Prof. Dr Lucas André Cavalcanti Brandão

DATA DA DEFESA: 18 de fevereiro de 2016

DATA DE APROVAÇÃO: 18 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nicodemos Teles Pontes Filho

Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof^a. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof.^a Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a. Manuela Figueroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Lucas André Cavalcanti Brandão

R E C I F E

2016

Aos meus pais, Maria Leonice Gondim Silva e Luiz Pereira da Silva e minha avó Maria de Lourdes Gondim (*in memoriam*), aos meus irmãos e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento é a Deus por ter me concedido a dádiva de concluir mais essa etapa em minha vida e onde busquei forças para superar os obstáculos que por vezes pareceram intransponíveis.

Aos meus pais (*in memoriam*) que apesar de todas as dificuldades sempre me guiaram pelo caminho da honestidade, disciplina e busca do saber. Não poderia esquecer a minha avó Maria de Lourdes Gondim (*in memoriam*), minha inspiração maior no amor pela busca incessante do saber.

Agradeço também a verdadeira legião de anjos que surgiram na minha caminhada: Anna Karenine, sempre ao meu lado, com suas palavras encorajadoras e ombro amigo; Irmgard Buhr, exemplo de profissionalismo e competência, primeira incentivadora desse projeto e aos meus companheiros de curso Carina Paiva, Cleidiane Vieira, Dafne Quixabeira, Felipe Peixe, Giwellington Albuquerque, Ledson Gláucio, Libânia Ribeiro, Lidier Roberta, Madi Diniz e Tamires Meira (em ordem alfabética para me sentir justa), porém queria que soubessem que cada um de vocês, com suas habilidades distintas, mas com uma generosidade e disponibilidade em servir comum, teve um peso decisivo e único para conclusão dessa caminhada e ficarão para sempre guardados no meu coração, acreditem. Obrigada Margarete Valdevino, secretária do programa, sempre com uma palavra de força e carinho nos momentos difíceis.

Aos meus colegas de trabalho, Stefana Scalia, Luiza de Marillac, Keila Oliveira, Zilma dos Anjos, Nádia Regina, Klewdma Araújo, Alexsandro Pedro por me darem suporte nas horas de ausência e acima de tudo por me incentivarem sempre. Obrigada Neyla Alves e todos do “Clubinho HIV”, vocês são especiais.

Por fim agradeço aos professores, coordenadores, orientador e coorientadores por minha formação acadêmica.

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino.”

Paulo Freire

RESUMO

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1) tem como característica clássica a depleção de linfócitos T (LT) CD4+, que quando não tratada culmina na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Com o surgimento terapia antirretroviral (TARV), na década de 80, ocorreu uma verdadeira revolução. A TARV, apesar de não eliminar o vírus, consegue manter a carga viral em níveis indetectáveis, melhorando a qualidade de vida dos portadores. No entanto, entre 15-30% dos indivíduos em uso regular de TARV e com carga viral indetectável não consegue recuperar os níveis de LT CD4+ (Recuperação Imunológica). Estudos apontam que a apoptose pode estar envolvida na diminuição dos LT CD4+ e que variações genéticas como polimorfismos de base única (SNPs) em moléculas envolvidas nas vias da apoptose podem levar a diferentes respostas imunológicas do indivíduo à infecção. Neste sentido, o presente estudo se propôs a investigar o papel de SNPs (rs1800692, rs767455, rs2270926, rs8904, rs1800629) em genes codificadores de proteínas que ativam a via extrínseca da apoptose através do TNF- α /TNFR1, e sua relação com a recuperação imunológica de pacientes com uso regular de TARV. Foram estudados 113 pacientes HIV positivos, atendidos e tratados no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), em uso de TARV por um ano e com carga viral indetectável, os quais foram divididos em dois grupos: sucesso imunológico (controle) e falha imunológica (caso). Não foram observadas associações entre os polimorfismos dos genes estudados com o sucesso ou falha imunológica apresentada pelos indivíduos fazendo uso regular da TARV. Também não foi observada nenhuma associação entre a falha imunológica e as variáveis clínicas: peso, etnia, idade, gênero e esquema terapêutico. Apesar da ausência de associações dos SNPs estudados com a falha imunológica, alguns fatores limitantes do estudo devem ser considerados (pequeno número amostral, não inclusão de outras moléculas da via estudada), se fazendo necessário novos estudos de réplica em outras populações.

Palavras-chave: Apoptose. SNPs. TNF- α /TNFR1. HIV. TARV.

ABSTRACT

Infection by Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) has as a classic feature the depletion of T lymphocytes (TL) CD4 + that, when untreated, culminates in Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). With the advent of HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), in the 80s, there was a real revolution. The ART, although it doesn't eliminate the virus, it can keep the viral load in undetectable levels, improving the quality in patient's' lives. However, 15-30% of individuals regularly using HAART and with undetectable viral load, cannot recover CD4 + LT levels (Immune Recovery). Studies have shown that apoptosis may be involved in CD4 + depletion and genetic variations, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs), in molecules involved in apoptosis pathways can lead to different immune responses from the individuals to the infection. Therefore, the present study aims to investigate the role of SNPs (rs1800692, rs767455, rs2270926, rs8904, rs1800629) in genes encoding proteins that activate the extrinsic pathway of apoptosis, by TNF- α / TNFR1, and its relationship with immune recovery of patients in regular use of HAART. We studied 113 HIV-positive patients assisted and treated by the Institute of Integrative Medicine Professor Fernando Figueira (IMIP), who were under HAART for at least one year and with undetectable viral load, which we divided into two groups: immunological success (control) and immunological failure (case). There were no associations between the polymorphisms of the studied genes with the immune failure presented by individuals making regular use of HAART. Also, it has been observed no associations between the immunologic failure with the clinical variables: weight, ethnicity, age, gender and treatment regimen.

Despite the absence of associations of SNPs studied with immunological failure, some limitations of the study should be considered (small sample size, no inclusion of other molecules of the studied pathway), thus new replica studies in other populations are necessary.

Keywords: Apoptosis. SNPs. TNF- α / TNFR1. HIV. HAART.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do HIV	21
Figura 2. Ciclo de vida do HIV detalhando todas as fases desde a entrada do vírus na célula até o brotamento de novas partículas	22
Figura 3. Alguns mecanismos envolvidos na depleção de Linfocitos CD4.....	28
Figura 4. Vias de Sinalização TNF/TNFR	32
Tabela 1. Caracterização dos SNPs selecionados para o estudo	34

Apêndice A

Tabela 1. Características clínicas e epidemiológicas da população estudada	55
Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs nos genes da via TNF- α , TNFR1 em pacientes soropositivos para HIV-1 em Pernambuco.....	55
Tabela 3. Frequências das combinações alélicas dos SNPs no gene do TNFR1 em pacientes soropositivos para HIV-1 em Pernambuco.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZT	Azidotimidina
CCR5	Correceptor de quimiocina 5
cIAP1 e 2	Proteína 1 e 2 Inibidora de Apoptose Celular
CXCR4	Correceptor de quimiocina 4
DD	Domínio de morte
E1	Enzima ubiquitina ativação
E2	Enzima ubiquitina conjugação
E3	Enzima ubiquitina ligase
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EIA	Enzima imuno ensaio
Env	Envelope
FADD	Fas associada ao domínio de morte
FDA	Food and Drug Administration
Gag	Antígeno grupo específico
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
gp 41	Glicoproteína 41
gp 120	Glicoproteína 120
GWAS	Estudos de associação de genoma completo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
IF	Inibidores de Fusão
IFA	Teste de imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulinas G
II	Inibidores da Integrase
IKK	Complexo quinase
IL-6	Interleucina 6
IN	Integrase
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
IP	Inibidor de Protease
LIA	Teste de imunoensaio em linha
MAF	Frequência do alelo minoritário

MS	Ministério da Saúde
Nef	Proteína viral Nef
NEPRC	New England Primate Research Center
NF- κ B	Fator Nuclear-kappa B
NK	células Natural Killer
NNRTI	Inibidores não análogos a nucleosídeos da transcriptase
NRTIs	Inibidor análogo a nucleosídeos da transcriptase reversa
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
P17	Proteína de matriz 17
Pol	Polimerase
Rev	Regulador de expressão dos genes virais
RIP1	Proteínas de interação com receptor
SICLOM	Sistema de Controle Logístico de Medicamentos
SIM	Sistema de Informação Sobre Morte
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SNP	Polimorfismos de Base Única
SODD	Proteína silenciadora do domínio de morte
TasP	Tratamento com prevenção
TARV	Terapia antirretroviral
Tat	Transativador transcriptional
Th1	Linfócitos auxiliares T CD4+
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral
TR	Teste Rápido
TR	Transcriptase Reversa
TRADD	Adaptador TNFR Associado ao Domínio de Morte
TRAF2	Fator 2 Associado ao TNFR
Treg	Células T reguladoras
UNAIDS:	Nações Unidas HIV/AIDS
Vif	Fator de infectividade viral
Vpr	Proteína viral R
Vpu	Protein viral U
WB	Western Blot

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O HIV e a AIDS.....	17
2.1.1 Epidemiologia do HIV/AIDS.....	19
2.1.2 Estrutura e Genoma.....	20
2.1.3 O HIV e seu Ciclo	21
2.1.4 Diagnóstico	22
2.1.5 Tratamento	24
2.2 Patogênese da AIDS e Apoptose	26
2.3 Via TNF- α /TNFR1 ativando o Complexo Proteico NF-kB e a Molécula A20...	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Grupo de estudo	32
3.2 Extração de DNA genômico	33
3.3 Seleção de Polimorfismos de base Única (SNPs).....	34
3.4 Genotipagem.....	34
3.5 Análises Estatísticas.....	34
4 RESULTADOS	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE A	45
ANEXOS	57

1. APRESENTAÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS), ocasionada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), representa um grave problema de saúde pública mundial. Dados epidemiológicos divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no final do ano de 2015 evidenciaram que mais de 36,9 milhões de pessoas vivem com o HIV, tendo ocorrido 2 milhões de novas infecções e cerca de 1,2 milhões de óbitos (UNAIDS, 2015a).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) através do boletim epidemiológico HIV/AIDS, divulgou que do início da epidemia na década de 80 até junho de 2015 foram registrados 798.366 casos da doença. Existe uma grande variação na distribuição geográfica dos casos de HIV/AIDS no país, as maiores concentrações se encontram nas regiões Sudeste (53,8%) e Sul (21%), enquanto as menores concentrações são vistas nas regiões Nordeste (14,6%), Centro Oeste (5,9%) e Norte (5,7%). Os indivíduos de ambos os sexos com faixa etária entre 25-39 anos são os mais afetados. A taxa de detecção da AIDS ficou em 19,7 (por 100 mil habitantes) e o coeficiente de mortalidade foi determinado em 5,5 por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015).

O HIV pertence à família dos retrovírus e apresenta duas formas genéticas: HIV-1 e HIV-2 (PEETERS; D'ARC; DELAPORTE, 2014). Sua transmissão ocorre através de fluidos biológicos contaminados, como: sangue, sêmen, secreções vaginais e por transmissão vertical (de mãe para filho). A principal forma de contaminação se dá por relações sexuais sem uso de preservativo (KUMAR et al., 2010).

Os linfócitos T CD4⁺ são os principais alvos da infecção pelo HIV, mas outras linhagens celulares como monócitos e células dendríticas também podem ser infectadas (WILEN; TILTON; DOMS, 2012). A infecção tem como característica clássica uma depleção dos linfócitos T CD4⁺ com consequente surgimento das doenças definidoras da AIDS, dentre elas, tuberculose, toxoplasmose, candidíase (PAIARDINI; MÜLLER-TRUTWIN, 2013).

As células T CD4⁺ do tecido linfóide associado ao intestino (GALT, do inglês Gut Associated Lymphoid Tissue) são um importante alvo para replicação do vírus, o que leva as mesmas a sofrerem grande depleção, possivelmente por apoptose ou morte celular programada culminando com a perda da integridade da barreira da mucosa intestinal. A perda dessa integridade vai permitir a translocação de produtos bacterianos e fungos para o sistema

circulatório levando a uma ativação imune sistêmica (BRENCHLEY et al., 2004). Essa ativação, juntamente com a replicação viral no GALT, leva a uma depleção contínua de células T CD4⁺ chegando ao estado de exaustão imune, que é a incapacidade das células do sistema imune responder de forma eficiente à infecção pelo HIV e outros patógenos (GONZALEZ; ZAPATA; RUGELES, 2016). O paciente infectado pelo HIV apresenta uma constante ativação do sistema imune, estabelecida logo na fase inicial da infecção que, no entanto, não é capaz de deter a replicação viral, já que as células do sistema imune não conseguem exercer suas funções efectoras de forma eficiente, quer seja por apresentarem alterações funcionais ou devido aos mecanismos desenvolvidos pelo vírus para evadir-se do sistema imunológico (SHAW et al., 2011).

O HIV induz não só a morte das células T infectadas, células T adjacentes não infectadas também são eliminadas por apoptose, desencadeada por uma série de estímulos como superexpressão de ligantes de morte (FasL, TNF), citotoxicidade de proteínas solúveis do vírus (gp120, tat, nef, e vpr) (WANG et al., 2012).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias: Intrínseca e Extrínseca. Na via intrínseca ocorrem danos na membrana mitocondrial com extravasamento do citocromo C decorrente do desequilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas da família bcl2. Esses danos podem ser induzidos por drogas, radiações ultravioletas ou privação de fatores de crescimento. Já a via extrínseca é dependente da ligação de ligantes (TNF, FasL) aos seus receptores com domínio de morte presentes na membrana plasmática. As duas vias convergem para ativação de caspases desencadeadoras (caspases 8, 9, 10) e caspases executoras (caspases 3, 7) levando a célula ao processo apoptótico (MBITA; HULL; DLAMINI, 2014).

