

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

JOSÉ LEANDRO DE ANDRADE SANTOS

**FATORES DO HOSPEDEIRO ASSOCIADOS À MORTE CELULAR NA  
RECUPERAÇÃO IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS  
SUBMETIDOS À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

Recife  
2022

JOSÉ LEANDRO DE ANDRADE SANTOS

**FATORES DO HOSPEDEIRO ASSOCIADOS À MORTE CELULAR NA  
RECUPERAÇÃO IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS  
SUBMETIDOS À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

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

Orientador: Rafael Lima Guimarães

Coorientador: Fabrício Oliveira Souto

Recife

2022

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santos, José Leandro de Andrade.

Fatores do hospedeiro associados à morte celular na recuperação imunológica de indivíduos HIV-1 positivos submetidos à terapia antirretroviral / José Leandro de Andrade Santos. - Recife, 2022.

148f.: il.

Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.

Orientação: Rafael Lima Guimarães.

1. Imunogenética; 2. Antirretrovirais; 3. Piroptose. I. Guimarães, Rafael Lima. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

JOSÉ LEANDRO DE ANDRADE SANTOS

**FATORES DO HOSPEDEIRO ASSOCIADOS À MORTE CELULAR NA  
RECUPERAÇÃO IMUNOLÓGICA DE INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS  
SUBMETIDOS À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Genética. Área de Concentração: Genética Humana.

Aprovado em 26/07/2022

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

RAFAEL LIMA GUIMARAES

Data: 25/08/2022 09:20:33-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Dr. Rafael Lima Guimarães  
Universidade Federal de Pernambuco

*Michelle Melgarejo da Rosa*

---

Dra. Michelle Melgarejo da Rosa  
Universidade Federal de Pernambuco

*Suelen Cristina de Lima*

---

Dra. Suelen Cristina de Lima  
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Aggeu Magalhães

*Pablo Ramon Gualberto Cardoso*

---

Dr. Pablo Ramon Gualberto Cardoso  
Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente

LUCAS ANDRE CAVALCANTI BRANDAO

Data: 24/08/2022 14:31:00-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão  
Universidade Federal de Pernambuco

Às pessoas que vivem com HIV e que contribuíram para os experimentos realizados nesta Tese. A Ciência aqui demonstrada, ainda que básica, é feita em busca de perspectivas a vocês.

## AGRADECIMENTOS

Um Doutorado é uma história. Não que tudo que é feito durante as outras etapas acadêmicas não seja, mas esta é diferente. É a sensação de um fim de ciclo, mesmo talvez sendo só um degrau para avançar ao próximo. E como todas as boas histórias, as personagens que as compõem merecem uma dedicação especial.

Começo a minha, dedicando tudo, sem exceção, a minha mãe, Helena, e aos meus irmãos, Leonardo e Laryssa. Em todo esse tempo de dedicação e abdicação, idas e vindas, estresses e saudade, vocês não saíram da minha mente um instante. A nossa história, e que só a gente sabe, serviu de mola propulsora em cada desafio, que hoje, em partes, se conclui. Eu os amo, tenham certeza disto sempre!

Este trabalho, desenvolvido entre 2018 e 2022, começou na verdade bem antes, no sonho de um aluno de Ensino Médio, que era fascinado no mundo da Genética, e ao assistir uma entrevista no jornal local sobre o desenvolvimento de vacinas para o HIV de quem viria a ser seu *Big Boss*, Sergio Crovella, se encantou e colocou na mente que queria estar inserido naquilo. Era 2010. Com determinação e vontade de realizar, e um leve empurrão do destino, cheguei ao laboratório que um dia quis estar, quatro anos depois.

Pela oportunidade ímpar, agradeço ao meu orientador, que desde o começo me acolheu, apesar das minhas limitações, e com sua forma didática e centrada, conseguiu extrair de mim características que nem eu mesmo sabia que tinha. Serei eternamente grato ao professor Rafael Guimarães. Também, de modo mais recente, ao coorientador, Fabrício Souto, pela dedicação e pelas contribuições, sempre agregando conteúdo aos nossos trabalhos.

No processo de maturação profissional, aprendi em todos os lugares que percorri dentro da Universidade – e foram muitos –, que a gente, sozinho, não chega muito longe. Neste ponto, agradeço as muitas pessoas que fizeram os dias mais leves e dividiram muitas das dificuldades ao longo da caminhada. Da graduação, destaco Caio, Aline, Leyde, Gustavo, Marília, Mário, Adryelle e Bárbara que seguem comigo até hoje, nos contatos esporádicos que a vida traz. Do meu grupo de pesquisa, agradeço a toda a equipe PATGEN, que a rotina diária culminava sempre em diálogos produtivos: Paula, Suelen, Camilla, Ronaldo, Jaqueline, Eduardo, Eduarda, Paulo, Adna, Lucas, Henrique, Denise, Guaraná, Dalila, Ronald, Antônio e muitos outros que passaram ao longo destes oito anos.

Algumas destas pessoas da rotina diária de estudos e experimentos se tornam mais que apenas colegas de sala de aula e trabalho. Estas extrapolaram, de uma forma positiva, algumas barreiras tênues que tendem a se formar. Wlisses, Jessyca, Carol, Adriana, Natália e Jeanne são sinônimos disso. Agradeço aqui por tantos momentos bons, mas também pelos ruins que precisamos passar juntos. Torço para que sigamos nos ajudando e nos encontrando nos caminhos que a vida nos propuser, pois sei que junto a vocês me sentirei sempre mais confiante.

Além dos muros da Universidade, tive muita sorte em ter pessoas que, de base, sempre me apoiaram e estiveram presentes. Agradeço às famílias Lopes de Andrade e Santos, cujo vínculo sanguíneo nos une, e a admiração e torcida sempre foram constantes, bem como as famílias Abath Cardoso, Santos, Souza Ferreira e Cavalcanti de Lima, cujo vínculo de afeto presente foi auxílio em diversos momentos desta jornada. Aos amigos de vida, Aline, Jéssica, Luan, Jessyka, Alexsandra, Geilza, Juliana, Paloma, Polyana, Eloyze, Henrique, Marianne, Plínio, Emanuely, Ivanna e Justus; aos meus cunhados Raul e Victória, e a Dayane, Viviane e Letícia, primas-irmãs, por tantas coisas boas vivenciadas.

Serei sempre grato ao Ensino Público, tendo usufruído do mesmo desde a extinta 1ª série do Fundamental I até o presente momento, como concluinte de Doutorado pela UFPE. A Educação, nas suas amplas formas e Instituições, é Direito de todos, e por assim ser, merece ser posto em prática, sem distinção. Aos órgãos de fomento que auxiliaram no desenvolvimento dos nossos projetos propostos, o auxílio de vocês, bem como o investimento em Pesquisa são imprescindíveis para o desenvolvimento de melhorias à sociedade.

Em dedicatória especial, ressalvo aqueles que não estão mais presentes fisicamente para celebrar comigo este momento. Meu avô João, exemplo de homem honesto e em ensinar a viver a vida com uma boa gargalhada, que deixava tudo mais leve; minha avó paterna, Rita, exemplo de força e garra em defender aquilo que acreditava; Maria das Neves, que vibrou junto a minha aprovação no vestibular e preparação de vinda a Recife, exemplo de professora e mãe. A eles, e aos demais que não foram nominalmente citados, obrigado por terem cruzado meu caminho, as lembranças serão sempre presentes.

Por fim, agradeço a Maria Lopes de Lira, meu maior exemplo de vida. A palavra amor em essência, pura, genuína. Ouvir Avó sempre vai ter um som diferente quando ela for a lembrança. Virá sempre com abraço, um beijo estalado e um “Leo, faz minha

tapioca?”. São tantas coisas que queria falar aqui sobre ela, que daria facilmente outra centena de páginas. Hoje, tentando ser breve, só tenho a agradecer por cada segundo que passamos juntos. Também, sou grato pela partilha da sua fé. Que a sua intercessão junto a Deus e “Gracinha”, Vó, continue abençoando os meus caminhos.



“[...] Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco que me cabe me dando por inteiro  
[...]”

(Thiago de Mello, 1975)

## RESUMO

A não-recuperação imune (NRI) é uma característica clínica observada em indivíduos que fazem uso da terapia antirretroviral (TARV), onde estes alcançam a supressão da carga viral, porém, não conseguem recuperar os níveis de linfócitos T CD4+. Dentro de um aspecto multifatorial, as variáveis associadas à ocorrência da NRI são categorizadas em fatores associados à deficiência na produção de células T CD4+ e àqueles ligados à destruição exacerbada. No contexto da morte celular, a piroptose é responsável pela depleção substancial destas células. O objetivo do trabalho foi avaliar se fatores do hospedeiro podem influenciar na não recuperação imune (NRI) de indivíduos HIV-positivos sob terapia no contexto da morte celular. Variantes dos genes da via da piroptose *IL18*, *IL1B*, *NLRP3*, *CARD8* e *IFI16* foram avaliadas por sondas TaqMan alelo-específicas. Realizou-se uma análise genótipo-guiada com o gene *IL18*, considerando o aspecto imunofenotípico de linfócitos T CD4+ gerais (CD3+CD4+) e recém-emigradas do timo (RTE) (CD4+CD31+) em piroptose (FLICA-Caspase1+). Foi analisado o perfil imunofenotípico utilizando o sexo como variável de risco à NRI em relação aos níveis de células T CD4+ RTE em piroptose. Foi realizada uma meta-análise com dados de RNA-seq, avaliando o perfil de expressão diferencial de células T CD4+ entre pacientes infectados e não-infectados com o HIV-1, seguido por análise de ontologia gênica (OG). O polimorfismo C>G no gene *IL18* demonstrou uma menor susceptibilidade à não resposta imune tanto do alelo G ( $P=0.10$ ) quanto do genótipo GG ( $P=0.022$ ). Foi demonstrada a associação entre o polimorfismo rs187238 com os níveis de morte celular por caspase-1 ( $P=0.020$ ). Observou-se que indivíduos com o genótipo GG possuem menores níveis de células T CD4+ RTE piroptóticas em comparação com o ancestral homozigoto CC ( $P=0.029$ ) e o heterozigoto CG ( $P=0.018$ ). O sexo masculino apresentou um maior nível de células T CD4+ RTE em comparação ao sexo feminino ( $P=0.035$ ). A meta-análise evidenciou a expressão diferencial de 64 genes relacionados à dinâmica da infecção pelo HIV-1. A análise de OG encontrou dados relacionados às vias de resposta imune, migração e adesão celular, inflamação e apoptose, além das vias de sinalização Wnt, Notch e ERK/MAPK. Os dados encontrados neste estudo fornecem subsídios para uma melhor compreensão dos aspectos envolvidos com a morte celular em indivíduos HIV positivos não respondedores imunológicos.