O TNF- α , um dos ativadores da via extrínseca da apoptose, é uma citocina pró-inflamatória, está envolvida em diversas respostas biológicas incluindo inflamação e apoptose através da ativação do complexo NF- κ B (Fator Nuclear Kappa B). Pacientes infectados pelo HIV apresentam uma produção aumentada dessa citocina, principalmente por monócitos. Na fase aguda da infecção, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α é benéfica, porém uma liberação continuada na fase crônica contribui para ativação imune aberrante induzindo apoptose celular (DUTERTRE et al., 2012).

A via extrínseca da apoptose é desencadeada pela ligação do TNF- α ao TNFR1 com recrutamento de proteínas adaptadoras como TRADD (Proteína com Domínio de Morte Associada ao TNFR) (CHAN et al., 2000; ENDRES et al., 2003). O sinal apoptótico é iniciado

quando TRADD recruta a FADD (Proteína com Domínio de Morte Associado ao Fas), a qual recruta caspase 8, que se ativa por autoclivagem levando a célula ao processo apoptótico. Uma resposta inflamatória também pode ser desencadeada por essa via quando TRADD recruta proteínas de interação com receptor (RIP1) e o fator 2 associado ao TNFR1 (TRAF2). Na sequência RIP1 é poliubiquitinada inativando o complexo proteico inibidor de Kappa B (IKB) conjugado ao complexo NF- κ B. Com essa inativação, o complexo NF- κ B fica livre e se transloca para o núcleo celular (CABAL-HIERRO; LAZO, 2012) onde ativa a transcrição de uma variedade de genes envolvidos em respostas imunes inatas e adaptativas (inflamação, adesão e sobrevivência celular). Dentre esses genes está o codificador da proteína A20 (CATRYSSSE et al., 2014; HAYDEN; GHOSH, 2004). A proteína A20 surge como um regulador negativo chave do NF- κ B atuando como anti-inflamatória, equilibrando a transitoriedade da resposta inflamatória e pró-apoptótica (GIORDANO, et al., 2014). Sua função pró-apoptótica se dá pela desubiquitinação de RIP1, que culmina com a ativação da caspase 8 e induz apoptose. A20 desempenha papel anti-inflamatório também por desubiquitinação de RIP1 bloqueando assim a ativação do complexo NF- κ B (BERTRAND et al., 2008; LI; YIN; WU, 2013a; WANG; DU; WANG, 2008). O que faz uma célula infectada seguir a via apoptótica ou inflamatória ainda não foi elucidado e nem os mecanismos moleculares envolvidos na morte celular programada (KELLY et al., 2013).

O controle da infecção por HIV se baseia no diagnóstico e tratamento precoces da população infectada (MOYO et al., 2015). A Terapia Antirretroviral (TARV) surgiu na década de 80 e mesmo não eliminando o vírus, consegue manter a carga viral em níveis indetectáveis diminuindo assim a transmissão da doença, reduzindo a morbidade e mortalidade e melhorando a qualidade de vida das pessoas infectadas pelo HIV/AIDS (BAROUCH; DEEKS, 2014). Após um ano de uso regular de TARV, 80% dos indivíduos conseguem alcançar o sucesso virológico (carga viral plasmática inferior a 50 cópias/mL). Dentre esses, um grupo recupera os níveis de linfócitos T CD4⁺ em 20% em relação ao nível antes do tratamento, sendo definido como grupo de sucesso imunológico. No entanto, entre 15-30% dos indivíduos, mesmo em sucesso virológico, não consegue alcançar o sucesso imunológico sendo classificados como o grupo de falha imunológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014).

Neste sentido, consideramos a hipótese de que polimorfismos de base única (SNPs) em genes codificadores de moléculas da via extrínseca da apoptose desencadeada pelo TNF- α /TNFR1 podem desencadear níveis exacerbados de apoptose em indivíduos HIV positivos em

uso regular de TARV, impedindo que os mesmos recuperem os níveis de células T CD4+ (sucesso imunológico).

O presente trabalho teve como objetivo verificar as possíveis associações entre SNPs em genes codificadores das moléculas TNF- α , TNFR1, IKB e A20 com a recuperação imunológica das células T CD4+ em pacientes HIV positivos em uso regular de TARV. Como objetivos específicos tivemos: selecionar variações genéticas nos genes que codificam as moléculas TNF- α , TNFR1, IKB e A20; analisar a recuperação imunológica das células T CD4+ em indivíduos HIV+ sob tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O HIV e a AIDS

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um retrovírus que pertence à família retroviridae sendo um dos membros do gênero lentivírus. Duas formas genéticas diferentes, HIV-1 e HIV-2, foram isoladas em humanos infectados (PEETERS; D'ARC; DELAPORTE, 2014) e são resultado de múltiplas transmissões zoonóticas da SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia) de primatas não humanos para seres humanos na África ocidental e central. A transmissão entre espécies se deu provavelmente durante a caça de primatas para obtenção de carne e também da captura desses animais para venda como animais de estimação (HAHN et al., 2000; HEMELAAR, 2012). Existe registro de mais de quarenta espécies de primatas não humanos abrigando diferentes infecções SIV e cada uma dessas espécies carrega um vírus específico (AGHOKENG et al., 2010).

A primeira evidência da infecção pelo HIV em humanos se deu em 1959 em amostra de sangue e em 1960 em biópsia de linfonodo armazenados em Kinshasa na República Democrática do Congo (KORBER et al., 2000; WOROBEY et al., 2008).

Em 1983, o HIV-1 foi identificado como causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) por Francoise Barré-Sinoussi (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983) e em 1984 o primeiro lentivírus Simius (SIVmac) foi isolado de um macaco Rhesus cativo (Macaca mulata) no New England Primate Research Center (NEPRC) com sintomas clínicos similares a AIDS. Diante dessa similaridade, foi levantada a suspeita de uma origem símia do HIV

(DANIEL et al., 1985; KANKI et al., 1985), no entanto, esses macacos não eram os hospedeiros naturais da infecção e foram infectados pelos hospedeiros naturais, os macacos Sooty mangabey (APETREI et al., 2005; FULTZ et al., 1986). O HIV-2 foi identificado em 1986 em pacientes da África ocidental e sua transmissão aos humanos se deu através do SIVsm (Sooty mangabey) proveniente dos macacos dessa espécie (CLAVEL et al., 1986; SHARP; HAHN, 2011). Atualmente se sabe que a infecção pelo HIV é transmitida de um indivíduo a outro através de fluidos contaminados como sangue, secreção vaginal ou sêmen. A transmissão vertical é outra forma de propagação da infecção onde mulheres grávidas infectadas contaminam seus filhos, porém a principal forma de transmissão continua sendo as relações sexuais sem uso de preservativo (KUMAR et al., 2010).

O HIV 1 e 2 compartilham entre si 30-60% de similaridade genética havendo semelhanças também na estrutura, organização genômica e formas de transmissão. Apesar das semelhanças o HIV-2 é menos transmissível que o HIV-1 (HU et al., 1996; MAKVANDI-NEJAD; ROWLAND-JONES, 2015; REEVES; DOMS, 2002). O HIV-1 afeta todos os continentes sendo o responsável pela pandemia mundial enquanto o HIV-2 predomina no oeste da África, mas casos já foram relatados no Japão e Portugal (COURGNAUD; MULLER-TRUTWIN; SONIGO, 2004).

Transmissões zoonóticas de primatas não humanos para os seres humanos têm gerado várias linhagens do vírus. O HIV-1 oriundo de transmissão zoonótica do SIVcpz de chimpanzés (*Pan troglodyte*) compreende quatro grupos distintos, cada um deles originado de transmissões interespecíes, sendo eles: M, N, O e P (SIMON et al., 1998; VALLARI et al., 2011).

O grupo M é a forma mais comum presente em quase todos os países do mundo sendo o primeiro a ser descoberto e se divide em nove subtipos de A-D, F-H, J e K. A distribuição geográfica dos subtipos de M difere segundo o tempo da epidemia no país e segundo a migração da população (DE LEYS et al., 1990; GURTLER et al., 1994).

Em nível mundial, os subtipos não B representam 90% dos vírus circulantes. O subtipo dominante é o C (50%) presente principalmente na África do Sul e Ásia, os subtipos A e D na África do leste e o subtipo B na América do Norte, Europa e Austrália (GERETTI, 2006).

O grupo O, descoberto em 1990, representa menos de 1% das infecções e é restrito a Camarões, Gabão e países vizinhos (MAUCLÈRE et al., 1997; PEETERS et al., 1997). O grupo N é menos prevalente que o grupo O (SIMON et al., 1998), os poucos casos registrados foram

em Camarões (VALLARI et al., 2010) e o grupo P foi descoberto em 2009 em uma mulher Camaronesa que vivia na França, todos esses grupos são capazes de causar AIDS e diferem na sua distribuição dentro da população (PLANTIER et al., 2009).

2.1.1 Epidemiologia do HIV/AIDS

Os dados epidemiológicos divulgados no final do ano de 2015 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstraram que o HIV/AIDS continua a ser um grave problema de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 34 milhões de mortes. Os números mostraram que havia cerca de 36,9 milhões de pessoas vivendo com o vírus e o número de pessoas que se tornaram infectadas chegou a 2,0 milhões. Já o número de óbitos por doenças relacionadas à AIDS ficou em 1,2 milhões. A África Subsaariana foi a região mais afetada com 25,8 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS sendo também responsável por quase 70% do total global de novas infecções (UNAIDS, 2015a).

O Ministério da Saúde (MS), através do boletim epidemiológico HIV/AIDS de 2015, divulgou que desde o início da epidemia da AIDS no Brasil na década de 80 até o mês de junho de 2015, o país registrou 798.366 casos da doença. Esses dados foram obtidos das fontes de notificação compulsória dos casos de HIV/AIDS: o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) registrou 77,0%, o SIM (Sistema de Informação Sobre Morte) 5,7% e o SISCEL/SICLOM (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais/Sistema de Controle Logístico de Medicamentos) 17,3% (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015).

Existem diferenças importantes na distribuição geográfica dos casos de AIDS no Brasil, as maiores concentrações encontram-se nas regiões Sudeste (53,8%) e Sul (20,1%) enquanto as menores concentrações ficam com as regiões Nordeste (14,6%), Centro-Oeste (5,9%) e Norte (5,7%). Indivíduos com faixa etária entre 25 e 39 anos, de ambos os sexos, são os mais afetados pela AIDS no país, os homens correspondem a 53,6% e as mulheres a 49,8% do total dos casos notificados no período de 1980 a junho de 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015).

O coeficiente de mortalidade padronizado da AIDS (por 100 mil habitantes) foi determinado em 5,7 sendo observado mais uma vez uma grande variação entre as regiões brasileiras, o maior número de óbitos foi registrado na região Sudeste (61,0%) e o menor na região Norte (5,9%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015).

Segundo os dados de dezembro de 2014 do MS, a taxa de detecção da AIDS caiu de 20,8 (por 100 mil habitantes) em 2013 para 19,7 em 2014 sendo a maior redução da epidemia registrada nos últimos doze anos e a mortalidade pela doença teve uma queda de 11% no período de 2003-2014 passando de 6,4 óbitos (por 100 mil habitantes) para 5,7. Os dados são do boletim epidemiológico de HIV/AIDS de 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015).

Em Pernambuco, foram notificados 1.619 casos de infecção no período de julho de 2014 a março de 2015. Os indivíduos do sexo masculino respondem por 61,46% dos casos e a faixa etária mais atingida, 67,2%, são adultos jovens com idade variando entre 20-39 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015).

2.1.2 HIV – Estrutura e Genoma

O HIV é um vírus envelopado e como todo lentivírus codifica as proteínas Env (Envelope), Gag (Group Specific Antigen) e Pol (Polymerase) (WAHEED; FREED, 2012). Além dessas, codifica também as proteínas regulatórias Tat (Transativador transcriptional) e Rev (Regulator of expression of virions proteins) e as proteínas acessórias Vpu (Viral protein unique), Vif (Viral infectivity), Nef (Negative fator) e Vpr (Viral protein R) (KOGAN; RAPPAPORT, 2011) que desempenham papel crucial na modulação da patogenicidade e replicação do vírus (BASMACIOGULLARI; PIZZATO, 2014).

A estrutura do vírus é esférica com diâmetro de 80 a 120 milímetros e circundada por uma bicamada lipídica (envelope) derivada da membrana celular do hospedeiro, revestida internamente por uma proteína de matriz (P17). Distribuídas sobre o envelope estão as proteínas virais gp 120 (Glicoproteína 120) e a gp 41 (Glicoproteína 41) de fundamental importância para infecção das células alvo. No centro do vírus fica o núcleo em forma de cone (capsídeo) e dentro do capsídeo está o genoma viral formado por duas fitas simples de RNA com aproximadamente 10 Kb e as enzimas: Transcriptase Reversa (TR), Integrase (IN) e Protease (HUTCHINSON, 2001) (Figura 1).

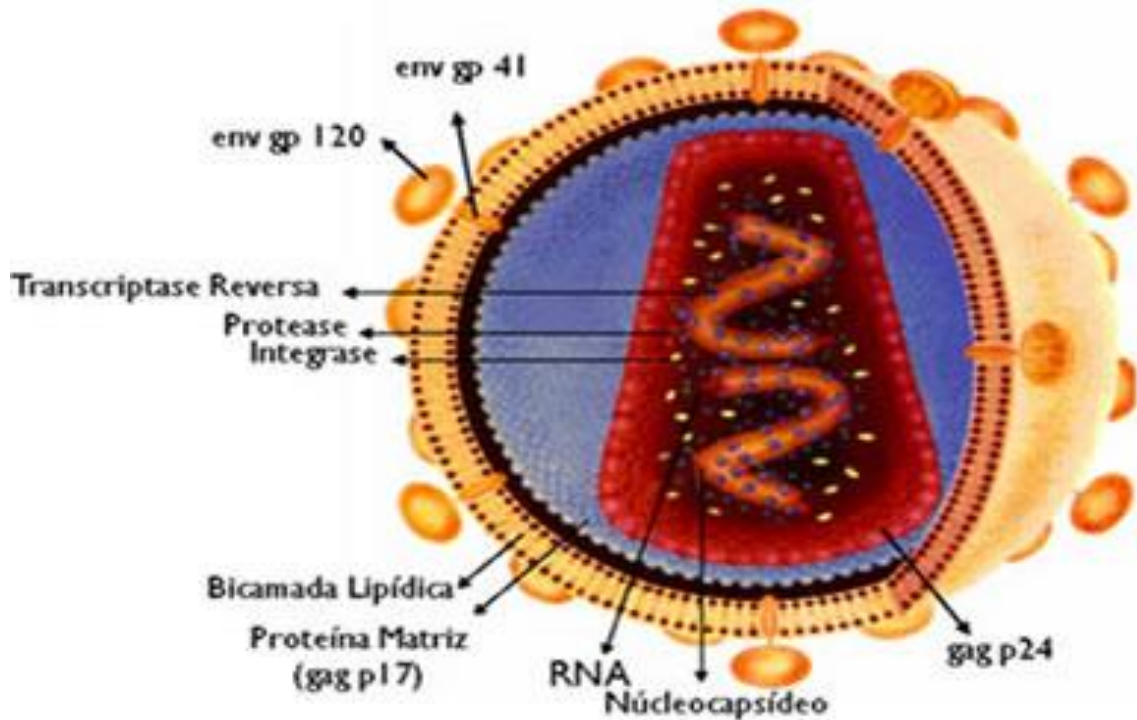


Figura 1. Estrutura do HIV. Fonte BISMARA, 2006.

2.1.3 O HIV-1 e seu ciclo

O HIV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4+, podendo infectar ainda macrófagos, monócitos e células dendríticas. A entrada do vírus na célula alvo se dá pela ligação entre a proteína gp 120 do envelope viral e os receptores CD4 e também com os correceptores de quimiocinas CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) ou CXCR4 (CXC chemokine receptor type 4) presentes nas células alvos (WILEN; TILTON; DOMS, 2012).

O vírus possui tropismo, dessa forma os que têm preferência por infectar células T são ditos T trópicos e os que infectam os macrófagos, são M trópicos (ARRILDT; JOSEPH; SWANSTROM, 2012). O tropismo se refere à habilidade do vírus em estabelecer infecção em diferentes tipos de células CD4+ sendo esse determinado pelo tipo de correceptor que irá usar. Os vírus M trópicos usam principalmente CCR5 como correceptor, enquanto que os vírus T trópicos infectam células T CD4+ via CXCR4. Existem também os vírus com duplo tropismo, M e T, esses utilizam CCR5 e/ou CXCR4 (GORRY; ANCUTA, 2011; JAKOBSEN et al., 2010). Após ligação e fusão do envelope viral com a membrana celular do hospedeiro, como

mostra a figura 2, o vírus alcança o citoplasma da célula, perde o capsídeo, deixando livre o genoma viral e as proteínas regulatórias e acessórias (BRIONES; DOBARD; CHOW, 2010; FRIEDRICH et al., 2011). Uma vez livre, a fita simples de RNA viral sofre transcrição reversa por ação da TR originando uma cópia de DNA pró-viral de fita dupla. Esse DNA será integrado ao genoma do hospedeiro pela enzima integrase e permanecerá na célula enquanto ela viver (GRANDGENETT et al., 2015). Depois de integrado ao genoma da célula do hospedeiro, o DNA pró-viral pode ficar latente por meses ou anos ou ser transcrito formando partículas virais completas que brotarão da membrana celular e estarão aptas a infectar novas células. Esse brotamento pode levar a célula infectada à morte (KUMAR et al., 2010) (Figura 2).

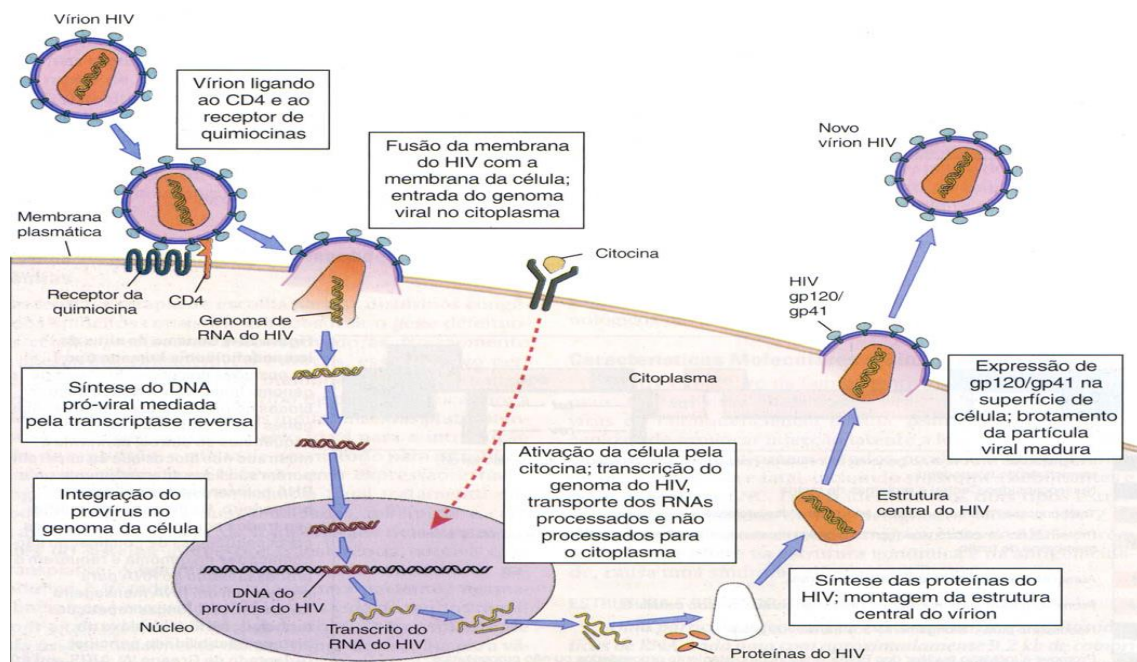


Figura 2. Ciclo de vida do HIV detalhando todas as fases desde a entrada do vírus na célula até o brotamento de novas partículas virais. Fonte: Robbins & Cotran, 2010.

2.1.4 Diagnóstico

A detecção de infecções recentes pelo HIV tem sido alvo de importantes pesquisas tendo como objetivo intervenções na prevenção de novas infecções e também no tratamento precoce da população infectada (MOYO et al., 2015).

A nova meta global 90-90-90 estabelecida pelo Programa Conjunto das Nações Unidas HIV/AIDS (UNAIDS) para ser atingida até o ano de 2020, visa diagnosticar 90% da população infectada, que 90% dessa população receba a terapia antirretroviral e que 90% da população em uso regular da TARV tenha carga viral suprimida. Cumprir a primeira meta 90 (diagnóstico do HIV) é essencial para que a segunda e terceira metas sejam alcançadas (UNAIDS, 2015b). No Brasil, segundo o boletim 2015 do MS, 83% dos casos já são diagnosticados, 82% dos indivíduos HIV+ estão em uso de TARV e 88% apresentam supressão viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015).

O diagnóstico sorológico da infecção por HIV pode ser feito através de testes que detectam a presença de anticorpos específicos para o vírus em amostras biológicas como sangue, saliva, secreções vaginais, entre outras. A detecção desses anticorpos pode ser feita entre três e seis semanas após a infecção, porém em alguns casos esse prazo pode ser maior (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014).

O primeiro teste para detecção de anticorpos foi o Enzima Imunoensaio (EIA, do inglês Enzyme Immuno Assays) em 1985. Esse teste de primeira geração detectava anticorpos IgG para o HIV-1, usando lisado viral como antígeno e tinha baixa sensibilidade e especificidade, dando resultado positivo aproximadamente seis a oito semanas após a infecção (CORNETT; KIRN, 2013; MURPHY; AITKEN, 2011; OWEN, 2012). O EIA de segunda geração diminuiu em uma semana o tempo de detecção da infecção em relação ao teste de primeira geração, a especificidade foi aumentada usando antígenos na forma de peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes o que conferia maior biossegurança aos operadores (OWEN, 2012). Nos testes de terceira geração, ocorreu um grande avanço, pois além de detectar IgM e IgG para HIV tipos 1 e 2, o tempo de detecção caiu para três semanas após a infecção e a sensibilidade era bem maior. Consequentemente, em 2007, os testes de terceira geração substituíram os testes de primeira e segunda geração. Em 2010, os testes de quarta geração foram disponibilizados nos Estados Unidos, embora outros países já utilizassem testes semelhantes há alguns anos. Esses testes são capazes de detectar IgM e IgG para HIV tipos 1 e 2 e também o antígeno p24, diminuindo o tempo de detecção para duas semanas após a infecção (MASCOTRA et al., 2011).

Quando os testes de triagem EIA detectam resultados positivos por duas vezes é necessário usar o teste de Imunofluorescência Indireta (IFA do inglês Indirect Immunofluorescence Assay), Western Blot (WB) ou Imunoensaio em Linha (LIA, do inglês

Line Immuno Assay) como testes confirmatórios. IFA consiste em um teste de alta especificidade onde células infectadas pelo HIV são fixadas em lâminas, os anticorpos anti-HIV se fixarão nas células e serão detectados por um segundo anticorpo conjugado com uma molécula fluorescente, sendo o resultado visualizado através de um microscópio de fluorescência. No entanto, esse tipo teste não é mais utilizado na rotina, sendo substituído pelo Westen Blot (WB), o qual usa proteínas específicas do vírus que vão se ligar a anticorpos específicos se presentes. O complexo antígeno-anticorpo será revelado pela adição de um segundo anticorpo conjugado com uma enzima seguido de um substrato que gera um produto colorido. A combinação dos testes EIA/WB fornecem alta sensibilidade (99,3 - 99,7%) e especificidade (99,7%) (BRANSON; MERMIN, 2011).

Os Testes Rápidos (TR) para detecção de anticorpos foram aprovados em 2002 pela Agência norte americana reguladora de remédios e alimentos (FDA, do inglês Food and Drug Administration) e utilizam dispositivos ou cassetes de fluxo lateral com membranas porosas para detectar IgM e IgG anti-HIV em amostras de fluido oral, sangue total, plasma ou soro. São testes que demandam um tempo médio de quinze minutos para fornecer o resultado, sendo essa uma grande vantagem. São muito úteis para utilização nas populações de baixa renda e em mulheres em trabalho de parto, uma vez que não requerem laboratório para sua realização. Os fabricantes relatam sensibilidade de 99,3 - 100% e uma especificidade de 99,7 - 99,9%, porém esses dados são controversos (DASKALAKIS, 2011).

Testes qualitativos para detectar RNA e/ou DNA viral são usados para diagnóstico de HIV e também como teste confirmatório. O Teste Molecular de RNA é muito sensível para detecção das infecções agudas, porém podem dar resultados negativos em 3 - 5% das amostras em infecções estabelecidas (OWEN et al., 2008).

2.1.5 Tratamento

Alguns poucos indivíduos podem resistir naturalmente à infecção pelo HIV e manter a replicação viral em níveis indetectáveis sem fazer uso de qualquer terapia. No entanto, a maioria dos indivíduos tendem a desenvolver a doença de forma rápida (entre 2 e 3 anos) ou de forma lenta (mais de 3 anos) se não forem tratados com uma terapia antirretroviral (KAUR et al., 2013).

A TARV surgiu na década de 80 e mesmo não eliminando o vírus, consegue manter a carga viral em níveis indetectáveis. Dessa maneira, diminui a taxa de transmissão da infecção, induz o restabelecimento dos níveis de células T CD4+, melhorando ao longo do tempo as respostas imunológicas contra infecções e reduzindo a morbidade e a mortalidade das pessoas infectadas pelo HIV/AIDS (BAROUCH; DEEKS, 2014).

Inicialmente, o tratamento era baseado na monoterapia e teve o primeiro medicamento aprovado pela FDA, a Azidotimidina (AZT), no ano de 1986. Com o passar do tempo, devido as altas taxas de mutações no genoma do HIV e desenvolvimento de resistência ao fármaco, essa terapia se tornou ineficaz (TANG; SHAFER, 2012), sendo substituída então pela combinação de fármacos passando a TARV dupla, e posteriormente, a atual TARV tríplice com o objetivo de diminuir as chances de resistência do vírus (CRESSEY; LALLEMANT, 2007).

Segundo os dados do Boletim Epidemiológico HIV/AIDS de 2015, estima-se que 450 mil infectados estão fazendo uso de TARV no Brasil que é distribuída gratuitamente desde o ano de 1996 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2015). Em dezembro de 2013, o Brasil adotou uma medida que prevê o tratamento como prevenção (TasP, do inglês Treatment as Prevention), onde após o diagnóstico da infecção pelo HIV, o tratamento já deve ser iniciado independente da contagem de Linfócitos T CD4+, visando com isso uma melhoria na qualidade de vida dos infectados e diminuição da taxa de transmissão do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014).

Atualmente, a TARV compreende vinte e um medicamentos divididos em seis grupos de acordo com sua atuação na restrição do ciclo viral: I- Inibidor Análogo a Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (NRTIs do inglês Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors), II- Inibidores não Análogos a Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (NNRTI do inglês Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor), III- Inibidor de Protease (IP), IV- Inibidores de Fusão (IF), V- Inibidores da Integrase (II), VI- Antagonista do correceptor de quimiocina CCR5 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014).