**Palavras-chave:** Imunogenética; Antirretrovirais; Piroptose; Linfócitos T CD4+.

## ABSTRACT

Immune non-recovery (NRI) is a clinical feature observed in individuals who use antiretroviral therapy (ART) that achieve viral load suppression but are unable to recover CD4<sup>+</sup> T lymphocyte levels. In a multifactorial aspect, variables associated with NRI occurrence are categorized into factors associated with deficiency in CD4<sup>+</sup> T cells production and linked to exacerbated destruction. In cell death context, pyroptosis is responsible for substantial depletion of T CD4<sup>+</sup> cells. The aim of this study was to evaluate whether host factors can influence the non-recovery immune (NRI) of HIV-positive individuals undergoing therapy in cell death context. Variants of pyroptosis pathway genes *IL18*, *IL1B*, *NLRP3*, *CARD8* and *IFI16* were evaluated by allele-specific TaqMan probes. A genotype-guided analysis was performed with *IL18* gene, considering the immunophenotypic aspect of general CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) and recently emigrated from thymus (RTE) (CD4<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) in pyroptosis (FLICA-Caspase1<sup>+</sup>). Immunophenotypic profile was analyzed using sex as a risk variable to NRI in relation to CD4<sup>+</sup> RTE T cell levels in pyroptosis. A meta-analysis was performed with RNA-seq data evaluating the differential expression profile of CD4<sup>+</sup> T cells between HIV-1 infected and non-infected patients followed by gene ontology (GO) analysis. C>G polymorphism in *IL18* gene demonstrated a lower susceptibility to non-immune response of both G allele (P=0.10) and GG genotype (P=0.022). Association between rs187238 polymorphism and levels of cell death by caspase-1 (P=0.020) was demonstrated. It was observed that individuals with GG genotype have lower levels of pyroptotic RTE CD4<sup>+</sup> T cells compared to homozygous CC ancestor (P=0.029) and CG heterozygote (P=0.018). Males had a higher level of CD4<sup>+</sup> RTE T cells compared to females (P=0.035). Meta-analysis showed the differential expression of 64 genes related to HIV-1 infection dynamics. OG analysis found data related to immune response pathways, cell migration and adhesion, inflammation and apoptosis, in addition to Wnt, Notch and ERK/MAPK signaling pathways. The data found in this study provide subsidies for a better understanding of aspects involved with cell death in HIV-positive individuals non-immune responders.

**Keywords:** Immunogenetics; Antiretrovirals; Pyroptosis; CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### TESE

<b>Figura 1</b> – Principais marcos históricos no contexto da AIDS	27
<b>Figura 2</b> – Estimativa de adultos e crianças vivendo com HIV	28
<b>Figura 3</b> – Cascata de testagem e tratamento do HIV, Global, 2020	34
<b>Figura 4</b> – Esquema de árvore filogenética dos Lentivirus	35
<b>Figura 5</b> – Estrutura genômica do HIV-1	37
<b>Figura 6</b> – Estrutura Morfológica do HIV-1 imatura e madura, exibindo a composição da bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, demonstrando os produtos dos genes <i>env</i> , <i>gag</i> e <i>gag-pol</i> com seus respectivos domínios	39
<b>Figura 7</b> – Ciclo replicativo do HIV-1	41
<b>Figura 8</b> – Patogênese viral	45
<b>Figura 9</b> – Etapas de bloqueio da Terapia Antirretroviral (TARV)	49
<b>Figura 10</b> – Produção de células T CD4+ durante a TARV	56
<b>Figura 11</b> – Perda da variabilidade de reconhecimento antigênico a partir da disseminação da infecção nos órgãos linfoides.	57
<b>Figura 12</b> – Características das mortes celulares por apoptose, necroptose e piroptose.	59
<b>Figura 13</b> – Mecanismo geral de ativação da Piroptose pelo Inflamassoma	62
<b>Figura 14</b> – Mecanismo de morte celular nas células permissivas e não-permissivas à infecção	64
<b>Figura 15</b> – Mecanismo de ativação imune crônica nos pacientes HIV-positivos	65
<b>Figura 16</b> – Mecanismo de sinapse virológica	67

### APÊNDICE A – IL18 GENE POLYMORPHISM AND ITS INFLUENCE ON CD4+ T-CELL RECOVERY IN HIV-POSITIVE PATIENTS RECEIVING ANTIRETROVIRAL THERAPY

<b>Fig. 1</b> – Pyroptosis levels of CD4 T-cells based on FLICA-Caspase1 activity in ART-treated patients (immunologicaapêndl non-responders – INR and immunological responders – IR)	104
---	-----

APÊNDICE B – DIFFERENCES IN PYROPTOSIS OF RECENT THYMIC  
EMIGRANTS CD4+ T-LYMPHOCYTES IN ART-TREATED HIV-POSITIVE  
PATIENTS ARE INFLUENCED BY SEX

**Fig. 1** – Pyroptosis levels in recent thymic emigrants (RTE) CD4+ T lymphocytes of  
ART-treated individuals stratified by sex 111

APÊNDICE C – HIV-1 INFECTION TRANSCRIPTOMICS: META-ANALYSIS OF  
CD4+ CELLS GENE EXPRESSION PROFILES

**Figure 1** – Trimmed mean of M-values (TMM)-normalized [26] and standardized  
heatmaps gene expression of: (a) Langer et al. (2019) [24] and (b) Shytaj et al. (2020)  
[25] 120

## LISTA DE TABELAS

### TESE

<b>Tabela 1</b> – Indicadores epidemiológicos da AIDS por regiões do Brasil	31
<b>Tabela 2</b> – Classificação de Fiebig para estagiamento laboratorial da infecção recente pelo HIV-1	47
<b>Tabela 3</b> – Antirretrovirais disponíveis no SUS para PVHIV no Brasil	51
<b>Tabela 4</b> – Variantes em genes da via da piroptose	76

### APÊNDICE A – IL18 GENE POLYMORPHISM AND ITS INFLUENCE ON CD4+ T-CELL RECOVERY IN HIV-POSITIVE PATIENTS RECEIVING ANTIRETROVIRAL THERAPY

<b>Table 1</b> – Allelic and genotype frequencies of polymorphisms among ART-treated groups (immunological non-responders and immunological responders)	102
---	-----

<b>Supplementary Table</b> – Sociodemographic and clinical characteristics of the HIV-positive patients under antiretroviral therapy enrolled in our study	107
--	-----

### APÊNDICE B – DIFFERENCES IN PYROPTOSIS OF RECENT THYMIC EMIGRANTS CD4+ T-LYMPHOCYTES IN ART-TREATED HIV-POSITIVE PATIENTS ARE INFLUENCED BY SEX

#### Supplementary File

<b>Table 1</b> – Sociodemographic, clinical and laboratory parameters of HIV-positive patients under ART according to sex	114
<b>Table 2</b> – Sociodemographic and clinical dates of donors according to sex	115

### APÊNDICE C – HIV-1 INFECTION TRANSCRIPTOMICS: META-ANALYSIS OF CD4+ T CELLS GENE EXPRESSION PROFILES

<b>Table 1</b> – Summary of studies included in the meta-analysis of gene expression profiles of CD4+ T infected with HIV-1 in vitro	119
<b>Table 2</b> – Cross-reference of individual studies with the meta-analysis results and other studies involving HIV-1 replication and life cycle, alongside HIV Human Interaction Database and RNAcentral, a database of non-coding RNA. The binomial distribution was used to test the null hypothesis that the intersection of the original source with the meta-analysis list is equal or less than expected by chance via one-sided tests	120

**Table 3** – Selected enriched pathways reported by gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes identified through meta-analysis of gene expression profiles of CD4+ T cells infected with HIV-1 in vivo

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM-2	<i>Absent in Melanoma 2 ou Interferon-inducible protein</i>
ALR	<i>AIM2-like receptors</i>
APCs	<i>Antigen Present Cells</i>
ARVs	<i>Antirretrovirais</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain</i>
BBVs	<i>Bloodbone viruses</i>
CARD	<i>Domínio de Ativação e Recrutamento de Caspase</i>
CARD8	<i>Domínio de Ativação e Recrutamento de Caspase tipo 8</i>
CCR5	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CD4+	<i>Cluster of differentiation 4 positive</i>
CD8+	<i>Cluster of differentiation 8 positive</i>
CMV	<i>Citomegalovírus</i>
CRFs	<i>Circulating Recombinant Forms</i>
CV	<i>Carga Viral</i>
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DAMPs	<i>Padrões Moleculares Associados a Danos</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fas	<i>Apoptosis-mediating surface antigen</i>
FasL	<i>Apoptosis-mediating surface antigen ligand</i>
FIIND	<i>N-terminal domain function to find</i>
FSH	<i>Hormônio Folículo- estimulante</i>
gp120	<i>Glicoproteína 120</i>
gp41	<i>Glicoproteína 41</i>
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i>
HIV-2	<i>Human Immunodeficiency Virus type 2</i>
HTLV-III	<i>Human T-lymphotropic Virus III</i>
IB	<i>Imunoblot</i>



IBR	Imunoblot rápido
IC	Intervalo de Confiança
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
IE	Imunoensaio
IF	Inibidor de Fusão
IFI	Imunofluorescência indireta
IFI16	<i>Gamma-interferon-Inducible Protein type 16</i> ou <i>Interferon-inducible Myeloid Differentiation Transcriptional Activator</i>
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INI	Inibidor de Integrase
INNTR	Inibidor Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa
INRs	Não Respondedores Imunológicos
INTR	Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa
IP	Inibidor de Protease
IP/r	Inibidor de Protease/ritonavir
IR	<i>Immunological Responders</i>
LAV	<i>Lymphadenopathy-Associated Virus</i>
LFA-1	<i>Integrin Leukocyte Function-association Antigen 1</i>
LH	Hormônio luteinizante
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear Kappa Beta
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD-like Receptor Family</i>
NLRP3	<i>NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3,</i>
NLRPC4	<i>NOD-like Receptor Family, CARD domain containing protein 4</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos

pb	Pares de bases
PCD	Morte Celular Programada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEP	Profilaxia Pós-Exposição
PrEP	Profilaxia Pré-Exposição
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PVHIV	Pessoas vivendo com HIV
PYD	<i>Pyrin Domain</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SIV <sub>cpz</sub>	<i>Simian Immunodeficiency Virus chimpanzee</i>
SIV <sub>cm</sub>	<i>Simian Immunodeficiency Virus capped-Mangabey</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TARV	Terapia Antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de Célula T
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TM	Testes Moleculares
TR	Transcriptase Reversa
TRIM	<i>Tripartite Motif Family</i>
UDI	Usuários de Drogas Injetáveis
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
URFs	Formas Únicas Recombinantes
VDLR	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
WB	<i>Western blot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

kD	kDalton
mm <sup>3</sup>	Milímetro(s) Cúbico(s)
mL	Mililitro(s)
nm	Nanômetro(s)
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)</b>	<b>24</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Histórico</b>	<b>24</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Epidemiologia</b>	<b>28</b>
2.1.2.1	Dados Epidemiológicos Globais	28
2.1.2.2	Dados Epidemiológicos Locais	30
2.1.2.3	Dados da Meta 90-90-90	32
<b>2.2</b>	<b>O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (HIV)</b>	<b>34</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Aspectos Filogenéticos</b>	<b>34</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Aspectos Genéticos</b>	<b>36</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Aspectos Morfológicos</b>	<b>38</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Ciclo Viral</b>	<b>40</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Vias de Transmissão do HIV-1</b>	<b>42</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Patogênese Viral</b>	<b>44</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Diagnóstico do HIV-1</b>	<b>46</b>
<b>2.3</b>	<b>Antirretrovirais (ARV)</b>	<b>48</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Terapia Antirretroviral</b>	<b>48</b>
<b>2.3.2</b>	<b>A Resposta Terapêutica: Sucesso e Falhas</b>	<b>52</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Falha na Recuperação Imune</b>	<b>53</b>
<b>2.4</b>	<b>PIROPTOSE</b>	<b>57</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Piroptose, uma via de morte celular altamente inflamatória</b>	<b>57</b>
<b>2.4.2</b>	<b>A piroptose na infecção pelo HIV-1</b>	<b>62</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Genes e proteínas da via da piroptose</b>	<b>68</b>
2.4.3.1	NLRP3	68

2.4.3.2	IFI16	69
2.4.3.3	CASP1	70
2.4.3.4	CARD	71
2.4.3.5	IL-1 $\beta$	72
2.4.3.6	IL-18	73
<b>2.4.4</b>	<b>Fatores do hospedeiro associados à não recuperação imune mediada pela morte celular</b>	<b>74</b>
2.4.4.1	Sexo	74
2.4.4.2	Aspectos Genéticos	75
2.4.4.3	Ativação Imune	76
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>78</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>APÊNDICES</b>	<b>100</b>
	<b>APÊNDICE A – <i>IL18</i> GENE POLYMORPHISM AND ITS INFLUENCE ON CD4+ T-CELL RECOVERY IN HIV-POSITIVE PATIENTS RECEIVING ANTIRETROVIRAL THERAPY</b>	<b>100</b>
	<b>APÊNDICE B – DIFFERENCES IN PYROPTOSIS OF RECENT THYMIC EMIGRANTS CD4+ T-LYMPHOCYTES IN ART-TREATED HIV-POSITIVE PATIENTS ARE INFLUENCED BY SEX</b>	<b>108</b>
	<b>APÊNDICE C – HIV-1 INFECTION TRANSCRIPTOMICS: META-ANALYSIS OF CD4+ CELLS GENE EXPRESSION PROFILES</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>.130</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO IMIP</b>	<b>130</b>
	<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>131</b>

<b>ANEXO C – QUESTIONÁRIOS E FORMULÁRIOS DE ACOMPANHAMENTO</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO D – OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS</b>	<b>146</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Passados quase 40 anos do início da pandemia do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o conhecimento acerca do vírus proporcionou diversos avanços no contexto da infecção, reduzindo os índices de morbimortalidade ao longo dos anos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), contribuindo na evolução de aspectos clínicos, sociais, políticos e econômicos.