No Brasil, os principais esquemas de TARV são padronizados pelo MS/Departamento DST/AIDS. O esquema de primeira linha compreende 2 NRTIs (Tenofovir + Lamuvidina) e 1 NNRTI (Efavirenz), mas também existem os esquemas de segunda e terceira linha para a população que apresentar intolerância ou resistência ao esquema de primeira linha (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014).

Com o uso regular da TARV, a supressão viral pode ser alcançada com consequente reconstituição imune e prevenção do aparecimento das doenças relacionadas à AIDS (CUMMINS; BADLEY, 2014; DESVARIEUX et al., 2013). Estudos mostram que após um ano de uso regular de TARV, 80% dos pacientes alcançam o sucesso virológico (carga viral plasmática inferior a 50 cópias/mL). Dentre esses estão os que também conseguem alcançar o sucesso imunológico definido como o incremento de 20% dos níveis de linfócitos T CD4+ após um ano de tratamento regular. No entanto, de 15-30% dos indivíduos em sucesso virológico não conseguem atingir o incremento dos linfócitos T CD4+ no percentual acima citado e são classificados como o grupo com falha imunológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014).

2.2 Patogênese da AIDS e Apoptose

A infecção crônica pelo HIV tem como característica clássica uma severa e seletiva depleção dos linfócitos T CD4+. No período agudo da infecção que tem duração de quatro a cinco semanas, ocorre intensa replicação viral com disseminação do local da infecção para diversos tecidos e órgãos; os sintomas são comuns a muitas infecções virais: febre, adenopatia, faringite, mialgia, artralgia e outros (COHEN et al., 2011; KREBS; ANANWORANICH, 2015). Nas semanas seguintes a carga viral diminui e estabiliza, e se não houver início da TARV, a fase seguinte será a fase crônica, onde pode ocorrer a progressão para AIDS, a qual é caracterizada por intensa redução dos linfócitos T CD4+ e surgimento das doenças definidoras da AIDS como candidíase, toxoplasmose, pneumocistose e tuberculose (LYLES et al., 2000).

A ativação crônica do sistema imune é considerada atualmente como ponto chave para a depleção das células T CD4+ e desenvolvimento da AIDS, no entanto ainda não está clara a ligação existente entre esses dois eventos (PAIARDINI; MÜLLER-TRUTWIN, 2013). Desde as fases iniciais da infecção essa ativação já se estabelece levando ao estado conhecido como exaustão imune que se traduz pela incapacidade das células do sistema imunológico responder de forma adequada ao vírus e outros patógenos (DIEGUEZ-GONZALEZ et al., 2009; GONZALEZ; ZAPATA; RUGELES, 2016). Se por um lado a ativação crônica das células envolvidas nas respostas imunes promove sobrevida, por outro essas células perdem funções efetoras como: proliferação, produção de citocinas e potencial citotóxico (KHAITAN; UNUTMAZ, 2011; SAUCE; ELBIM; APPAY, 2013).

Estudos mostram que a ativação imune crônica nas infecções por HIV está associada à perda da função imune do trato gastrointestinal. As células T CD4+, particularmente as que expressam CCR5, sofrem grande depleção nesse sítio durante as primeiras semanas da infecção. Essa depleção acentuada está associada com apoptose das células do epitélio intestinal e comprometimento da integridade da barreira da mucosa intestinal, o que favorece a translocação de produtos bacterianos e de fungos para o sistema circulatório (BRENCHLEY et al., 2004; MATTAPALLIL et al., 2005; XU et al., 2014).

A resposta inicial do sistema imune após o contato com o HIV é de fundamental importância, uma vez que nesse momento será definido se o vírus será eliminado na mucosa, no caso das transmissões sexuais, ou se a infecção vai se estabelecer. Sendo a infecção estabelecida a resposta imune irá determinar a magnitude da replicação viral, a estabilização da carga viral após a fase aguda da infecção e o nível de ativação imune (BORROW, 2011).

Na fase aguda da infecção ocorre intensa replicação viral com destruição maciça dos linfócitos T ativados (CD4+/CCR5+) de memória, localizados no Tecido Linfoide Associado ao Intestino (GALT, do inglês Gut Associated Lymphoid Tissue). Essas células são o alvo preferencial do vírus (BUCCIGROSSI et al., 2011). Uma lenta e progressiva depleção de linfócitos T CD4+ ocorre, em seguida, nos tecidos periféricos e sangue (DOUEK; PICKER; KOUP, 2003). Nessa fase são recrutadas células efetoras da imunidade celular como os linfócitos auxiliares T CD4+ (Th1) produtores de citocinas e quimiocinas (IL-2, interferon gama) e linfócitos T CD8+ citotóxicos capazes de reconhecer especificamente e destruir células infectadas por vírus; macrófagos também são ativados para exercer sua função fagocitária. No entanto, esse tipo de resposta imunitária, capaz de eliminar a maioria das infecções, não consegue eliminar nem controlar a replicação viral do HIV (GOUGEON et al., 1996; GOUGEON; LEDRU; LECCEUR, 2000).

Apesar da ativação das células do sistema imunológico, as mesmas não conseguem exercer suas funções efetoras de forma eficiente permitindo assim a replicação viral. Postula-se que essas células apresentem alterações nas suas funções ou que os mecanismos desenvolvidos pelo vírus para evadir-se do sistema imune superem a resposta efetora. Além disso, uma resposta aumentada das células T reguladoras (Treg), cuja função é suprimir a atividade imune efetora protegendo o tecido de danos induzidos por excessiva ativação celular e proliferação favoreceria a replicação viral, bem como a expressão de inibidores moleculares em diferentes populações celulares, regularia para baixo a resposta imune (SHAW et al., 2011).

À medida que a infecção progride ocorre destruição celular nos tecidos linfoides onde são geradas as células efetoras da resposta imunitária. Entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺ ocorre perda de subpopulações de células naíve e de células de memória central resultando no aumento de células efetoras de vida curta (RIBEIRO et al., 2002) (PICKER et al., 2004). As células Natural Killer (NK) apresentam alteração na funcionalidade como diminuição da produção de citocinas, aumento de citotoxicidade (REEVES et al., 2010). Respostas defeituosas de células B foram descritas, incluindo hiperativação e desregulação de subgrupos de células B com produção alterada de anticorpos (MOIR; FAUCI, 2009).

O HIV induz tanto a morte das células T infectadas quanto das não infectadas como se observa na Figura 3. Alguns achados demonstram que as células morrem por apoptose induzida por uma série de estímulos como exemplo: superexpressão de ligantes de morte (Ligantes de FAS, TNF), citotoxicidade de algumas proteínas solúveis do HIV como gp120, tat, nef e vpr (WANG et al., 2012).

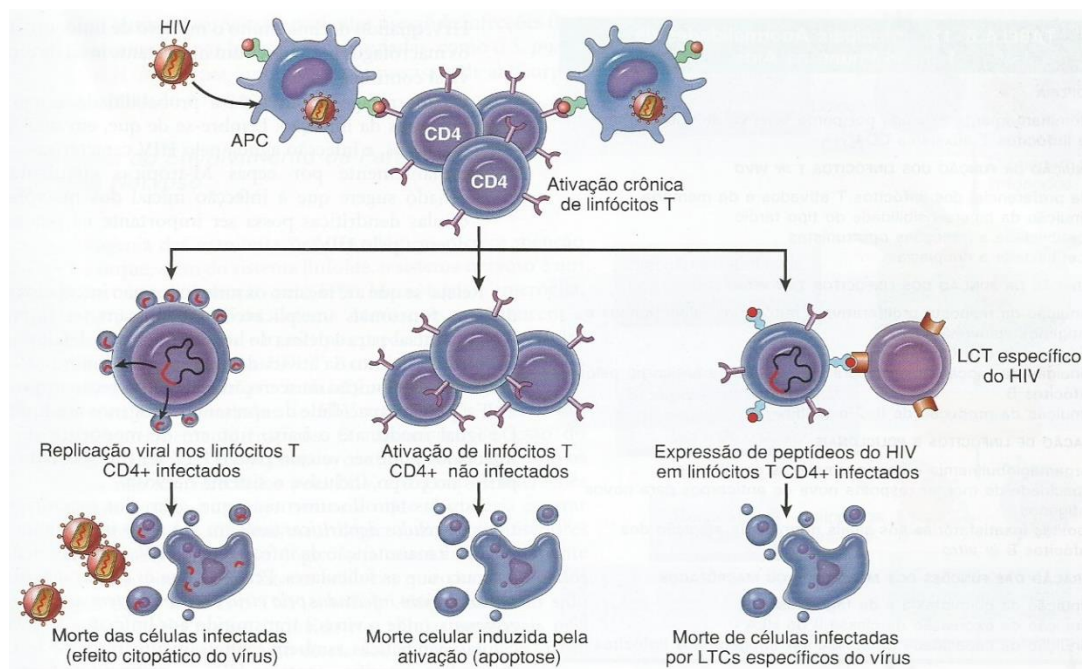


Figura 3. Alguns mecanismos envolvidos na depleção de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção pelo HIV. Fonte: Robbins & Cotran, 2010

Apoptose ou morte celular programada ocorre durante o desenvolvimento dos tecidos agindo como um mecanismo que mantém a homeostase. Inibição ou exacerbação deste mecanismo está envolvida em muitas patologias: doenças neurodegenerativas, câncer e AIDS

(NORBURY; HICKSON, 2001). A célula em apoptose apresenta alterações estruturais, bioquímicas e moleculares clássicas: condensação e fragmentação do DNA celular, externalização da fosfatidilserina, lipídio que em condição normal de funcionamento celular faz parte do folheto interno da membrana celular, a consequência desta externalização é o reconhecimento por células fagocitárias, brotamento de bolhas e formação dos corpos apoptóticos a partir da membrana citoplasmática (IGNEY; KRAMMER, 2002).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias: intrínseca e extrínseca. A via intrínseca se dá por danos na membrana mitocondrial induzidos por diferentes estímulos: drogas, radiações ultravioletas, privação de fatores de crescimento. Esses fatores desregulam o funcionamento mitocondrial resultando na saída do citocromo C, regulada por proteínas da família bcl-2 do núcleo celular, e ativação de caspases desencadeadoras da apoptose (caspase 9), culminando com ativação das caspases executoras (caspases 3), promovendo a apoptose. Por outro lado, a via extrínseca é dependente da ligação dos receptores com domínio de morte (TNFR1, FAS), presentes na membrana celular aos seus ligantes (TNF, FasL) o que leva a ativação das caspases desencadeadoras (caspases 8/10) progredindo com a ativação das caspases executoras da apoptose (caspases 3) (MBITA; HULL; DLAMINI, 2014).

2.3 Via TNF- α / TNFR1 ativando o Complexo Proteico NF-kB e a Molécula A20

A via extrínseca da apoptose é desencadeada pela ligação do TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) ao TNFR1 (Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral). A infecção por HIV leva ao aumento de diversas proteínas plasmáticas entre elas o TNF- α (WIERCIŃSKA-DRAPALO et al., 2004).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória multifuncional envolvida em diversas respostas biológicas, incluindo apoptose e inflamação, estando relacionadas às respostas imune inata e adaptativa. A liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 (Interleucina 6) e interferon gama na fase aguda de infecções é benéfica, no entanto, na fase crônica a liberação continuada contribui para ativação imune aberrante induzindo apoptose celular, como na infecção pelo HIV (KASER; TILG, 2009). Pacientes infectados pelo HIV que não conseguem atingir a supressão viral apresentam uma produção aumentada de TNF- α , principalmente por monócitos (DUTERTRE et al., 2012).

Essa citocina é capaz de induzir diversas respostas imunológicas através da sinalização transmitida por dois receptores de membrana: os receptores do tipo I (TNFR1) também denominado de CD120a ou TNFRSF1A expressos em todos os tipos celulares; e os do tipo II (TNFR2) tendo como sinônimo CD120b ou TNFRSF1B expressos principalmente em células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (SENNIKOV et al., 2014).

O TNRF1 fica retido no complexo do sistema de Golgi até ser recrutado para superfície celular. Possui um domínio extracelular que se liga ao ligante (TNF- α) e outro intracelular com domínio de morte (DD, do inglês Death Domain) e atividade enzimática intrínseca que é ativada quando ocorre ligação do domínio extracelular com seu ligante. Na ausência do ligante o domínio intracelular se mantém associado à proteína silenciadora do domínio de morte (SODD, do inglês Silencer of Death Domain) (WATERS; POBER; BRADLEY, 2013).

Quando TNF- α se liga ao domínio extracelular do TNFR1 leva a uma mudança conformacional desse receptor, recrutando proteínas adaptadoras para ativar a via intracelular. A proteína SODD é liberada e a proteína DD associada ao TNFR1 (TRADD, do inglês Adaptador TNFR1 Associated Death Domain) é recrutada (CHAN et al., 2000; ENDRES et al., 2003). TRADD serve como plataforma para pelo menos três proteínas adaptadoras que ativam três vias de sinalização. O sinal apoptótico é iniciado quando TRADD recruta a proteína Fas associada ao domínio de morte (FADD, do inglês Fas Associated Death Domain) que por sua vez recruta a caspase 8 que se ativa por autoclivagem proteica. TRADD também recruta proteínas de interação com receptores (RIP1, do inglês Receptor Interacting Protein) e o fator 2 associado ao TNFR1 (TRAF2, do inglês TNF-R Associated Factor2). RIP1 é rapidamente modificada com cadeias de poliubiquitina não degradativa, estando TRAF2 (Fator 2 Associado ao TNFR), cIAP1 e 2 (Proteína Inibidora de Apoptose Celular) envolvidas no processo. A ubiquitinação de RIP1 é essencial para a inativação do complexo proteico IKB que induzirá a ativação de outro complexo proteico denominado NF-kB (Fator Nuclear-kappa B) (CABAL-HIERRO; LAZO, 2012).

O NF-kB é um fator de transcrição pertencente a uma família constituída por cinco membros: NF-kB1 (p105), NF-kB2 (p100), RelA, RelB e c-Rel que estão presentes nas células na forma de dímeros (homo ou heterodímeros) (HAYDEN; GHOSH, 2012). Os dímeros de NF-kB encontram-se inativos no citoplasma das células, não estimuladas ou em repouso, conjugadas com a proteína inibidora Ikb (RULAND; MAK, 2003).

O complexo quinase (IKK) é constituído por duas subunidades catalíticas IKK α e IKK β e uma subunidade regulatória IKK γ ou NEMO. O IKK é o elemento central da cascata de ativação do NF- κ B, uma vez que será responsável pela poliubiquitinação de RIP1, crucial para a inativação de I κ B. A ubiquitinação envolve ligação covalente de ubiquitina em resíduos de lisina de proteínas sendo regulada pela cascata de enzimas E1 (ubiquitina ativação), E2 (ubiquitina conjugação) e E3 (ubiquitina ligase). A ativação do NF- κ B em resposta a vários estímulos como citocinas inflamatórias, produtos virais ou bacterianos (ISRAËL, 2010) pode ser desencadeada pelas vias clássica ou alternativa. A cascata das duas vias converge para um ponto comum que é sua ativação. A sinalização é iniciada nos receptores presentes nos linfócitos B e T, bem como receptores de reconhecimento de padrão (ABBASI; FORSBERG; BISCHOF, 2015) sendo seguida por uma cascata de reações que leva à fosforilação das proteínas I κ B com posterior poliubiquitinação e processamento proteolítico pelo proteossoma. Como consequência, o complexo NF- κ B na sua forma livre é translocado para o núcleo da célula e ativa a transcrição de uma variedade de genes participantes nas respostas imunes inata e adaptativa, inflamação, adesão e sobrevivência celular, entre os quais está o gene codificador da proteína A20 (CATRYSSSE et al., 2014).

A expressão do gene TNFAIP3 é rapidamente induzida pelo TNF e a proteína A20 codificada por esse gene surge como um regulador negativo chave do complexo NF- κ B, com função anti-inflamatória e pró-apoptótica, equilibrando assim a transitoriedade da resposta inflamatória (GIORDANO et al., 2014a). A20 é uma enzima modificadora de ubiquitina tendo atividade de E3 ubiquitina ligase e desubiquitinase, está envolvida em respostas imunes e inflamatórias mediadas por citocinas. Essa função dupla está dividida entre o domínio N-terminal, que atua como uma proteína desubiquitinase, e o domínio C-terminal, que atua como enzima E3 ubiquitina ligase. A20 atua como inibidor do complexo NF- κ B removendo a poliubiquitinação (K63) de RIP1 e adicionando a ubiquitina K48 o que resulta em sua degradação no proteossomo (KELLY et al., 2013; WERTZ et al., 2004). Quando RIP1 é desubiquitinada por ação de A20, juntamente com RIP3 são recrutadas para um complexo contendo FADD e caspase 8 inativa. A caspase 8 é ativada clivando, em seguida, RIP1 e 3 que induz o processo apoptótico (BERTRAND et al., 2008; LI; YIN; WU, 2013; WANG; DU; WANG, 2008) (Figura 4).

Os mecanismos moleculares que levam A20 executar variadas funções, como morte celular ou bloquear o processo inflamatório pela inibição do complexo NF- κ B, ainda não foram

elucidados, mas acredita-se que estejam relacionados com processos dependente de ubiquitina (KELLY et al., 2013).

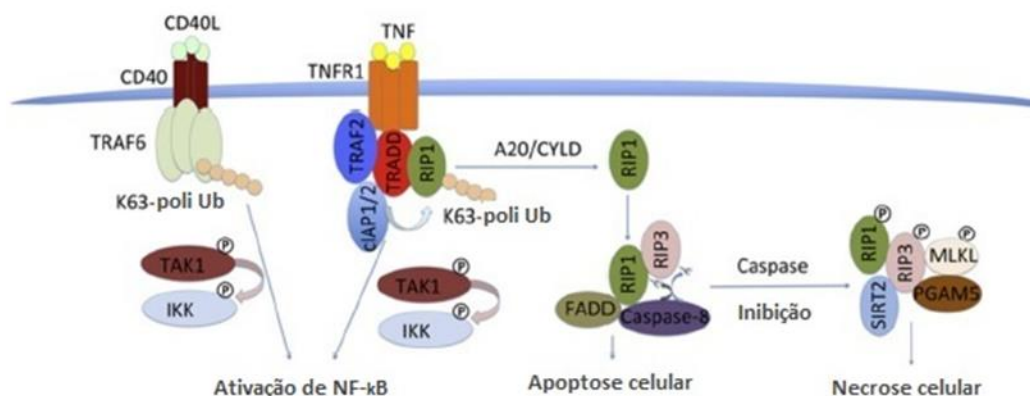


Figura 4. Vias de sinalização da superfamília de receptores de TNF- α com TNFR1. Fonte: Adaptada de LI et al, 2013.

Estudos de associação de genoma completo (GWAS, do inglês Genome-Wide Association Studies) tem sugerido a associação de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês Single Nucleotide Polymorphism) no gene codificador de A20 com a susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (MA; MALYNN, 2012). Outros trabalhos também têm mostrado que SNPs em genes codificadores de TNF- α e TNFR1 estão relacionados com aumento na incidência de câncer de mama na população chinesa (XU et al., 2014), severidade da Síndrome Periódica Associada ao TNFR, (RITTORE et al, 2014) e aumento do risco de tumores cervicais, sendo essas patologias onde se mantêm ativação crônica do sistema imune (ZIDI et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupo de estudo

Um total de 476 pacientes com idades entre 18 e 50 anos atendidos e tratados no Hospital Dia do IMIP, no período de novembro de 2013 a dezembro de 2014, tiveram amostras sanguíneas coletadas por punção venosa de acordo com o projeto intitulado "Fatores genéticos

humanos envolvidos no curso da infecção pelo HIV: Transmissão vertical, imunidade e resposta à terapia antirretroviral" previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e registrado sob o número 3629-13. Um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos que participaram deste estudo (Anexo A).

Os critérios de inclusão foram: indivíduos em uso regular do tratamento antirretroviral, no período mínimo de um ano, e que nesse período conseguissem baixar a carga viral à níveis indetectáveis (menos de 50 cópias/mL), definido como grupo de sucesso virológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2014), prontuário contendo dados clínicos e ausência de co-infecção por hepatite.

Posteriormente, os indivíduos que alcançaram o sucesso virológico após um ano de tratamento foram classificados em dois grupos:

I - Grupo Controle (Sucesso imunológico): Indivíduos com recuperação de $CD4^+ \geq 200$ células em relação ao baseline que é a contagem de $CD4^+$ determinada antes do início do tratamento

II - Grupo Caso (Falha imunológica): Indivíduos com recuperação de $CD4^+ < 200$ células em relação ao baseline.

Com base nos critérios de inclusão foram excluídos 363 indivíduos, o grupo Controle foi formado por 64 indivíduos, e o grupo Caso composto por 49 indivíduos, totalizando 113 indivíduos.

3.2 Extração do DNA genômico

Após a coleta por punção venosa de aproximadamente 5,0 ml de sangue por indivíduo, em tubos contendo o anticoagulante Etilenodiamino tetra-acético (EDTA), as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE) e o DNA genômico foi extraído a partir das células do sangue periférico. A extração do DNA genômico seguiu as instruções técnicas do protocolo para Mini Salting Out (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988) com modificações. Após quantificação do DNA, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C .

3.3 Seleção dos SNPs

Os polimorfismos foram selecionados após busca na literatura e em bancos de dados (1000 Genomes, Hap Map e Genome Browser). Foram selecionados SNPs com frequência do alelo minoritário (MAF) entre 5% e 95% nas populações caucasiana (CEU) e afrodescendente (YRI). Com a finalidade de prever os possíveis efeitos sobre a estrutura e função das proteínas dos SNPs selecionados, foram feitas buscas na literatura e PolyPhen-2 (Tabela 1).

Tabela1. Caracterização dos SNPs selecionados para o estudo.

Gene	Cromossomo	SNPs	Variação	Região Gênica	Tipo de variação	MAF
<i>TNFRSF1A</i>	12	rs 1800692	A/G	Intron- 4	Missence	0,307
<i>TNFRSF1A</i>	12	rs 767455	T/C	Éxon-1	Sinônima	0,485
<i>TNFAIP3</i>	6	rs 2270926	T/G	Éxon-2	Missence	0,124
<i>NFKBIA</i>	14	rs 8904	G/A	3'UTR	Regulatória	0,424
<i>TNF</i>	6	rs 1800629	G/A	Promotor	Regulatória	0,095

3.4 Genotipagem

A genotipagem dos SNPs foi realizada através de sondas alelo específicas fluorescentes (TaqMan®, Life), utilizando os seguintes ensaios: C_8921230_20 (rs1800692), C_2298465_20 (rs767455), C_7514879_10 (rs1800629), C_7701116_10 (rs2230926) e C_145670_10 (rs8904). Os ensaios foram preparados conforme recomendações do fabricante. As amostras foram corridas utilizando a plataforma para PCR em tempo real ABI-7500 (Life Technologies).

3.5 Análises Estatísticas

Após a genotipagem de ambos os grupos controle e caso, foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas, por contagem direta. Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as

possíveis associações foram utilizados, respectivamente, o Teste Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher utilizando o pacote SNPAssoc (GONZÁLEZ et al., 2007) disponível no programa R (<http://www.r-project.org>). Também utilizando as ferramentas do R, foram calculadas a Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança para 95% (IC95%). Em todas as análises, p-values < 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

O desequilíbrio de ligação e a formação de possíveis blocos haplotípicos e/ou combinação de alelos foram verificados através do programa Haploview versão 4.2 (BARRETT et al., 2005) e pelo SNPstats (SOLÉ et al., 2006).

Adicionalmente, foi calculado o poder do estudo por meio do programa G*power versão 3.1 (FAUL et al., 2007)

4 RESULTADOS

Todos os resultados obtidos no presente trabalho estão detalhados em forma de artigo (Apêndice A)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do processo apoptótico ser o principal mecanismo envolvido na depleção de LT CD4+, conduzindo a falha imunológica, a presença de SNPs em genes da via do TNF- α /TNFR1, estudados no presente trabalho, não se mostraram associados à resposta a TARV. Havendo assim, a necessidade de novos estudos com maior número de indivíduos e com a adição de novos genes da via e um maior número de SNPs, visando esclarecer o real papel dessas variações no processo de falha imunológica em indivíduos com uso regular de TARV.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; FORSBERG, K.; BISCHOF, F. The role of the ubiquitin-editing enzyme A20 in diseases of the central nervous system and other pathological processes. **Front Mol Neurosci**, v. 8, p. 21, 2015.
- AGHOKENG, A. F. et al. Extensive survey on the prevalence and genetic diversity of SIVs in primate bushmeat provides insights into risks for potential new cross-species transmissions. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 3, p. 386–96, 2010.
- APETREI, C. et al. Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus SIVsm in U.S. primate centers unravels the origin of SIVmac and SIVstm. **Journal of virology**, v. 79, n. 14, p. 8991–9005, 2005.
- ARRILDT, K. T.; JOSEPH, S. B.; SWANSTROM, R. The HIV-1 env protein: a coat of many colors. **Current HIV/AIDS reports**, v. 9, n. 1, p. 52–63, 2012.
- BAROUCH, D. H.; DEEKS, S. G. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. **Science (New York, N.Y.)**, v. 345, n. 6193, p. 169–74, 2014.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868–871, 1983.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, p. 263–265, 2005.
- BASMACIOGULLARI, S.; PIZZATO, M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, p. 1–12, 2014.
- BERTRAND, M. J. M. et al. cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination. **Molecular Cell**, v. 30, n. 6, p. 689–700, 2008.
- BORROW, P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 6, n. 5, p. 353–363, 2011.
- BRANSON, B. M.; MERMIN, J. Establishing the diagnosis of HIV infection: new tests and a new algorithm for the United States. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 52 Suppl 1, p. S3–4, 2011.
- BRENCHLEY, J. M. et al. CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 6, p. 749–59, 2004.

- BRIONES, M. S.; DOBARD, C. W.; CHOW, S. A. Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core. **Journal of virology**, v. 84, n. 10, p. 5181–90, 2010.
- BUCCIGROSSI, V. et al. The HIV-1 transactivator factor (Tat) induces enterocyte apoptosis through a redox-mediated mechanism. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29436, 2011.
- CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P. S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1297–1305, 2012.
- CATRYSSSE, L. et al. A20 in inflammation and autoimmunity. **Trends in immunology**, v. 35, n. 1, p. 22–31, 2014.
- CHAN, F. K. et al. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5475, p. 2351–2354, 2000.
- CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, v. 233, n. 4761, p. 343–346, 1986.
- COHEN, M. S. et al. Acute HIV-1 Infection. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 20, p. 1943–1954, 2011.
- CORNETT, J. K.; KIRN, T. J. Laboratory diagnosis of HIV in adults: a review of current methods. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 57, n. 5, p. 712–8, 2013.
- COURGNAUD, V.; MULLER-TRUTWIN, M.; SONIGO, P. [Evolution and virulence of primate lentiviruses]. **Med Sci (Paris)**, v. 20, n. 4, p. 448–452, 2004.
- COX, D. G.; CANZIAN, F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 8, p. 738–739, 2001.
- CRESSEY, T. R.; LALLEMANT, M. Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 333–342, 2007.
- CUMMINS, N. W.; BADLEY, A. D. Making sense of how HIV kills infected CD4 T cells: implications for HIV cure. **Molecular and Cellular Therapies**, v. 2, n. 20, p. 1–7, 2014.
- DANIEL, M. D. et al. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. **Science (New York, N.Y.)**, v. 228, n. 4704, p. 1201–4, 1985.
- DASKALAKIS, D. HIV diagnostic testing: evolving technology and testing strategies. **Topics in antiviral medicine**, v. 19, n. 1, p. 18–22, 2011.
- DE LEYS, R. et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. **Journal of virology**, v. 64, n. 3, p. 1207–16, 1990.
- DESVARIEUX, M. et al. Infection duration and inflammatory imbalance are associated with

atherosclerotic risk in HIV-infected never-smokers independent of antiretroviral therapy. **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 16, p. 2603–14, 2013.