Apesar dos números voltados à infecção pelo HIV em todo o mundo serem considerados ainda epidêmicos, muito se avançou, com base na ampliação de serviços de diagnóstico e no acesso à terapia antirretroviral (TARV). A TARV tem por objetivo o controle da carga viral, seguido de uma consequente recuperação de células T CD4+, visto que se espera que um número menor destas células esteja sendo infectado. Porém, neste contexto, alguns aspectos esperados no sucesso terapêutico apresentam-se controversos.

Além da falha virológica (mecanismo em que não se alcança uma baixa da viremia), um outro aspecto da falha terapêutica vem sendo avaliado ao longo dos anos. Cerca de 10% a 40% dos indivíduos que fazem uso dos antirretrovirais e alcançam o sucesso virológico, não conseguem recuperar o quantitativo de células T CD4+, sendo considerados indivíduos não respondedores imunológicos. Diversos fatores têm sido associados com a ocorrência da deficiência na recuperação imune destes pacientes, de modo que esse contexto multifatorial se agrupa em dois mecanismos principais: aqueles ligados à deficiência na síntese de linfócitos e aqueles relacionados com a destruição exacerbada de células T CD4+.

No âmbito da depleção destas células mediada por vias de morte celular, os estudos iniciais acreditavam que essa decorria em razão da ativação de vias de apoptose. Porém, a nível de tecidos linfoides, este processo é ocasionado a partir da ativação da via de morte celular dependente de caspase-1 ou via da piroptose.

A piroptose é uma via de morte celular programada, altamente inflamatória, voltada a patógenos intracelulares. Na infecção pelo HIV, a indução da piroptose se dá por mecanismos voltados à ativação de complexos proteicos denominados inflamassoma, que reconhecem tanto transcritos incompletos de DNA-próvilal quanto moléculas derivadas do dano que este tipo de morte ocasiona na célula. As etapas seguintes à formação do inflamassoma envolvem a ativação da caspase-1, a clivagem de proteínas que geram poros na membrana celular e a conversão de citocinas pró-

inflamatórias da sua forma inativa para a forma ativa. Esse conjunto de mecanismos, por fim, induz o recrutamento de células ao sítio de infecção, levando à cronicidade do processo inflamatório nos indivíduos infectados.

Diversos aspectos de regulação imunológica e genética associados à ativação da piroptose são capazes de modular genes e/ou proteínas desta via, influenciando diretamente na progressão à AIDS mediada pela depleção acelerada de linfócitos T CD4+. Assim, o presente estudo visa a análise de variáveis do hospedeiro que possam estar relacionadas com a não recuperação imune de indivíduos HIV positivos submetidos à terapia, de modo a buscar uma melhor compreensão sobre a interação desses fatores associados à morte celular na recuperação imune.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

#### 2.1.1 Histórico

Após quatro décadas desde o primeiro caso de AIDS relatado pela comunidade científica, ainda se buscam esclarecimentos quanto a sua origem, bem como a rápida expansão da doença e o processo pandêmico que se estabeleceu nos anos seguintes. A hipótese mais bem estabelecida, fundamentada em análises filogenéticas, aponta o oeste da África como fonte do seu agente etiológico. Com base em avanços nas pesquisas acerca da síndrome, a amostra mais antiga sequenciada pressupõe que, em meados da década de 50, já existiam casos da doença pelo continente africano, tendo esta se disseminado pelo mundo cerca de 30 anos depois (FAUCI; LANE, 2020a; FEHERVARI, 2018).

Em 1981, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) relatou que cinco indivíduos jovens, sem histórico prévio de morbidades, apresentaram uma pneumonia causada por um agente comum, o *Pneumocystis carinii*. Amostras biológicas destes indivíduos demonstravam uma significativa depleção de células T e uma resposta linfoproliferativa baixa, demonstrando, assim, o perfil imunossupressor da desconhecida doença. Em seguida, com o relato de mais casos, outros aspectos clínicos começaram a ser observados, como o Sarcoma de Kaposi e infecções oportunistas comuns a indivíduos imunossuprimidos (CDC, 1981a, 1981b; STARLING, 2018).

Em comum, além do perfil clínico-laboratorial, se tratavam de indivíduos homossexuais, tendo sido definido, com base no estilo de vida destes indivíduos, o contato sexual como primeira via de contaminação. Com o aumento no número de eventos da nova doença, uma elevada taxa de mortalidade também começou a surgir, demonstrando uma evolução progressiva severa nos indivíduos acometidos (CDC, 1982d; STARLING, 2018).

Em 1982, O CDC decide então adotar o termo *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS), para se referir a depleção do sistema imune associada a maior susceptibilidade de desencadear infecções oportunistas e doenças relacionadas à imunossupressão. Em consequente, novos casos entre indivíduos heterossexuais foram sendo relatados, descentralizando a população homoafetiva como a única fonte de acometimento (CDC, 1982a).

Haitianos, hemofílicos, profissionais do sexo e usuários de drogas injetáveis também passaram a apresentar a sintomatologia referida à AIDS. Por fim, em 1983, foi registrada a primeira contaminação em uma criança recém-nascida, chegando-se à conclusão de que havia também a possibilidade de uma infecção de mãe para filho. Definiu-se então que as vias de transmissão do agente causador da imunossupressão decorriam de contato sexual, exposição a sangue e derivados contaminados e transmissão vertical. Com a disseminação do vírus pela Europa e outros países, foi possível notar o caráter pandêmico da doença, decretado posteriormente em 1984 (CDC, 1982b, 1982c, 1983a, 1983b; ECLINICALMEDICINE, 2021).

A busca pelo provável agente etiológico desencadeou uma corrida científica nos anos seguintes. O Instituto Pasteur na França identificou inicialmente um retrovírus, denominando-o *Lymphadenopathy-Associated Virus* (LAV), sugerindo ser este o agente causador da AIDS. Posteriormente, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos também acreditou encontrar o que viria a ser o agente imunossupressor, sendo atribuído o termo *Human T-lymphotropic Virus III* (HTLV-III). Um terceiro grupo de pesquisadores da Universidade da Califórnia e o Departamento de Serviços de Saúde da Califórnia encontraram um agente semelhante ao retrovírus identificado na França, e confirmaram sua relação com a AIDS, designando o termo *AIDS-associated Retroviruses*. Por fim, em 1986, análises genéticas determinaram que todos se tratavam do mesmo retrovírus, sendo estabelecido pela Comissão Internacional para a Taxonomia dos Vírus o termo *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; GALLO et al., 1984; LEVY et al., 1984; SCHMID, 2018).

Após o isolamento e o início da compreensão de aspectos fisiopatológicos da infecção, as buscas de medicamentos e vacinas para a AIDS tomaram o cenário científico. Já em 1987, a *Food and Drug Administration* (FDA), agência federal do departamento de saúde americano, aprovou a utilização do primeiro fármaco antirretroviral no tratamento da AIDS, a Zidovudina ou Azitomidina (AZT), um fármaco da classe dos Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR), sendo por algum tempo o único disponível (DU TOIT, 2018; SANDSTRÖM; KAPLAN, 1987).

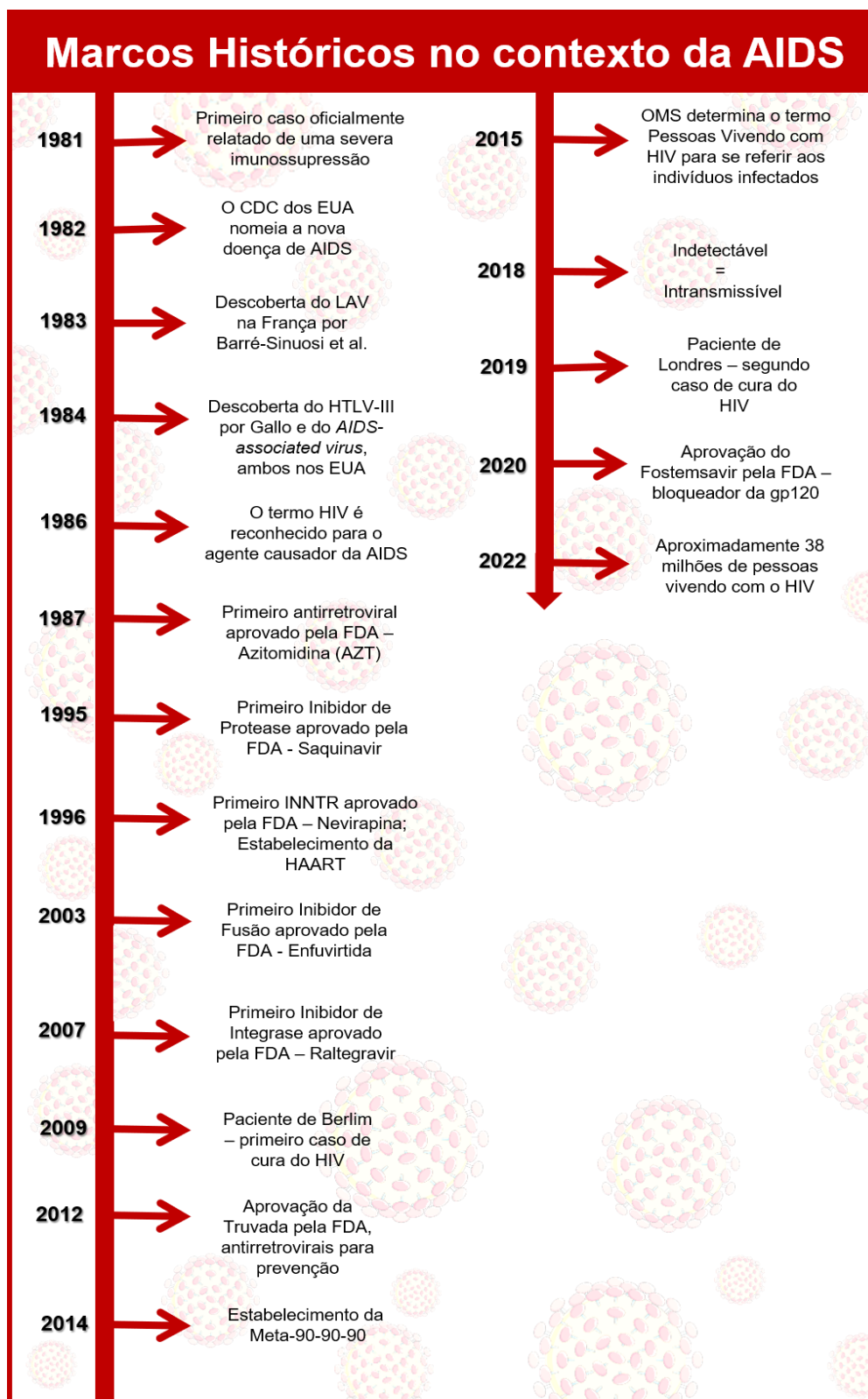
Com os avanços na compreensão da biologia do vírus, outras drogas e classes de fármacos foram criadas. Em comum, estes fármacos mantinham apenas um controle da replicação viral, sem uma cura da doença, além de serem utilizados em

regime monoterápico, contribuindo para o rápido desenvolvimento de resistência viral (CULLY, 2018; DU TOIT, 2018; KEMNIC; GULICK, 2022).