DIEGUEZ-GONZALEZ, R. et al. Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor-kappaB and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 2, p. R42, 2009.

DIOP, G. et al. Genomic approach of AIDS pathogenesis: exhaustive genotyping of the TNFR1 gene in a French AIDS cohort. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 59, n. 8, p. 474–80, set. 2005.

DOUEK, D. C.; PICKER, L. J.; KOUP, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. **Annual review of immunology**, v. 21, p. 265–304, 2003.

DRONDA, F. et al. Long-term outcomes among antiretroviral-naïve human immunodeficiency virus-infected patients with small increases in CD4+ cell counts after successful virologic suppression. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 35, n. 8, p. 1005–9, out. 2002.

DUTERTRE, C. A. et al. Pivotal role of M-DC8+ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF α overproduction in response to microbial products. **Blood**, v. 120, n. 11, p. 2259–2268, 2012.

ENDRES, R. et al. Apparently Normal Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Signaling in the Absence of the Silencer of Death Domains. **Molecular And Cellular Biology**, v. 23, n. 18, p. 6609–6617, 2003.

FAUL, F. et al. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods**, v. 39, n. 2, p. 175–91, maio 2007.

FRIEDRICH, B. M. et al. Host factors mediating HIV-1 replication. **Virus Research**, v. 161, n. 2, p. 101–114, 2011.

FULTZ, P. N. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 14, p. 5286–90, 1986.

GERETTI, A. M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, p. 1–7, 2006.

GIORDANO, M. et al. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 111, n. 30, p. 11115–20, 2014a.

GIORDANO, M. et al. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 3, n. 30, p. 1–6, 2014b.

- GONZÁLEZ, J. R. et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 5, p. 644–5, mar. 2007.
- GONZALEZ, S. M.; ZAPATA, W.; RUGELES, M. T. Role of Regulatory T Cells and Inhibitory Molecules in the Development of Immune Exhaustion During Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **Viral immunology**, v. 29, n. 1, p. 2–10, 2016.
- GORRY, P. R.; ANCUTA, P. **Coreceptors and HIV-1 pathogenesis** **Current HIV/AIDS Reports**, 2011.
- GOUGEON, M. L. et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. **J Immunol**, v. 156, p. 3509–20., 1996.
- GOUGEON, M.-L.; LEDRU, É.; LECCEUR, H. Apoptose et sida. **Annales de l'Institut Pasteur / Actualités**, v. 11, n. 3, p. 49–61, jul. 2000.
- GRANDGENETT, D. P. et al. Multifunctional facets of retrovirus integrase. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 83–94, 2015.
- GURTLE, L. G. et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. **Journal of virology**, v. 68, n. 3, p. 1581–1585, 1994.
- HAHN, B. H. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5453, p. 607–14, 28 jan. 2000.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & development**, v. 26, n. 3, p. 203–34, 2012.
- HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 3, p. 182–92, 2012.
- HOLM, G. H.; GABUZDA, D. Distinct mechanisms of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. **J Virol**, v. 79, n. 10, p. 6299–6311, 2005.
- HU, D. J. et al. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 275, n. 3, p. 210–6, 1996.
- HUTCHINSON, J. F. THE BIOLOGY AND EVOLUTION OF HIV. **Annual Review of Anthropology**, v. 30, n. 1, p. 85–108, 28 out. 2001.
- IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277–288, 2002.
- ISRAËL, A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 3, p. a000158, 2010.
- JAKOBSEN, M. R. et al. Viral tropism, fitness and pathogenicity of HIV-1 subtype C. **Future Virology**, v. 5, n. 2, p. 219–231, 2010.

- KANKI, P. J. et al. Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. **Science**, v. 228, p. 1199–1201, 1985.
- KASER, A.; TILG, H. Inflammatory bowel diseases: highlights from the United European Gastroenterology Week 2008. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 13, n. 2, p. 259–263, 2009.
- KAUR, G. et al. **Genomic architecture of HIV-1 infection: Current status & challenges** **Indian Journal of Medical Research**, 2013.
- KELLY, C. et al. Expression of the nuclear factor- κ B inhibitor A20 is altered in the cystic fibrosis epithelium. **Eur Respir J**, v. 41, n. 6, p. 1315–1323, 2013.
- KHAITAN, A.; UNUTMAZ, D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. **Current HIV/AIDS reports**, v. 8, n. 1, p. 4–11, 2011.
- KOGAN, M.; RAPPAPORT, J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. **Retrovirology**, v. 8, p. 25, 2011.
- KORBER, B. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5472, p. 1789–1796, 2000.
- KREBS, S. J.; ANANWORANICH, J. Immune activation during acute HIV infection and the impact of early antiretroviral therapy. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 10, p. 1–10, 2015.
- KUMAR, V. et al. **Fundamentos de Robbins & Cotran - Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. [s.l: s.n.]. v. 41, 2010.
- LE MOING, V. et al. Long-term evolution of CD4 count in patients with a plasma HIV RNA persistently <500 copies/mL during treatment with antiretroviral drugs. **HIV Med**, v. 8, n. 3, p. 156–163, 2007.
- LI, J.; YIN, Q.; WU, H. **Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily**. [s.l: s.n.]. v. 119
- LYLES, R. H. et al. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 3, p. 872–880, 2000.
- MA, A.; MALYNN, B. A. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 11, p. 774–785, 2012.
- MAKVANDI-NEJAD, S.; ROWLAND-JONES, S. How does the humoral response to HIV-2 infection differ from HIV-1 and can this explain the distinct natural history of infection with these two human retroviruses? **Immunology letters**, v. 163, n. 1, p. 69–75, 2015.
- MARCHETTI, G. et al. Immune reconstitution in HIV+ subjects on lopinavir/ritonavir-based HAART according to the severity of pre-therapy CD4+. **Curr HIV Res**, v. 10, p. 597–605, 2012.

- MASCIOTRA, S. et al. Evaluation of an alternative HIV diagnostic algorithm using specimens from seroconversion panels and persons with established HIV infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 52, n. SUPPL. 1, p. S17–S22, 2011.
- MATTAPALLIL, J. J. et al. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1093–1097, 2005.
- MAUCLÈRE, P. et al. Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. **AIDS (London, England)**, v. 11, n. 4, p. 445–53, 1997.
- MBITA, Z.; HULL, R.; DLAMINI, Z. Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)-Mediated Apoptosis: New Therapeutic Targets. **Viruses**, v. 6, p. 3181–3227, 2014.
- 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, 1988.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em crianças e adolescentes** Ministério da Saúde/Brasil. Brasília: [s.n.]. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/55939/08_05_2014_protocolo_pediatico_pdf_36225.pdf.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Boletim Epidemiológico HIV-AIDS**. [s.l.: s.n.].
- MOIR, S.; CHUN, T.-W.; FAUCI, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 223–248, 2011.
- MOIR, S.; FAUCI, A. S. B cells in HIV infection and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 4, p. 235–45, 2009.
- MOYO, S. et al. Identifying Recent HIV Infections: From Serological Assays to Genomics. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5508–5524, 2015.
- MURPHY, G.; AITKEN, C. HIV testing-The perspective from across the pond. **Journal of Clinical Virology**, v. 52, n. SUPPL. 1, p. S71–S76, 2011.
- NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, p. 367–401, 2001.
- OWEN, S. M. et al. Alternative algorithms for human immunodeficiency virus infection diagnosis using tests that are licensed in the United States. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1588–95, 2008.
- OWEN, S. M. Testing for acute HIV infection: implications for treatment as prevention. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 2, p. 125–30, 2012.
- PAIARDINI, M.; MÜLLER-TRUTWIN, M. HIV-associated chronic immune activation. **Immunological Reviews**, v. 254, n. 1, p. 78–101, 2013.
- PEETERS, M. et al. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. **AIDS**

(London, England), v. 11, n. 4, p. 493–498, 1997.

PEETERS, M.; D'ARC, M.; DELAPORTE, E. Origin and diversity of human retroviruses. **AIDS Reviews**, v. 16, n. 1, p. 23–34, 2014.

PICKER, L. J. et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 10, p. 1299–314, 2004.

PITRAK, D. L. et al. Apoptosis Pathways in HIV-1-Infected Patients Before and After Highly Active Antiretroviral Therapy: Relevance to Immune Recovery. **AIDS research and human retroviruses**, v. 30, n. 00, p. 1–9, 11 nov. 2014.

PLANTIER, J.-C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature medicine**, v. 15, p. 871–872, 2009.

RAJASURIAR, R. et al. Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work? **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 8, p. 1199–208, 2013.

REEVES, J. D.; DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1253–1265, 2002.

REEVES, R. K. et al. CD16- natural killer cells: Enrichment in mucosal and secondary lymphoid tissues and altered function during chronic SIV infection. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4439–4446, 2010.

RIBEIRO, R. M. et al. In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15572–15577, 2002.

RULAND, J.; MAK, T. W. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. **Immunological reviews**, v. 193, p. 93–100, 2003.

SAIDAKOVA, E. V et al. T cell apoptosis in HIV-infected patients with incomplete immune recovery after antiretroviral therapy. **Doklady biological sciences : proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections / translated from Russian**, v. 450, n. 1, p. 189–91, 2013.

SAUCE, D.; ELBIM, C.; APPAY, V. Monitoring cellular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 8, n. 2, p. 125–31, 2013.

SENNIKOV, S. V et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 745909, 2014.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a006841, 2011.

SHAW, J. M. et al. Increased Frequency of Regulatory T Cells Accompanies Increased

- Immune Activation in Rectal Mucosae of HIV-Positive Noncontrollers. **Journal of Virology**, v. 85, n. 21, p. 11422–11434, 2011.
- SIMON, F. et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature medicine**, v. 4, n. 9, p. 1032–1037, 1998.
- SOLÉ, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 15, p. 1928–9, 1 ago. 2006.
- TANG, M. W.; SHAFER, R. W. HIV-1 antiretroviral resistance: Scientific principles and clinical applications. **Drugs**, v. 72, n. 9, p. 1–25, 2012.
- UNAIDS. **AIDS by the numbers 2015**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://search.unaids.org>>.
- UNAIDS. **GLOBAL AIDS RESPONSE PROGRESS REPORTING 2015**. [s.l: s.n.].
- VALLARI, A. et al. Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. **AIDS research and human retroviruses**, v. 26, n. 1, p. 109–115, 2010.
- VALLARI, A. et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. **Journal of virology**, v. 85, n. 3, p. 1403–1407, 2011.
- WAHEED, A. A.; FREED, E. O. HIV Type 1 Gag as a Target for Antiviral Therapy. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 1, p. 54–75, 2012.
- WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. **The FEBS journal**, v. 278, n. 6, p. 862–76, 2011.
- WANG, L.; DU, F.; WANG, X. TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 693–703, 2008.
- WANG, X. et al. HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4⁺ T cells. **Cellular signalling**, v. 24, n. 7, p. 1414–9, 2012.
- WATERS, J. P.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Tumour necrosis factor in infectious disease. **The Journal of pathology**, v. 230, n. 2, p. 132–47, 2013.
- WERTZ, I. E. et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 694–699, 2004.
- WIERCIŃSKA-DRAPALO, A. et al. Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. **Viral immunology**, v. 17, n. 1, p. 109–113, 2004.
- WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell Binding and Entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a006866–a006866, 2012.
- WOROBAY, M. et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 661–664, 2008.
- XU, F. et al. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. **PloS one**, v. 9, n. 7, p.

e101138, 2014.

ZIDI, S. et al. Involvement of Toll-like receptors in cervical cancer susceptibility among Tunisian women. **Bull Cancer**, v. 101, n. 10, p. e31–5, 2014.

APÊNDICE A

Polimorfismos de base única em genes da via TNF- α /TNFR1 e a resposta ao tratamento antirretroviral na infecção pelo vírus HIV-1

Maria Leonilda Gondim Silva^{a,b}, Ronaldo Celerino da Silva^b, Antonio Victor Campos Coelho^{b,c}, Paulo Sérgio Ramos de Araújo^d, Neyla Maria Pereira Alves^b, Lucas André Cavalcanti Brandão^{a,b*}

^aDepartamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^cDepartamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^dHospital das Clínicas (HC-UFPE), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

***Autor Correspondente:**

Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Departamento de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária. CEP: 50670-901. Recife, Pernambuco, Brasil. Telefone: +55 8121268484 e fax: +55 8121268485.

E-mail: lucabrand@gmail.com

Resumo

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana 1 (HIV-1) tem como característica clássica a depleção de linfócitos T (LT) CD4⁺, que quando não tratada culmina na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Com o advento da Terapia Antirretroviral (TARV), observou-se uma verdadeira revolução. A TARV, apesar de não eliminar o vírus, consegue manter a carga viral em níveis indetectáveis, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos infectados. No entanto, 15-30% dos indivíduos em uso regular de TARV e com carga viral indetectável não conseguem recuperar os níveis de LT CD4⁺ (Recuperação Imunológica).

Estudos apontam que a apoptose está envolvida na depleção dos LT CD4⁺ e que variações genéticas como polimorfismos de base única (SNPs) em moléculas envolvidas nas vias da apoptose podem levar a diferentes respostas imunológicas do indivíduo à infecção. Neste sentido, o presente estudo se objetiva em investigar o papel de SNPs (rs1800692, rs767455, rs2270926, rs8904, rs1800629) em genes codificadores de proteínas que ativam a via extrínseca da apoptose, através do TNF- α /TNFR1, e sua relação com a recuperação imunológica de pacientes com uso regular de TARV. Foram estudados 113 pacientes HIV positivos, atendidos e tratados no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), em uso de TARV por um ano e com carga viral indetectável, os quais foram divididos em dois grupos: sucesso imunológico (controle) e falha imunológica (caso). Não foram observadas associações entre os polimorfismos dos genes estudados com o sucesso ou a falha imunológica apresentada pelos indivíduos fazendo uso regular da TARV. Também não foi observada nenhuma associação entre a falha com as variáveis clínicas: peso, etnia, idade, gênero e esquema terapêutico. Apesar da ausência de associações dos SNPs estudados com a falha imunológica, alguns fatores limitantes do estudo devem ser considerados (pequeno número amostral, não inclusão de outras moléculas da via estudada), havendo necessidade de novos estudos de réplica em outras populações.

Palavras-chave: Apoptose, SNPs, TNF- α /TNFR1, HIV, TARV.

Introdução

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) infecta majoritariamente linfócitos T CD4⁺ do hospedeiro (WILEN; TILTON; DOMS, 2012), levando a uma profunda depleção deste tipo celular, resultando no surgimento de doenças definidoras da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (PAIARDINI; MÜLLER-TRUTWIN, 2013). Indivíduos infectados apresentam ativação imune crônica e um padrão inflamatório desde a fase aguda da infecção. A ativação imune crônica, juntamente com a perda continuada dos linfócitos T CD4⁺ leva o indivíduo ao estado de exaustão imune, incapacitando as células do sistema imune em responder de forma eficiente a infecção pelo HIV e outros patógenos. Assim, a contagem de LT CD4⁺ é tida como um determinante para progressão da doença (GONZALEZ; ZAPATA; RUGELES, 2016).

Com o advento da Terapia Antirretroviral (TARV), na década de 80, foi observado um grande avanço na luta contra a infecção. Mesmo não eliminando o vírus, a TARV, após uso regular por três meses, reduz significativamente a carga viral a níveis indetectáveis e incrementa os níveis de LT CD4+. Cerca de 80% dos indivíduos conseguem alcançar o sucesso virológico (carga viral plasmática inferior a 50 cópias/mL). No entanto existe um grupo de indivíduos que não consegue recuperar os níveis de LT CD4+, mesmo apresentando carga viral indetectável. Esses pacientes são conhecidos como pacientes em falha imunológica (COHEN et al., 2011).

Um dos mecanismos envolvidos na morte das células T durante a infecção pelo HIV-1 é a apoptose, a qual afeta não só as células infectadas, mais também células T adjacentes não infectadas, conduzindo à depleção de células T. A morte celular por apoptose desencadeia uma série de estímulos como: superexpressão de ligantes de morte (FasL, TNF) e citotoxicidade de proteínas solúveis virais (gp120, tat, nef, e vpr) (WANG et al., 2012). Diversas moléculas são tidas chaves para os mecanismos apoptóticos, dentre as quais se pode destacar as moléculas envolvidas na via do TNF- α /TNFR1.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida em diversas respostas biológicas incluindo inflamação e apoptose, através da ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) (KASER; TILG, 2009). Indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma produção aumentada dessa citocina (DUTERTRE et al., 2012). Na fase aguda da infecção pelo HIV, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , é benéfica. Por outro lado, na fase crônica, a liberação continuada pode contribuir para ativação imune aberrante, induzindo apoptose celular (WAJANT; SCHEURICH, 2011). Altos níveis de TNF- α séricos têm sido correlacionados com a progressão da infecção para AIDS. A normalização dos níveis de TNF- α séricos só é alcançada em indivíduos com uso regular de TARV com sucesso virológico (carga viral indetectável) e imunológico (MOIR; CHUN; FAUCI, 2011).

O sinal de apoptose é desencadeado pela ligação do TNF- α ao TNFR1, o qual promove o recrutamento de moléculas adaptadoras que podem conduzir a célula por dois caminhos: a inflamação ou apoptose. Recrutamento de moléculas com domínio de morte, como FADD, permite a autoclivagem e a ativação da caspase 8, emitindo sinal apoptótico. Por outro lado, se moléculas adaptadoras, como RIP1 e TRAF2, são recrutadas, ocorre a ativação do complexo NF- κ B, que ativa o gene codificante da proteína A20 (CABAL-HIERRO; LAZO, 2012; CATRYSSE et al., 2014; HAYDEN; GHOSH, 2012). A proteína A20, por sua vez, regula

negativamente o complexo NF- κ B, induzindo uma resposta anti-inflamatória e pró-apoptótica, equilibrando a transitoriedade da resposta inflamatória (GIORDANO et al., 2014b).

Estudos têm mostrado que SNPs em genes codificadores de proteínas da via TNF- α /TNFR1 tem sido relacionados com a indução de apoptose. Diante do exposto, hipotetiza-se que o fato de alguns pacientes em uso regular de TARV e com carga viral indetectável, não conseguirem alcançar o sucesso imunológico pode estar relacionado com níveis exacerbados de apoptose, em decorrência de SNPs em genes codificadores de moléculas envolvidas na via extrínseca da apoptose desencadeada pelo TNF- α /TNFR1. Neste sentido, o presente estudo se propôs a investigar o papel de SNPs (rs1800692, rs767455, rs2270926, rs8904, rs1800629) em genes codificadores de proteínas da via TNF- α /TNFR1, e sua relação com a recuperação imunológica de pacientes com uso regular de TARV.

Material e Métodos

Grupo Amostral

O grupo amostral foi formado por 479 indivíduos de ambos os sexos, com faixa etária de 18 a 50 anos, oriundos das cidades da região metropolitana do Recife e cidades do interior, atendidos e tratados no Hospital dia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

O recrutamento dos pacientes se deu no período de novembro de 2013 a dezembro de 2014. Os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP, registrado sob o número 3629-13.

Os critérios de inclusão definidos foram: indivíduos em uso regular de TARV em período mínimo de um ano e com carga viral indetectável (< 50 cópias/mL) no mesmo período (pacientes em sucesso terapêutico); disponibilidade dos dados clínicos nos prontuários e ausência de coinfeções. Após aplicação dos critérios de inclusão, 363 indivíduos foram excluídos do estudo.

O grupo de estudo foi formado por 113 indivíduos em sucesso terapêutico, os quais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (Sucesso Imunológico) indivíduos com recuperação de CD4 $^{+} \geq 200$ células em relação ao baseline (contagem de CD4 $^{+}$ pré-tratamento); e Grupo Caso (Falha Imunológica) - indivíduos com recuperação de CD4 $^{+} < 200$

células em relação ao baseline. Os grupos Controle e Caso foram compostos por 64 e 49 indivíduos, respectivamente.

Extração do DNA Genômico

O DNA Genômico foi extraído de sangue total, pelo protocolo para Mini Salting Out (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988), com algumas modificações.

Seleção dos Polimorfismos e genotipagem

Após busca na literatura e em bancos de dados (1000 Genomes, Hap Map e Genome Browser) foram selecionados cinco SNPs: rs1800692 (intron-4 do gene *TNFRSF1A*), rs767455 (exon-1 do gene *TNFRSF1A*), rs2270926 (exon-2 do gene *TNFAIP3*), rs8904 (3'UTR do gene *NFKBIA*), rs1800629 (região promotora do gene *TNF*).

Sondas alelos específicas fluorescentes (TaqMan®, Life) disponível comercialmente foram utilizadas para realização da genotipagem: C__8921230_20 (rs1800692), C__2298465_20 (rs767455), C__7514879_10 (rs1800629), C__145670_10 (rs8904) e C__8921230 (rs1800692). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante e amplificadas por PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System).

Análises Estatísticas

Foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas, por contagem direta, usando a ferramenta Genotype transposer (COX; CANZIAN, 2001). Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as possíveis associações foram utilizados, respectivamente, o Teste Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher utilizando o pacote SNPassoc (GONZÁLEZ et al., 2007) disponível no programa R (<http://www.r-project.org>). Também utilizando as ferramentas do R, foram calculadas a Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança para 95% (IC95%). Em todas as análises, p-values < 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

O desequilíbrio de ligação e a formação de possíveis blocos haplotípicos e/ou combinação de alelos foram verificados através do programa Haploview versão 4.2 (BARRETT et al., 2005) e pelo SNPstats (SOLÉ et al., 2006).

Adicionalmente, foi calculado o poder do estudo por meio do programa G*power versão 3.1 (FAUL et al., 2007).

Resultados

No presente estudo, foram analisados 113 indivíduos, dos quais 64 apresentaram sucesso imunológico e 49 apresentaram falha imunológica. Na Tabela 1, encontram-se uma caracterização clínica-epidemiológica dos indivíduos. A comparação entre os dois grupos quanto as variáveis (peso, idade, gênero, etnia, esquema terapêutico, carga viral baseline e contagem de CD4+ baseline), não apresentou diferenças significativas (p-value > 0.05).

Foram analisados também a distribuição alélica e genotípica dos 5 SNPs presentes nos genes *TNFRSF1A*, *TNFAIP3*, *NFKBIA* e *TNF*, envolvidos na via apoptótica do TFN- α /TNFR1. A distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estão apresentados na Tabela 2. As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados se encontram em conformidade com os princípios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto no grupo com sucesso imunológico, quanto no grupo em falha imunológica, com exceção do SNPs rs1800692, o qual não foi condizente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, entre os indivíduos com sucesso imunológico.

Nenhum dos SNPs da via apoptótica TFN- α /TNFR1 analisados no presente estudo, apresentou diferenças significativas na comparação entre indivíduos em sucesso imunológico e falha imunológica (p-value > 0.05) (Tabela 2), mesmo após correções pelas variáveis clínicas epidemiológicas (Tabela 1).

Visto que os SNPs rs1800692 e rs767455 são pertencentes ao gene *TNFRSF1A*, localizado no cromossomo 12, foi realizado a análise de haplótipos. Os dois SNPs apresentaram um valor de $D' = 0.40$, indicando a ausência de desequilíbrio de ligação entre tais SNPs. Mesmo sem a formação de haplótipos, foi realizada a análise da combinação alélica entre os dois SNPs, sendo encontradas combinações possíveis (Tabela 3), no entanto, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados (p-value > 0.05).

Apesar da ausência de associação dos SNPs com o sucesso e/ou falha imunológica, o envolvimento de tais variações neste estudo clínico não pode ser descartado, visto que o poder

do estudo, calculado pelo G*power, foi para cada SNP: 0,53 (rs1800692); 0,53 (rs767455); 0,58 (rs2270926); 0,54 (rs8904) e 0,49 (rs1800629).

Discussão

Sabendo-se que a recuperação dos LT CD4⁺ é fator determinante na evolução da infecção pelo HIV (LE MOING et al., 2007), alguns estudos têm procurado elucidar os mecanismos que levam cerca de 15-20% dos pacientes, em uso regular de TARV, não conseguir atingir tal recuperação, definida como sucesso imunológico, mesmo conseguindo a redução da carga viral a níveis indetectáveis (sucesso virológico). Essa resposta imune discordante, definida como falha imunológica é acompanhada de pior prognóstico, e rápida evolução clínica da infecção (DRONDA et al., 2002).

A falha imunológica tem sido atribuída à ativação imune crônica desencadeada pela perda da integridade da mucosa do trato intestinal, com translocação de produtos microbianos para o sistema circulatório resultando em profunda depleção de células T CD4⁺ (BRENCHLEY et al., 2004; HOLM; GABUZDA, 2005). A eficácia da TARV está associada com a diminuição da replicação viral e com a redução da estimulação do sistema imune (RAJASURIAR et al., 2013).

No presente trabalho, partindo de um grupo amostral de 479 portadores do HIV em TARV, conseguimos classificar e caracterizar (clínico-epidemiologicamente) 64 indivíduos em sucesso imunológico e 49 em falha imunológica (Tabela 1), nos quais foram estudados 5 SNPs em genes envolvidos na via apoptótica do TFN- α /TNFR1.

A literatura relata que a apoptose persistente dos LT CD4⁺ é evidenciada, comumente, em não respondedores imunes sob TARV, mesmo diante do sucesso virológico, sendo esse o mecanismo maior envolvido nessa perda celular (PITRAK et al., 2014). Alguns trabalhos (MARCHETTI et al., 2012; PITRAK et al., 2014) tem buscado relacionar recuperação imunológica, apoptose e esquema terapêutico; chegando as seguintes considerações: o esquema terapêutico (MARCHETTI et al., 2012; PITRAK et al., 2014) e a ativação de caspases desencadeadoras e efetoras da apoptose têm pouca influência na recuperação de T CD4⁺ (PITRAK et al., 2014). Por outro lado, SAIDAKOVA et al. (2013) demonstraram que pacientes em uso regular de TARV que não alcançavam a recuperação imunológica, mesmo com sucesso virológico, apresentavam diminuição da contagem global de leucócitos, com diminuição de LT CD4⁺ e LT CD8⁺ e aumento de apoptose em LT CD4⁺.