Uma vez que as análises científicas demonstraram uma baixa eficácia na administração individual dos fármacos, a Merck e o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos EUA anunciaram em 1995 o início de testes a partir da combinação de três fármacos, formando o extinto termo HAART (do inglês, *High Active Antiretroviral Therapy*), sendo um ano depois aplicada e expandida até os dias atuais constituindo a Terapia Antirretroviral (TARV). A adoção deste esquema combinado e a produção de mais classes de medicamentos permitiu ao longo dos anos que indivíduos infectados, desde que seguindo protocolos e diretrizes médicas, obtivessem um controle da infecção, proporcionando uma melhor qualidade de vida, bem como um aumento expressivo na expectativa de vida. (BENZAKEN et al., 2019; FORSYTHE et al., 2019).

Além da TARV atualmente utilizada, novas abordagens de prevenção vêm sendo disponibilizadas com o objetivo de reduzir os índices voltados à infecção pelo HIV. Apesar dos evidentes avanços alcançados ao longo dos anos no contexto do tratamento ao HIV, o acesso a cura amplamente reprodutível segue sendo um desafio para a comunidade científica. Muitos questionamentos envolvendo aspectos tanto virais quanto do hospedeiro continuam sem respostas efetivas, sendo necessárias maiores discussões para proporcionar um detalhado conhecimento no contexto da infecção pelo HIV, em busca da tão aguardada cura. A *timeline* dos principais eventos envolvendo os avanços desde a década de 80 é mostrada na Figura 1 (FAUCI; LANE, 2020b; KALIDASAN; THEVA DAS, 2020; MARTINEZ-VESGA, 2018; THE LANCET, 2021).

Figura 1 – Principais marcos históricos no contexto da AIDS.



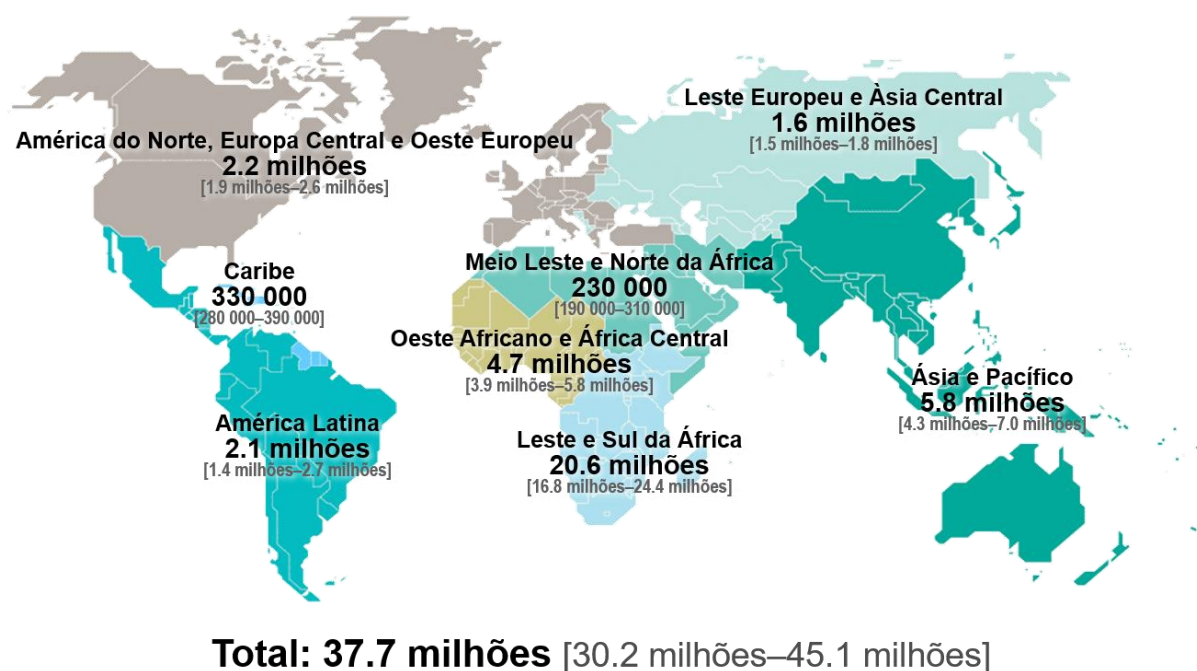
Fonte: O Autor (2022). FDA - Food and Drug Administration; INNTR - Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos; HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy; CDC – Center of Diseases; LAV - Lymphadenopathy Associated Virus; HTLV-III - Human T Lymphotropic Virus.

## 2.1.2 Epidemiologia

### 2.1.2.1 Dados Epidemiológicos Globais

O relatório anual da Junta das Nações Unidas para HIV/AIDS (UNAIDS) divulgado em dezembro de 2021, com dados referentes ao ano de 2020, aponta que existem em todo o mundo 37,7 milhões de pessoas vivendo com o HIV (PVHIV) (Figura 2). Os dados mostram ainda que o número de novas infecções registradas nesse ano foi de 1,5 milhão de indivíduos, representando uma diminuição de 48,3% em comparação ao ano 2000, com a mortalidade tendo a AIDS como causa base chegando a aproximadamente 680.000 óbitos, sendo observada também uma redução de 47% nas mortes relacionadas a AIDS desde 2010 (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2021a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Figura 2 – Estimativa de adultos e crianças vivendo com HIV.



Fonte: Adaptado de UNAIDS (2021).

Apesar dos avanços na redução dos números voltados ao HIV/AIDS, estes ainda se apresentam distantes das metas almejadas para o ano de 2020, que visava uma redução de 75% nos índices de novas infecções, alcançando apenas 31%. A incidência de indivíduos infectados em todo o mundo também apresentou declínio significativo, considerando o período de 2000 a 2018, saindo de 0,47 para 0,24 a cada

1.000 indivíduos não-infectados. Porém, estes valores ainda são abaixo do esperado, considerando a meta de erradicação da epidemia até 2030 (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2021a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020, 2022).

As populações-chave, termo que se refere a homens gays e homens que fazem sexo com outros homens, transexuais, profissionais do sexo, usuário de drogas injetáveis e presidiários, foram responsáveis por 65% dos casos de HIV registrados em 2020, enquanto os 35% remanescentes se atribuem a indivíduos da população geral. Uma possível justificativa do aumento de casos nestas populações segue sendo ainda o estigma e a discriminação social que acometem estes indivíduos, fazendo com que o acesso à prevenção e à terapia seja dificultado (ANDERSSON et al., 2020; UNAIDS, 2020a).

Considerando a disparidade de sexo dentro do contexto do HIV, mulheres ao longo dos anos têm se apresentado mais susceptíveis à infecção em relação aos homens. Os dados apontam que, num contexto global, em 2020, as mulheres foram responsáveis por 51% dos novos casos de infecção de HIV, enquanto indivíduos do sexo masculino foram responsáveis por 49% destes, contrariando o que foi observado no ano anterior, onde os valores para homens e mulheres eram de 52% e 48%, respectivamente. Um dado a ser destacado, é de que adolescentes do sexo feminino e mulheres jovens da África Subsaariana, na faixa etária de 15 a 24 anos, foram responsáveis por aproximadamente 25% dos novos casos de HIV na região. Apesar desta crescente do sexo feminino, homens na faixa etária de 25 a 49 anos ainda são responsáveis por 30% das novas infecções no mundo (UNAIDS, 2020a; UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2021a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Dados relacionados ao estigma sofrido pelas PVHIV, passados 40 anos do início da pandemia, demonstram uma realidade atemporal para os indivíduos infectados. A elevada porcentagem de casos observados nas populações-chave, por exemplo, pode ser considerada reflexo da legislação voltada à criminalização destes grupos em alguns países, dificultando não apenas um controle da transmissibilidade do vírus, bem como a identificação de indivíduos infectados e o acesso destes a serviços de saúde (SILVA; CUETO, 2018).

O estudo da UNAIDS revela que mais de 50% dos indivíduos portadores do vírus entre 15 e 49 anos já sofreram algum tipo de estigma relacionado ao seu *status*. A exemplo disto, cerca de 2% dos indivíduos infectados no Brasil, quando questionados, afirmaram ter negado serviços de saúde por serem HIV-positivos, enquanto que no Peru estes dados chegaram a 21%, estando estas federações localizadas numa região em que a maior parte dos países possui o acesso à terapia antirretroviral inferior à cobertura de serviços de saúde, e com um crescente aumento envolvendo os novos casos de HIV (UNAIDS 2020).

#### 2.1.2.2 Dados Epidemiológicos Locais

A América Latina apresentou no relatório de 2021 o quantitativo de 2,1 milhões de indivíduos infectados, com uma redução de 21% nos óbitos relacionados à AIDS em comparação ao ano de 2010. O número de novas infecções permanece constante, com uma estimativa de 100.000 novos casos a cada ano. Destaca-se ainda que, dos novos casos registrados na região, 92% está associado às populações-chave, sendo quase a metade deles associado a homens gays e homens que fazem sexo com outros homens. O Brasil, país mais populoso da América Latina, também é o país que concentra o maior número de indivíduos infectados pelo HIV, sendo responsável por 44% da totalidade (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2021a).

Entre a década de 80 e junho de 2019, o Brasil contabilizou 1.045.355 casos de AIDS. O boletim epidemiológico do Ministério da Saúde revela que o país apresenta uma diminuição no número de novos casos de AIDS, com uma média anual de 36,8 mil casos no período de 2016 a 2020. A taxa de mortalidade padronizada para o Brasil também apresentou um declínio de 29,9%, entre 2010 e 2020, saindo de 5,7 para 4,0 óbitos a cada 100.000 hab. O número de mortes tendo a AIDS como causa base foi de 14.000. A tabela 1 exibe os indicadores epidemiológicos dos casos de AIDS no país por região (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2021).

Em 2020, o número de novas infecções pelo HIV foi de aproximadamente 32.7000 novos casos. A distribuição desse quantitativo por regiões do país aponta uma prevalência nas regiões Sudeste (34,5%) e Nordeste (25%), seguido das regiões Sul (17,5%), Norte (13,2%) e Centro-Oeste (9,8%). Tanto os valores relacionados aos casos de AIDS quanto aos de novas infecções apontam uma prevalência do sexo masculino sobre o feminino, com uma razão de 2,4 e 2,8 para os respectivos índices.

Quanto a forma de infecção, os dados apontam que 52,1% dos indivíduos do sexo masculino com idade acima dos 13 anos foram expostos a partir da relação homossexual ou bissexual. Já entre as mulheres na mesma faixa etária, 86,8% foram contaminadas a partir da relação heterossexual (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2021).

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

Indicadores	Brasil	Sudeste	Sul	Nordeste	Norte	Centro-Oeste
Casos diagnosticados*	1.045.355	528.949	206.980	172.483	72.129	64.814
Média Anual de casos de AIDS**	36.800	14.100	6.900	8.700	4.400	2.800
Taxa de detecção***	14,1	12,8	17,6	12,4	19,6	14,7
Total de Óbitos*	360.323	206.139	64.146	51.157	19.625	19.256
Coeficiente de Mortalidade***	4,0	3,6	4,8	3,6	5,9	3,2

Fonte: Ministério da Saúde/Brasil 2021

\*valores relativos ao período entre 1980 e junho de 2021

\*\*valor relativo aos últimos cinco anos (2016–2020)

\*\*\*valores por 100.000 hab.