Neste sentido, foi analisado, em nosso estudo, a relação entre variações em genes relacionados a uma das vias desencadeadoras da apoptose (TNF- α /TNFR1) e a recuperação imunológica, no entanto, não obtivemos diferenças significativas entre indivíduos em sucesso imunológico e em falha imunológica, quanto às distribuições alélicas, genotípicas e haplotípicas (Tabela 2), mesmo após correção pelas variáveis clínico-epidemiológico.

O envolvimento de variações nos genes da via TNF- α /TNFR1 da apoptose no sucesso e/ou falha imunológica, não pode ser descartado, visto que nosso número amostral foi baixo, conferindo um baixo poder ao estudo ($G^*power < 0.58$). O baixo número amostral se deve, entre outros fatores, a baixa adesão ao TARV, o que dificulta bastante a classificação quanto ao sucesso virológico, e por consequência, quanto ao sucesso/falha imunológico.

Conclusão

Apesar de não terem sido encontradas associações entre SNPs estudados em moléculas envolvidas da via apoptótica desencadeada pela ligação do TNF- α ao receptor TNFR1 e a falha imunológica em nossa população, novos estudos, com maior número de indivíduos e com um maior número de SNPs, precisam ser realizados com o intuito de desvendar o real papel de SNPs nestes genes no aumento de apoptose em indivíduos soropositivos para HIV-1. Fatores limitantes do estudo devem ser considerados no desfecho do resultado, como o número de indivíduos estudados e a não inclusão de outras moléculas envolvidas na via estudada.

Referências

- BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, p. 263–265, 2005.
- BRENCHLEY, J. M. et al. CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 6, p. 749–59, 2004.
- CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P. S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1297–1305, 2012.
- CATRYSSSE, L. et al. A20 in inflammation and autoimmunity. **Trends in immunology**, v. 35, n. 1, p. 22–31, 2014.
- COHEN, M. S. et al. Acute HIV-1 Infection. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 20, p. 1943–1954, 2011.

- COX, D. G.; CANZIAN, F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 8, p. 738–739, 2001.
- DIOP, G. et al. Genomic approach of AIDS pathogenesis: exhaustive genotyping of the TNFR1 gene in a French AIDS cohort. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 59, n. 8, p. 474–80, set. 2005.
- DRONDA, F. et al. Long-term outcomes among antiretroviral-naïve human immunodeficiency virus-infected patients with small increases in CD4+ cell counts after successful virologic suppression. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 35, n. 8, p. 1005–9, out. 2002.
- DUTERTRE, C. A. et al. Pivotal role of M-DC8+ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF α overproduction in response to microbial products. **Blood**, v. 120, n. 11, p. 2259–2268, 2012.
- FAUL, F. et al. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods**, v. 39, n. 2, p. 175–91, maio 2007.
- GIORDANO, M. et al. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 3, n. 30, p. 1–6, 2014b.
- GONZÁLEZ, J. R. et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 5, p. 644–5, mar. 2007.
- GONZALEZ, S. M.; ZAPATA, W.; RUGELES, M. T. Role of Regulatory T Cells and Inhibitory Molecules in the Development of Immune Exhaustion During Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **Viral immunology**, v. 29, n. 1, p. 2–10, 2016.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & development**, v. 26, n. 3, p. 203–34, 2012.
- HOLM, G. H.; GABUZDA, D. Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. **J Virol**, v. 79, n. 10, p. 6299–6311, 2005.
- KASER, A.; TILG, H. Inflammatory bowel diseases: highlights from the United European Gastroenterology Week 2008. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 13, n. 2, p. 259–263, 2009.
- LE MOING, V. et al. Long-term evolution of CD4 count in patients with a plasma HIV RNA persistently <500 copies/mL during treatment with antiretroviral drugs. **HIV Med**, v. 8, n. 3, p. 156–163, 2007.

- MARCHETTI, G. et al. Immune reconstitution in HIV+ subjects on lopinavir/ritonavir-based HAART according to the severity of pre-therapy CD4+. **Curr HIV Res**, v. 10, p. 597–605, 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, 1988.
- MOIR, S.; CHUN, T.-W.; FAUCI, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 223–248, 2011.
- PAIARDINI, M.; MÜLLER-TRUTWIN, M. HIV-associated chronic immune activation. **Immunological Reviews**, v. 254, n. 1, p. 78–101, 2013.
- PITRAK, D. L. et al. Apoptosis Pathways in HIV-1-Infected Patients Before and After Highly Active Antiretroviral Therapy: Relevance to Immune Recovery. **AIDS research and human retroviruses**, v. 30, n. 00, p. 1–9, 11 nov. 2014.
- RAJASURIAR, R. et al. Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work? **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 8, p. 1199–208, 2013.
- SAIDAKOVA, E. V et al. T cell apoptosis in HIV-infected patients with incomplete immune recovery after antiretroviral therapy. **Doklady biological sciences : proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections / translated from Russian**, v. 450, n. 1, p. 189–91, 2013.
- SOLÉ, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 15, p. 1928–9, 1 ago. 2006.
- WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. **The FEBS journal**, v. 278, n. 6, p. 862–76, 2011.
- WANG, X. et al. HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4+ T cells. **Cellular signalling**, v. 24, n. 7, p. 1414–9, 2012.
- WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell Binding and Entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a006866–a006866, 2012.

Tabelas

Table 1. Clinical and Epidemiological characteristics of the study population

Characteristics	Immunological Success	Immunological failure
Patients (n)	64	49
Gender	n(%)	n(%)
Female	41 (64.1%)	31 (63.3%)
Male	23 (35.9%)	18 (36.7%)
Skin Color	n(%)	n(%)
White	14 (21.9%)	11 (22.4%)
Black	24 (37.5%)	11 (22.4%)
Brown	26 (40.6%)	27 (55.2%)
Clinical	Average (Higher-Lower)	Average (Higher-Lower)
Age (years)	39.6 (20.0-62.0)	40.1 (26.0-69.0)
Weight (kg)	65.0 (33.0-110.0)	60.9 (41.0-102.0)
Viral load Baseline (Log ₁₀ /mL)	4.359 (1.000-5.875)	4.251 (1.000-5.825)
CD4+ T Cells Count Baseline (Cells/mm ³)	246.9 (26.0-747.0)	260.0 (12.0-888.0)
Treatment	n(%)	n(%)
AZT + ddi + NFV	1 (1.6%)	0 (0.0%)
AZT + 3TC + ATV/r	9 (14.1%)	3 (6.1%)
AZT + 3TC + ddi	1 (1.6%)	0 (0.0%)
AZT + 3TC + EFZ	24 (37.5%)	24 (49.0%)
AZT + 3TC + LPV/r	20 (31.2%)	9 (18.4%)
AZT + 3TC + NVP	4 (6.2%)	3 (6.1%)
AZT + 3TC + FPV/r	0 (0.0%)	1 (2.0%)
TDF + 3TC + EFZ	1 (1.6%)	4 (8.2%)
TDF + 3TC + LPV/r	2 (3.1%)	2 (4.1%)
TDF + 3TC + ATV/r	1 (1.6%)	1 (2.0%)
Others	1 (1.6%)	2 (4.1%)

Table 2. Allelic and genotypes frequencies of SNPs *TNFA/TNFR1* pathway genes in HIV-1 patients of Pernambuco.

Gene/SNPs	Immunological		Fisher's Exact Test		
	Success n(%)	Failure n(%)	OR	IC95%	p-value
<i>TNFR1SF1A – rs1800692</i>					
A	94 (0.75)	72 (0.73)		Reference	
G	32 (0.25)	26 (0.27)	1.06	0.55-2.02	0.879
AA	31 (0.49)	24 (0.49)		Reference	
AG	32 (0.51)	24 (0.49)	0.97	0.43-2.20	1.000
GG	0 (0.0)	1 (0.02)	nc	nc	0.446
Dominant (AA vs AG+GG)			1.01	0.45-2.28	1.000
Recessive (AA+AG vs GG)			nc	nc	0.437
Overdominant (AA+GG vs AG)			1.00	0.41-2.10	1.000
<i>TNFRSF1A – rs767455</i>					
T	89 (0.70)	66 (0.67)		Reference	

C	39 (0.30)	32 (0.33)	1.10	0.60-2.02	0.773
TT	33 (0.52)	25 (0.51)		Reference	
TC	23 (0.36)	16 (0.33)	0.92	0.37-2.26	1.000
CC	8 (0.12)	8 (0.16)	1.31	0.37-4.65	0.777
Dominant (CC vs TC+TT)			1.02	0.45-2.30	1.000
Recessive (CC+TC vs TT)			1.36	0.41-4.55	0.595
Overdominant (CC+TT vs CT)			0.86	0.36-2.03	0.842
TNFAIP3 – rs2270926					
T	103 (0.8)	84 (0.86)		Reference	
G	25 (0.2)	14 (0.14)	0.69	0.31-1.48	0.375
TT	41 (0.64)	37 (0.76)		Reference	
GT	21 (0.33)	10 (0.20)	0.53	0.20-1.36	0.199
GG	2 (0.03)	2 (0.04)	1.11	0.08-15.97	1.000
Dominant (TT vs GT+GG)			0.58	0.23-1.43	0.221
Recessive (TT+GT vs GG)			1.31	0.09-18.8	1.000
Overdominant (TT+GG vs GT)			0.53	0.20-1.34	0.203
NFKBIA – rs8904					
G	66 (0.52)	47 (0.51)		Reference	
A	60 (0.48)	45 (0.49)	1.05	0.59-1.87	0.891
GG	16 (0.25)	13 (0.28)		Reference	
AG	34 (0.54)	21 (0.46)	0.76	0.28-2.10	0.642
AA	13 (0.21)	13 (0.28)	1.22	0.37-4.05	0.790
Dominant (GG vs AG+AA)			0.86	0.34-2.24	0.827
Recessive (GG+AG vs AA)			1.35	0.49-3.66	0.645
Overdominant (GG+AA vs AG)			0.72	0.31-1.64	0.441
TNF – rs1800629*					
G	113 (0.88)	93 (0.95)		Reference	
A	15 (0.12)	5 (0.05)	0.41	0.11-1.23	0.100
GG	51 (0.80)	44 (0.90)		Reference	
AG	11 (0.17)	5 (0.10)	0.53	0.13-1.81	0.291
AA	2 (0.03)	0 (0.00)	nc	nc	0.499
Dominant (GG vs AG+AA)			0.45	0.12-1.47	0.196
Recessive (GG+AG vs AA)			nc	nc	0.504
Overdominant (GG+AA vs AG)			0.55	0.14-1.88	0.415

nc = not calculated

Table 3. Allelic combination frequencies of SNPs in *TNFR1* genes in HIV-1 patients of Pernambuco.

Allelic Combination		Immunological		Fisher's Exact Test		
rs1800692	rs767455	Success n (%)	Failure n (%)	OR	95%CI	p-value
A	T	62 (49.2)	45 (45.9)		Reference	
A	C	31 (24.6)	27 (27.5)	1.20	0.60-2.40	0.623
G	T	25 (19.8)	21 (21.4)	1.56	0.54-2.45	0.724
G	C	8 (6.3)	5 (5.1)	0.86	0.21-3.22	1.000

ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

COD	DATA
	PRONTUÁRIO

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

Comitê de Ética em Pesquisa

Antonio Victor Campos Coelho Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, Recife, PE. Local de trabalho:
Laboratório de Imunopatologia Diretoria de Pesquisa, Prédio Orlando Onofre, 1º

Keizo Asami (LIKA)

Andar.

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária,

Recife, PE. CEP: 50670-901. Telefone: 2101-2542 Funcionamento: 2ª a 6ª feira, 7h às 11h30/13h30
antonio.victor@ufpe.br às 16h.

Telefone: 2122-4756

Médico supervisor da pesquisa

comitedeetica@imip.org.br

Luiz Cláudio Arraes de Alencar (IMIP) lularraes@hotmail.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Anexo B – Formulário A1 – Recrutamento: Coleta de Dados Clínicos

COD	DATA
	PRONTUÁRIO

FORMULÁRIO A1 – RECRUTAMENTO: COLETA DE DADOS CLÍNICOS**1. Dados pessoais (apenas para identificação, NÃO serão divulgados)**

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

2. Informações clínicas e epidemiológicas

Etnia (segundo classificação do IBGE)		Escolaridade (anos)	Renda mensal (reais)
() Branca	() Indígena		
() Negra	() Amarela		
() Parda	() Ignorado		
Peso (kg)		Altura (m)	
Fumo		Etilismo	
SIM ()		SIM ()	
Se SIM, quantos cigarros por dia? _____		Se SIM, quantas un. por semana? _____	
NÃO ()		NÃO ()	
Se NÃO, parou de fumar? SIM () NÃO ()		Se NÃO, parou de beber? SIM () NÃO ()	
Comorbidades pré-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	O paciente é usuário de drogas?	
	SIM () Qual? _____	NÃO ()
Possui parceiro(a) fixo(a)?		
SIM ()	NÃO (SOLTEIRO(A)) ()	MÚLTIPLOS PARCEIROS(AS) ()
Se respondeu sim à questão anterior, o(a) parceiro(a) é infectado pelo HIV?		
SIM ()	NÃO ()	IGNORADO ()

3. Infecção pelo HIV (continuação)

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 ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
Como o paciente considera a consultas médica?			
Importante ()	Indiferente ()	Sem importância ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
O que o paciente acha do atendimento no hospital?			
Bom ()	Regular ()	Ruim ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
Com relação às consultas, o quanto frequentemente o paciente falta a elas?			
Muitas vezes ()	Algumas Vezes ()	Nunca ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
Considerando as condições financeiras, de transporte, de trabalho, dentre outras, do paciente, como ele(ela) diria o quanto fácil é chegar no hospital?			
Fácil ()	Normal ()	Difícil ()	PREFERE NÃO OPINAR ()
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 ()	PREFERE NÃO OPINAR ()