O Estado de Pernambuco ocupa o primeiro lugar entre os estados do Nordeste brasileiro no número de novos casos de HIV relatados entre os anos de 2007 e 2021 com 19.011 registros, estando, assim, no sétimo lugar do ranking nacional, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). O número de óbitos tendo a AIDS como causa base o coloca nas mesmas posições, no período que compreende o início da epidemia na década de 80 até junho de 2021, com 13.119 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2021).

Considerando o boletim estadual divulgado em 2020 com dados referentes a 2019, observa-se uma prevalência a partir da taxa de detecção de infecções por HIV na região metropolitana do Recife, sendo o *ranking* formado pelos municípios de Olinda (75,4), Cabo de Santo Agostinho (74,9) e Jaboatão dos Guararapes (62,5). A capital, Recife, apresentou uma considerável redução na taxa de detecção de casos de AIDS, passando de 34,1/100.000 hab em 2017 para 22,9/100.000 hab em 2021, ficando em 9º lugar entre as capitais do país. A cidade apresenta também uma redução no coeficiente de mortalidade saindo de 9,2 em 2017 para 7,1 em 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2021; SAÚDE/PERNAMBUCO, 2020).



### 2.1.2.3 Dados da Meta 90-90-90

Mesmo com os indiscutíveis avanços ao longo dos anos nos índices envolvendo o HIV/AIDS num contexto geral e o amplo acesso à terapia, chegando aos 27,7 milhões de indivíduos – uma vez que podem ser observadas variações entre regiões e populações – os objetivos alçados para o ano de 2020 na Meta 90-90-90 ficaram um pouco distantes. Baseada no conceito de que seria impossível erradicar a epidemia do HIV sem a disponibilização da TARV de modo universal, esta tinha por objetivo que, até 2020, 90% dos indivíduos infectados tivessem conhecimento do seu *status*, destes, 90% estivessem em terapia antirretroviral com uma boa adesão e que 90% apresentassem carga viral (CV) indetectável (UNAIDS, 2014, 2020b).

O relatório referente a Meta 90-90-90 aponta que, em 2020, 84% das PVHIV tinham conhecimento do seu diagnóstico, 73% destes estavam em TARV e 66% possuíam carga viral indetectável. Estima-se que o aumento do acesso à terapia tenha poupado cerca de 16,6 milhões de óbitos por causas relacionadas a AIDS desde 2010, um significativo avanço, mas aquém do esperado (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2021a).

A América Latina apresentou 80% dos indivíduos infectados possuindo conhecimento acerca do seu diagnóstico, dos quais 65% estão sob terapia antirretroviral no ano de 2020. Seguindo a menor porcentagem e mais preocupante observada na escala global, 60% dos indivíduos em uso da TARV possuem carga viral suprimida, com um *gap* de aproximadamente 280.000 indivíduos para o alcance do 3º pilar da Meta 90-90-90. O Brasil, por sua vez, apresentou dados superiores em relação à média global e da região latino-americana, com os respectivos valores de 70% e 66% para os dois últimos índices da Meta, de acordo com o total de infectados no país (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2021b, 2021a).

Os principais problemas relacionados as lacunas que ainda são necessárias para a conclusão da Meta 90-90-90 incluem dificuldades que se estendem desde o início do seu estabelecimento, como dados discrepantes, acesso limitado aos números envolvendo o HIV/AIDS e a ausência de dados comparáveis entre os países nos pilares estabelecidos (MARSH et al., 2019; UNAIDS, 2020b).

Vale salientar também, que considerando o contexto pandêmico vivido nos últimos dois anos, a COVID-19 (*Coronavirus Disease 19*) trouxe diversos problemas do ponto de vista epidemiológico aos dados fornecidos para as instituições

pertinentes. Como exemplo, podem ser citadas a sobrecarga dos serviços e sistemas de saúde, a diminuição da testagem para o HIV e consequentemente o início imediato da terapia, a realização de exames de rotina em indivíduos em acompanhamento médico regular e o acesso à TARV, dificultado muitas vezes pelo acesso e distância dos indivíduos que vivem com HIV (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2020, 2021a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

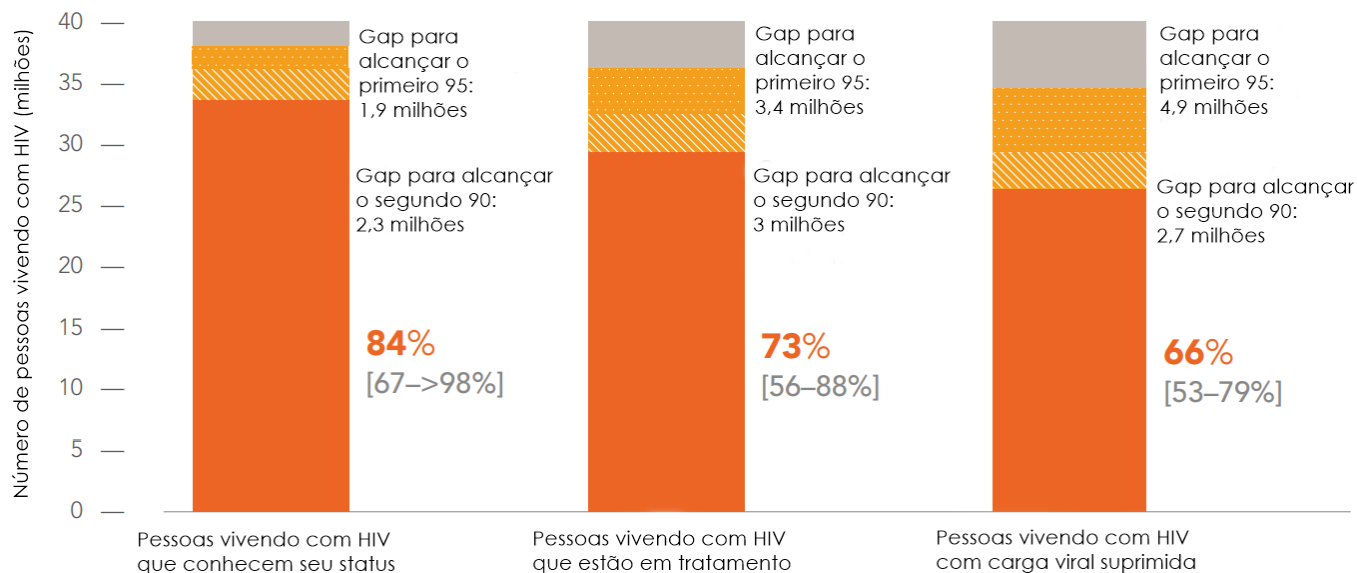
Além disso, os investimentos por parte de órgãos públicos em alguns países vêm sendo diminuídos ao longo dos anos. Na África Subsaariana, região em que se observa uma alta taxa de infecção de mulheres (aproximadamente 4.500 por semana), esta redução tem afetado diretamente programas de prevenção, como o acesso a preservativos, deixando susceptíveis indivíduos jovens que estão iniciando a vida sexual, e influenciando em números como o de novas infecções pelo HIV, que em 2019 apresentou-se 3 vezes superior (MARSH et al., 2019; UNAIDS, 2020b).

O papel da prevenção vem sendo amplamente discutido na tentativa de se alcançarem os índices pré-estabelecidos pela Meta 90-90-90. A Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) vem desempenhando um importante papel, com bons resultados na população envolvendo homens gays e homens que fazem sexo com outros homens. A circuncisão voluntária também tem sido apontada como uma das medidas a serem ampliadas. O desenvolvimento de novas drogas que ofereçam uma maior eficácia e propiciem uma melhor adesão vem sendo buscado. A exemplo disto, a integração do Dolutegravir às diretrizes da TARV vem apresentando resultados positivos nestes aspectos. O uso de medicamentos injetáveis de modo mensal também vem se mostrando relevante (GIROIR, 2020; UNAIDS, 2020b; UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2021a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Visando novas perspectivas, bem como a correção das falhas e contratempos surgidos no decurso da Meta 90-90-90, a UNAIDS segue em busca de alçar objetivos ainda maiores. A nova meta, denominada meta 95-95-95, visa alcançar e ultrapassar a prevista anteriormente, adicionando novos alvos a serem alcançados até o ano de 2030 (Figura 3). Nesta, são inclusas ainda a cobertura para eliminar a transmissão vertical, o acesso de mulheres aos serviços de saúde, a prevenção combinada, além de critérios que adotam a redução do estigma e discriminação sofridos pelas PVHIV. Assim, é possível evidenciar que melhores condições de acesso à saúde sejam

planejadas, buscando cada vez mais que a vivência dos indivíduos soropositivos seja diretamente ampliada em sociedade (UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS), 2020).

Figura 3 – Cascata de testagem e tratamento do HIV, global, 2020.



Fonte: Adaptado de UNAIDS (2021<sup>a</sup>).

## 2.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (HIV)

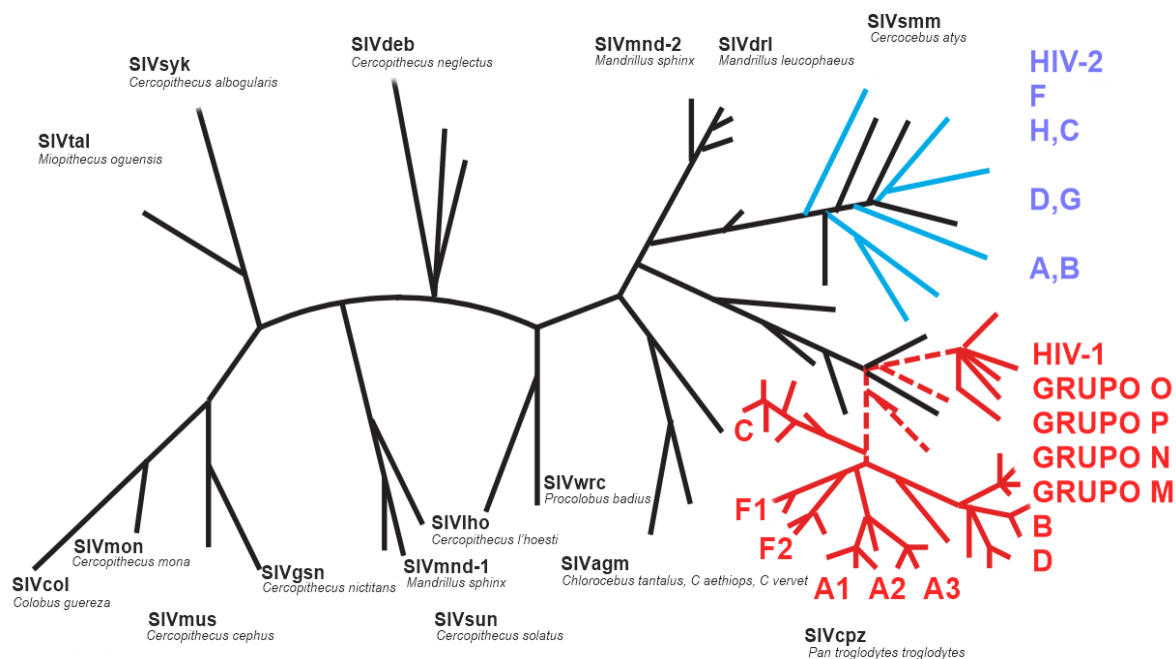
### 2.2.1 Aspectos Filogenéticos

O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) classifica o HIV como um retrovírus, pertencente à Família Retroviridae, Subfamília Orthoretrovirinae e ao Gênero *Lentivirus*. Os *Lentivirus* se distribuem em diversas cepas filogeneticamente distintas que infectam primatas, possuindo em comum o tropismo por células do sistema imunológico e ocasionando imunossupressão nas espécies de mamíferos infectadas (Figura 4). Com base em aspectos genéticos e patogênicos, o HIV é classificado em HIV tipo 1 (HIV-1) e HIV tipo 2 (HIV-2). Estes são distinguidos de acordo com alguns aspectos, como sua origem, a presença de algumas proteínas, além de genes que apresentam uma baixa homologia quando comparados (ESBJÖRNSSON et al., 2019; ICTV, 2011).

Acredita-se que o surgimento do HIV na espécie humana tenha sido determinado a partir da evolução de cepas do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), pelo contato com o sangue de animais infectados, em decorrência da prática de atividades silvícolas desenvolvidas por caçadores no Oeste da África. A origem do

HIV-1 é intimamente relacionada as cepas SIV que infectavam chimpanzés (SIV<sub>cpz</sub>) da espécie *Pan troglodytes troglodytes*, enquanto o HIV-2 sugere-se ter evoluído de uma cepa denominada SIV<sub>smm</sub>, responsável pela infecção de primatas mangabeys (*Cercocebus atys*) locados no oeste africano, onde se concentram os casos de infecção por HIV-2 até os dias atuais (FEHERVARI, 2018; MAGALIS et al., 2018).

Figura 4 – Esquema de árvore filogenética dos Lentivirus.



Fonte: Adaptado de German Advisory Comitee Blood (2016).

O HIV-1, espécie mais virulenta e responsável pela pandemia, compreende quatro linhagens filogenéticas, classificadas nos grupos M, N, O e P. O subtipo M (*major*) é responsável pela imensa maioria dos casos de HIV-1 registrados em todo o mundo, sendo dividido em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K) e sub-subtipos (A1-A5/F1-F2). O grupo O (*outlier*) foi o segundo grupo descrito, sendo o mais filogeneticamente divergente, formulando a hipótese de que tenha evoluído a partir de cepas de SIV que infectavam gorilas (SIV<sub>gor</sub>). A classificação do grupo N (*new*) foi determinada uma vez que este apresentava diferenças que não o agrupava às cepas M e O. A origem do grupo P, o mais recente descrito, também está vinculada a espécies de SIV<sub>gor</sub>. Os grupos N, O e P são responsáveis por infecções restritas a Camarões e países vizinhos, com poucos relatos de indivíduos infectados por estas espécies em outros locais do mundo (GERMAN ADVISORY COMITEE BLOOD, 2016; JUNQUEIRA; DE MATOS ALMEIDA, 2016).

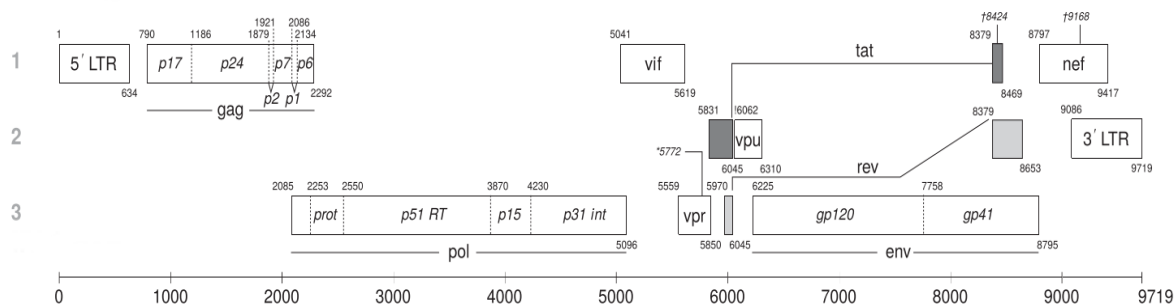
Análises de filogenia têm demonstrado ao longo dos anos uma extensa variabilidade genética entre as cepas de HIV-1. A formação das chamadas cepas recombinantes circulantes (CRFs) e das formas recombinantes únicas (URFs) decorre da recombinação genética em células infectadas por mais de um subtipo viral (podendo também ocorrer entre cepas de um mesmo subtipo), e são as principais responsáveis pela formação de populações virais geneticamente diversificadas. Cerca de 20% das CRFs são derivadas do rearranjo entre cepas pertencentes ao grupo M. Alinhado a isto, a alta taxa de erros na adição de nucleotídeos mediada pela Transcriptase Reversa (TR), enzima responsável pela síntese do DNA pró-viral, está intimamente ligada a alta mutabilidade do vírus (GERMAN ADVISORY COMITEE BLOOD, 2016; NAGATA et al., 2017).

Assim, apesar de estudos apontarem que a alta variabilidade do HIV-1 atue principalmente como mecanismo de evasão do sistema imunológico, a seleção hospedeiro-patógeno durante os processos tangentes a infecção também acarreta em desafios. O controle de novas infecções, o desenvolvimento de fármacos com alta eficácia e estratégias preventivas como o desenvolvimento de vacinas sofrem diretamente influência desta diversidade, dificultando metas de erradicação almejadas no contexto HIV/AIDS (BBOSA; KALEEBU; SSEMWANGA, 2019).

### **2.2.2 Aspectos Genéticos**

O material genético do HIV-1 é formado por duas cadeias de RNA fita simples, com um genoma de aproximadamente 9.7kb de nucleotídeos (Figura 5). As fitas de RNA são flanqueadas nas suas extremidades por duas sequências de repetições longas terminais (LTR), e ao longo do seu genoma são observadas várias matrizes abertas de leitura (ORFs), produzindo, assim, um RNAm responsável pela produção de 15 proteínas (FOLEY et al., 2018).

Figura 5 – Estrutura genômica do HIV-1.



Fonte: Adaptado de Foley et al. (2018). Ilustram-se os genes responsáveis pela síntese das proteínas virais estruturais (gp120 e gp41, p17, p24, p6 e p7), pela replicação (Transcriptase Reversa, Integrase e Protease) e relacionadas à regulação (vif, ver, tat, vpr, vpu e nef). Às extremidades localizam-se as regiões LRT 5' e 3' flanqueando o genoma viral.

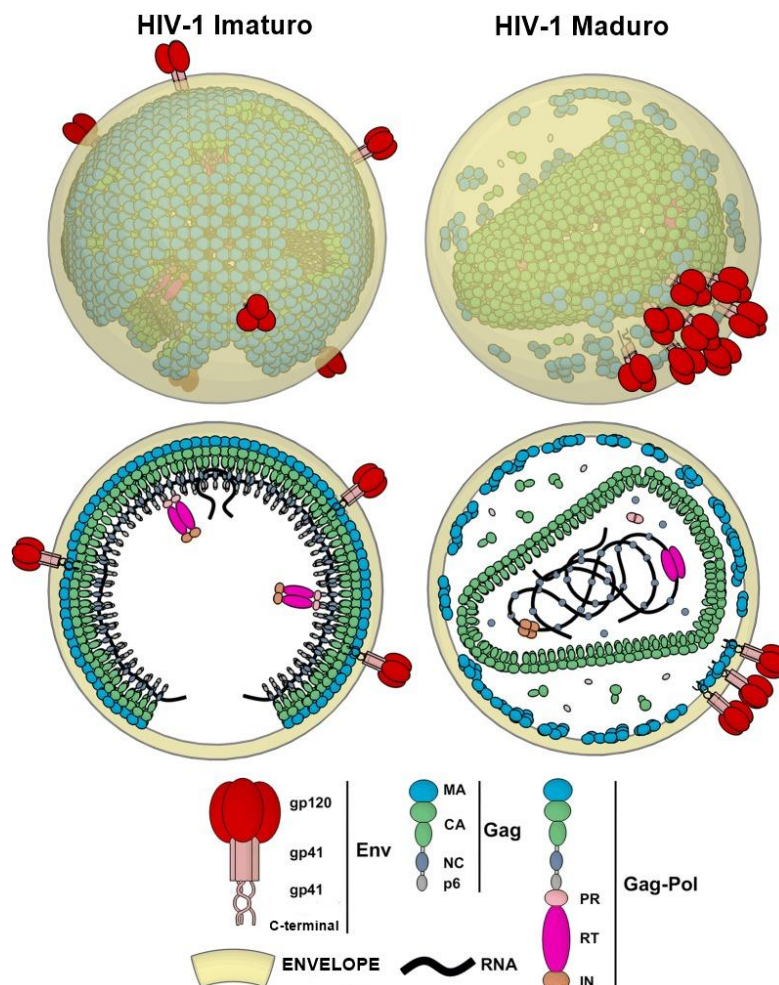
A região 5'LTR codifica para a transcrição das proteínas virais, a partir dos nove genes dispostos em sua extensão. Seguindo na direção 5'-3', o gene *gag* sintetiza quatro destas (p17, p24, p6 e p7), enquanto a ORF adjacente *gag-pol* é responsável pela síntese das enzimas essenciais ao ciclo viral, a transcriptase reversa, a protease e a integrase; o gene *env* é responsável pela produção das proteínas do envelope viral (gp120 e gp41). Somado a estes, os genes *tat* e *rev* produzem proteínas regulatórias do vírus, enquanto os demais genes são responsáveis pela síntese de proteínas acessórias (*vif*, *vpr*, *nef*, *vpu*), que atuam de forma direta na regulação, infecção e patogenicidade. A presença do gene *vpx* no genoma do HIV-2 em substituição ao gene *vpu* é um dos pontos de diferença entre eles, a qual se atribui uma menor patogenicidade na infecção pelo HIV-2 (FOLEY et al., 2018; LI; DE CLERCQ, 2016).

Considerando aspectos regulatórios, o transcrito primário do HIV-1 passa por sucessivos mecanismos de *splicing*. Estes processos podem ser classificados em três tipos, de acordo com o tamanho do RNAm formado: um de 9 kb completo, iniciado pela ORF *gag-pol* e que é também utilizado como genoma viral, um RNAm de 4 kb contendo íntrons, responsável por abrigar os genes *vif* e *vpr* e uma região bicistrônica *env-vpu*, e por fim, uma sequência de 2 kb sem íntrons, contendo os genes *tat*, *rev* e *nef*. Desta forma, o rearranjo entre eles pode gerar mais de 50 isoformas de transcritos, de modo a assegurar uma expressão balanceada das proteínas regulatórias virais (SERTZNIG et al., 2018).

### 2.2.3 Aspectos Morfológicos

O HIV-1 é um vírus esférico (Figura 6), medindo cerca de 100 nm de diâmetro, envolvido pelo envelope viral, constituído de uma bicamada lipídica derivada da membrana da célula hospedeira. Por sua vez, este envelope contém em sua superfície estruturas denominadas *spikes*, que são estruturadas em trímeros glicoproteicos, formando a gp120 e gp41. As unidades triméricas da proteína gp120 são ancoradas na superfície das células a partir de trímeros da glicoproteína transmembranar gp41, que interagem entre si de forma não-covalente, atuando diretamente no processo de reconhecimento celular e de ancoragem da partícula viral à membrana da célula. Abaixo do envelope ainda é possível observar uma estrutura denominada matriz p17, responsável por auxiliar o complexo gp120-gp41 e fornecer sustentação ao capsídeo viral (GERMAN ADVISORY COMMITTEE BLOOD, 2016).

Figura 6 – Estrutura morfológica do HIV-1 imatura e madura, exibindo a composição da bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, demonstrando os produtos dos genes Env, Gag e Gag-Pol com seus respectivos domínios.



**Fonte:** Adaptado de Chojnacki and Eggeling (2018). Na partícula madura, evidencia-se no centro do nucleocapsídeo o material genético do vírus, composto por duas moléculas de RNA fita simples.

Gp120 – glicoproteína 12-; gp41 – glicoproteína 41; MA – matriz; CA – capsídeo; NC – nucleocapsídeo; PR – protease; RT – Transcriptase Reversa; IN – Integrase.

O capsídeo ou nucleocapsídeo, definidos morfológicamente na forma madura da partícula viral, é constituído por uma matriz proteica denominada matriz p24. Este tem por função albergar o genoma viral, constituído por duas fitas de RNA, comuns aos retrovírus. Além disto, se encontram dentro do nucleocapsídeo duas proteínas denominadas p6 e p7, estando esta última ligada a formação do complexo nucleocapsídeo-RNA, garantindo estabilidade ao RNA viral. Por fim, se encontram as proteínas fundamentais ao ciclo viral, responsáveis pela formação do DNA pró-viral, a TR, a integrase (I), responsável por integrar o DNA pró-viral ao genoma da célula



hospedeira, e a protease (P), responsável pela maturação das partículas virais recém-formadas (CAMPBELL; HOPE, 2015; NOVIKOVA et al., 2019).

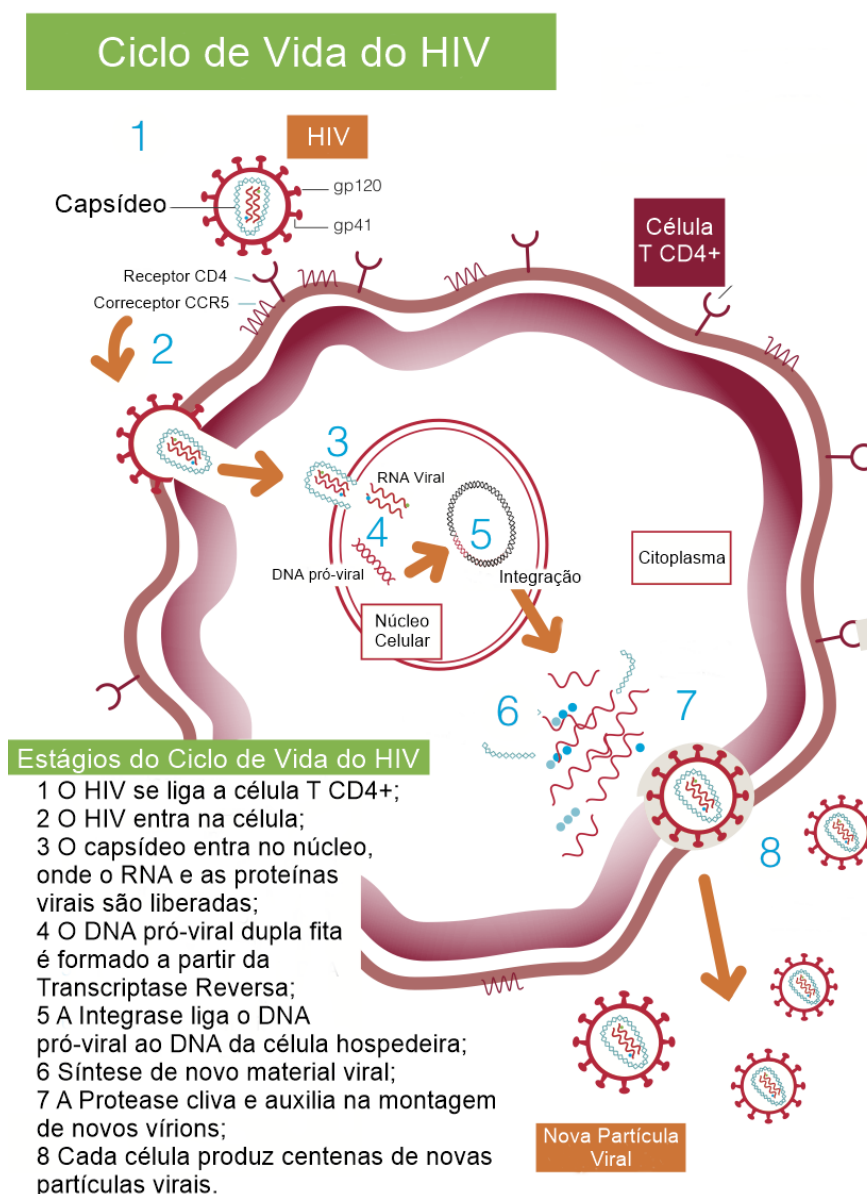
#### **2.2.4 Ciclo Viral**

Uma vez adentrando o organismo hospedeiro, o HIV-1 entra em contato com células do sistema imunológico residentes nos tecidos, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4+ – este último tipo celular mais susceptível à infecção – dando início a replicação viral. O ciclo replicativo se dá em sete etapas: adsorção/entrada (1), desnudamento (2), transcrição reversa (3), integração (4), síntese proteica (5), morfogênese (6) e brotamento (7), sendo as etapas iniciais marcadas pela ampla interação proteína-proteína (Figura 7) (LEE, 2015).

O primeiro passo da adsorção se dá a partir da interação entre a molécula CD4 presente na membrana da célula hospedeira e a glicoproteína gp120 presente no envelope viral. Esta conexão expõe os domínios da gp120, dentre eles, o domínio v3, essencial na interação do HIV-1 com receptores de quimiocinas adjacentes à molécula CD4, o CCR5 e o CXCR4, atuando como correceptores para a entrada do vírus na célula. Esta ligação aumenta a adesão entre a partícula viral e a membrana celular, promovendo alterações conformacionais no complexo gp120-gp41, que exibe em consequente uma região contendo o peptídeo de fusão, promovendo a completa ligação entre o vírus e a membrana da célula a ser infectada (PANDEY; CHOUHAN; VERMA, 2017; TRISTRAM-NAGLE, 2018).

Com as membranas fusionadas, ocorre então o desnudamento, caracterizado pela entrada do capsídeo viral por meio de endocitose, com posterior liberação, por meio de alterações de pH no fagossomo, do conteúdo do capsídeo (as fitas simples de RNA e as enzimas virais) necessário as próximas etapas do ciclo. O RNA viral começa então a ser convertido em DNA dupla fita, a partir da ação da enzima transcriptase reversa, formando o DNA pró-viral, ainda no citoplasma. Em seguida, este DNA forma um complexo com a enzima integrase, migrando do citoplasma para o núcleo a partir de nucleoporos presentes na membrana nuclear. A integrase então insere o genoma do provírus no genoma da célula hospedeira, dando início ao processo de infecção persistente (BEHJA et al., 2019).

Figura 7 – Ciclo replicativo do HIV-1.



Fonte:

Adaptado de <https://i-base.info/guides/wp-content/uploads/2022/04/ART-in-pictures-April-2022.pdf>.

Acessado em 21 de junho de 2022. Após o reconhecimento inicial, ocorre a liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira, iniciando o processo de transcrição reversa. O DNA pró-viral formado é inserido no genoma celular, dando início ao processo de transcrição e tradução das proteínas virais. Em seguida inicia-se a morfogênese da nova partícula, com a migração de partículas imaturas para o meio externo, e consequente clivagem por proteases para maturação e infectividade.

A transcrição do DNA pró-viral pode ser iniciada durante o ciclo de divisão celular do hospedeiro ou a partir da região LTR presente na extremidade 5' do DNA pró-viral em células infectadas ativadas, mediada pela interação com RNA-polimerases dependente de DNA e outros fatores de transcrição. Os transcritos formados iniciam a produção de proteínas regulatórias, que vão desempenhar papel

significativo na própria transcrição viral, como a tat, que controla diretamente o tamanho e a velocidade da replicação do DNA pró-viral (LI; DE CLERCQ, 2016; TRISTRAM-NAGLE, 2018).

A etapa de morfogênese se inicia com a transposição dos RNAs formados do núcleo para o citoplasma, onde são traduzidos em cadeias polipeptídicas, dando origem as variadas proteínas virais. Em seguida, duas moléculas de RNA se juntam as proteínas necessárias ao ciclo replicativo (TR, I, P), ocorrendo a formação do novo capsídeo. Este por sua vez se direciona para a membrana plasmática, onde a partir de interações entre as proteínas responsáveis pela formação da matriz estrutural do vírus e as glicoproteínas virais inseridas na membrana da célula hospedeira dão início ao processo de brotamento das novas partículas, cerca de 24h após a infecção da célula. Todas estas etapas passam pela ação das proteases virais, clivando as cadeias polipeptídicas produzidas e transformando, já no espaço extracelular, as partículas recém-formadas na sua forma madura, capazes de promover a infecção de novas células (FREED, 2015; MAILLER et al., 2016).

### **2.2.5 Vias de Transmissão do HIV-1**

A entrada do vírus no organismo se dá através de áreas de mucosa e/ou inoculação percutânea. A infecção ocorre a partir do contato destas regiões com fluidos biológicos potencialmente infectantes, como sêmen ou líquido pré-seminal, secreção vaginal ou retal, além do leite materno e sangue e derivados. Desta forma, é possível agrupar as vias de transmissão do HIV em vias de contato sexual, via sanguínea e a transmissão vertical ou materno-fetal. Os riscos da transmissão são dependentes de alguns fatores, sendo alguns destes a carga viral dos indivíduos, a contagem de células T CD4+, a presença de coinfeções e ainda a idade gestacional, especificamente na transmissão materno-infantil (KARIUKI et al., 2017; SHOWA; NYABADZA; HOVE-MUSEKWA, 2019).

O contato sexual desprotegido é a principal via de transmissão do HIV-1 até os dias atuais, decorrendo de microfissuras que podem ser geradas durante o ato sexual, tornando a mucosa susceptível à infecção pelos fluidos genitais contaminados. A relação heterossexual é responsável pela maior parte das infecções atualmente, onde mulheres apresentam-se mais susceptíveis que homens. Porém, aponta-se ainda que o risco de transmissão entre relações homossexuais pode ser 19 vezes maior na comparação com a relação heterossexual, com maior incidência entre indivíduos

receptivos comparados àqueles insertivos (CHIBAWARA et al., 2019; JIANG; SU; BORNÉ, 2020).

A transmissão pelo sangue se dá corriqueiramente pelo compartilhamento de seringas e agulhas infectadas, destacando-se indivíduos usuários de drogas injetáveis (UDI), transfusões sanguíneas sem triagem adequada para HIV e ferimentos com materiais perfurocortantes. A via sanguínea se apresenta como a mais potencialmente infectante, sendo requeridas menos partículas virais para a contaminação quando comparada a outras vias de infecção como a sexual, por exemplo. Além disto, um aumento da possibilidade da contaminação por outros patógenos associados como os vírus das Hepatites B e C – constituindo os chamados *blood-borne viruses* – aumenta o risco de progressão da infecção pelo HIV em UDIs, sendo requeridas testagens em paralelo nos serviços de saúde para um melhor controle de coinfeções nestes indivíduos (DES JARLAIS et al., 2016; PFAENDER et al., 2016).

A infecção materno-fetal ou transmissão vertical é caracterizada pela passagem do HIV da mãe para o filho, podendo ocorrer durante a gestação, o parto ou ainda na amamentação, constituindo a principal forma de contaminação pelo vírus em crianças. Estima-se que a infecção seja passível já a partir do primeiro trimestre gestacional, sendo observado na maioria dos casos que o período crítico decorre no último trimestre ou durante o parto. Um fator crucial nesta etapa é a carga viral, onde elevados níveis são capazes de induzir o processo de transmissão ainda no útero, diminuindo assim as chances do nascimento de crianças não-infectadas. Adicionalmente, cerca de 30% a 50% deste tipo de contaminação decorre da amamentação quando medidas profiláticas e terapêuticas corretas não são seguidas (ALESSANDRA BICK et al., 2017; VALDÉS RUBIO; GUIÑEZ GAHONA, 2015).

Estratégias vêm sendo amplamente difundidas na tentativa de controle da transmissão. Dentre estas, o acesso à TARV, o uso de preservativos, e mais recentemente a PrEP, têm reduzido a taxa de infecção entre casais sorodiscordantes e homens gays e homens que fazem sexo com outros homens; o parto normal de mães com correto acompanhamento pré-natal e com carga viral indetectável nos exames recorrentes à gestação também tem se tornado realidade em alguns países, com perspectivas de seguimento em regiões africanas de infecção concentrada (COHEN, 2019; KASSA, 2018; RODGER et al., 2019).

### 2.2.6 Patogênese Viral

O contexto da patogênese do HIV é caracterizado por aspectos decorrentes da interação patógeno-hospedeiro, dentre eles, o tipo de cepa viral e o tropismo destas que são dependentes da ligação com os correceptores de membrana e ditam a progressão da infecção. Desta forma, as cepas virais que interagem com o correceptor CCR5 são ditas cepas R5, enquanto as cepas X4 são denominadas a partir da sua ligação com o correceptor CXCR4 (HE; WU, 2019).

De acordo com o tropismo do HIV-1, este pode ser classificado em tropismo M, caracterizado pela infecção de monócitos, macrófagos e linfócitos circulantes, estando associado as cepas R5 nas fases iniciais da infecção. O tropismo T, é responsável pela infecção de precursores linfoides por cepas X4, emergindo em 50% dos indivíduos infectados sem TARV, associado a uma acelerada progressão para a AIDS; no caso de HIV-2, as fases iniciais são constituídas por cepas com este tipo de tropismo. Por fim, o tropismo M-T ocorre quando ambas as cepas podem ser observadas e ambas as populações celulares acabam por ser infectadas concomitantemente (ARIF et al., 2017; CASADELLÀ et al., 2017).

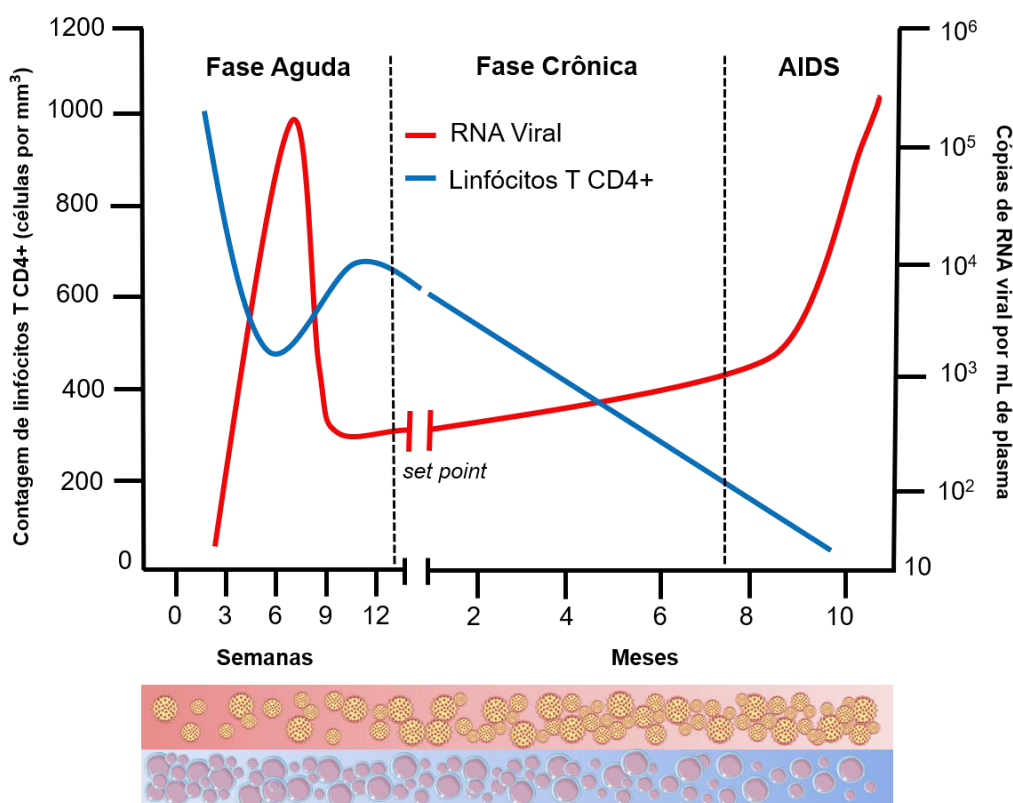
Instantes após o contato com o vírus, inicia-se o processo de resposta imune local, fazendo com que macrófagos, células dendríticas e linfócitos residentes nos tecidos sinalizem para o recrutamento de células ao sítio de infecção, dando início a fase eclipse, que corresponde aos primeiros dez dias (em média) até a possível detecção de carga viral no plasma. Além disso, células apresentadoras de antígenos (APCs) infectadas migram para os linfonodos locais inicialmente, e sistêmicos posteriormente, fazendo com que este processo permita a produção persistente de vírus nos tecidos linfoides, bem como um centro germinativo viral latente, estabelecendo o processo de infecção viral (DEEKS et al., 2015; SAHANI; YASHI, 2018).

O início da fase aguda, cerca de 21 a 28 dias após a infecção, é caracterizado por uma alta taxa de replicação viral, seguido de uma acelerada depleção de células T CD4+ circulantes, dada a amplitude da infecção sistêmica. Esta fase é caracterizada por um aumento de antígeno p24 no sangue. A sintomatologia observada não apresenta nenhuma característica que possa diferenciar de outros processos infecciosos virais comuns, podendo ser observados sintomas como febre,

linfadenopatia, dor de garganta, fadiga, dor muscular, dentre outros, que permanecem por 2 a 6 semanas (MANOTO et al., 2018; PAREKH et al., 2019).

A fase crônica ou assintomática é determinada pelo *set point* da infecção, momento em que há uma estabilidade da replicação viral em decorrência da resposta imune gerada, entrando o vírus num estágio de latência. Esta reação imunológica ao HIV-1 desempenha um controle parcial da infecção, ocorrendo inicialmente pela atividade citotóxica das células T CD8+. Posteriormente, anticorpos são gerados contra as glicoproteínas do envelope viral e o antígeno p24. Porém, com os rápidos mecanismos de escape virais, a resposta imune passa a ser ineficaz, com uma consequente progressão para a AIDS (Figura 8). Acredita-se que o período entre a primo-infecção e alcançar o estágio de AIDS seja de aproximadamente dez anos, variando de acordo com cada caso (KONG et al., 2019; ROBB; ANANWORANICH, 2016).

Figura 8 – Patogênese Viral.



Fonte: Elaborado pelo Autor 2022. A fase aguda é caracterizada pelo rápido aumento da replicação viral, seguido de uma depleção das células T CD4+. O set point marca o ponto em que há um controle da infecção, mediado pelo desenvolvimento de uma resposta imune humoral pelo hospedeiro, levando à entrada na fase crônica. Por sua vez, esta pode durar anos até, quando não tratada, levar o indivíduo ao estágio de AIDS.

A AIDS é o estágio final da progressão da infecção pelo HIV-1 em indivíduos não tratados, sendo caracterizada por uma alta viremia, e uma depleção severa das células T CD4+, chegando ao quantitativo de 200 células por mm<sup>3</sup> de sangue. Os indivíduos apresentam-se debilitados e susceptíveis as coinfeções por agentes oportunistas, a exemplo do *Pneumocystis sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* e *Cytomegalovirus*, além de algumas neoplasias, como o Sarcoma de Kaposi, o linfoma não-Hodgkin e o linfoma de células B, podendo vir a óbito em decorrência de complicações destas causas associadas a AIDS (GERMAN ADVISORY COMITEE BLOOD, 2016; MANOTO et al., 2018).

### 2.2.7 Diagnóstico do HIV-1

O diagnóstico pode ser determinado a partir da detecção direta do HIV, onde são utilizados o RNA viral ou antígenos liberados no curso da infecção, ou ainda por anticorpos IgM e IgG produzidos durante a patogênese viral, através do sangue total, plasma, soro ou fluido oral, a depender do tipo de teste direcionado. O desenvolvimento de técnicas ao longo dos anos que apresentassem adequadas sensibilidade e especificidade tem por objetivo a diminuição do tempo de janela imunológica dos indivíduos, período que compreende o início da infecção e a soroconversão passar a ser detectada pelos exames laboratoriais (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2018; PAREKH et al., 2019).

Os testes iniciais utilizados no diagnóstico do HIV podem ser agrupados de 1ª a 4ª geração, por meio imunoensaios (IE) do tipo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Devido a ampla variedade da resposta no panorama da infecção, outros testes complementares são utilizados para a confirmação dos testes iniciais. Assim o diagnóstico é determinado a partir da realização de testes imunoenzimáticos, seguidos da confirmação por Western-Blot (WB), Imunoblot (IB), Imunoblot rápido (IBR), Imunofluorescência indireta (IFI) ou testes moleculares (TM). A depender do tempo de infecção, os testes aplicados podem apontar resultados falso-negativos, sendo o direcionamento do melhor exame para cada fase determinado pela classificação de estagiamento Fiebig (Tabela 2) (KONG et al., 2019; PAREKH et al., 2019).

Na prática laboratorial, os testes de 3ª geração são utilizados para o diagnóstico de infecção recente, seguido por testes moleculares para a confirmação diagnóstica. Já a infecção crônica, é determinada a partir dos testes de 3ª e 4ª geração, seguido

de algum dos demais testes confirmatórios (WB, IB, IBR, IFI ou TM). Estes testes de última geração são mais utilizados por apresentarem uma maior especificidade e sensibilidade que as de 1ª e 2ª, com a possibilidade de detecção de interações antígeno-anticorpo, bem como a detecção do anticorpo isolado, seja ele IgM ou IgG e tempos de janela diagnóstica mais curtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2018; RUTSTEIN et al., 2017).

Tabela 2 – Classificação de Fiebig para estagiamento laboratorial da infecção recente pelo HIV-1.

Estágio	Marcador				IC 95%	
	RNA	p24	IE*	WB	Individual (dias)	Cumulativo (dias)
0	-	-	-	-	10 (7-21)	10
I	+	-	-	-	7 (5-10)	17
II	+	+	-	-	5 (4-8)	22
III	+	+	+	-	3 (2-5)	25
IV	+	+/-	+	Ind	6 (4-8)	31
V	+	+/-	+	+(-p31)	70 (40-122)	101
VI	+	+/-	+	+(+p31)	Sem limite de duração	Sem limite de duração

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde/Brasil (2018).

\*correspondente aos testes de 3ª e 4ª geração

IE – Imunoensaios; WB – *Western Blot*; ind – indeterminado; IC – Intervalo de Confiança

Além destes testes laboratoriais, o desenvolvimento de Testes Rápidos (TR) para a detecção do vírus ampliou a abordagem diagnóstica e a acessibilidade a tais testes. Os TR utilizam a técnica de imunocromatografia, e fornecem aos indivíduos o resultado em cerca de 20 a 30 minutos, uma considerável vantagem em comparação aos demais imunoensaios. Quanto aos critérios de determinação diagnóstica, a sensibilidade deste teste ainda é menor quando comparado aos IE, aspecto atribuído ao baixo tempo de incubação, enquanto a especificidade é bem avaliada, por uma maior concentração de antígeno na fase estacionária, direcionando este tipo de teste para uma triagem diagnóstica na infecção pelo HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 2018; PAREKH et al., 2019).

A aplicação de testes que apresentem uma boa sensibilidade e especificidade, alinhado a um rápido diagnóstico dos indivíduos infectados, tem trazido boas melhorias no contexto HIV/AIDS. Uma vez que fatores como a carga viral plasmática e a contagem de células T CD4+ exercem influência direta, as diretrizes atuais dos



órgãos de saúde determinam que indivíduos diagnosticados e confirmados devem iniciar o tratamento de imediato, independente da quantificação destes parâmetros. Dessa forma, o diagnóstico nos estágios iniciais tem proporcionado ao longo dos anos um maior alcance do sucesso terapêutico, fornecendo uma melhor qualidade de vida e um controle da progressão da doença nas PVHIV (GIROIR, 2020; PRABHU; HARWELL; KUMARASAMY, 2019).

## 2.3 Antirretrovirais (ARV)

### 2.3.1 Terapia Antirretroviral

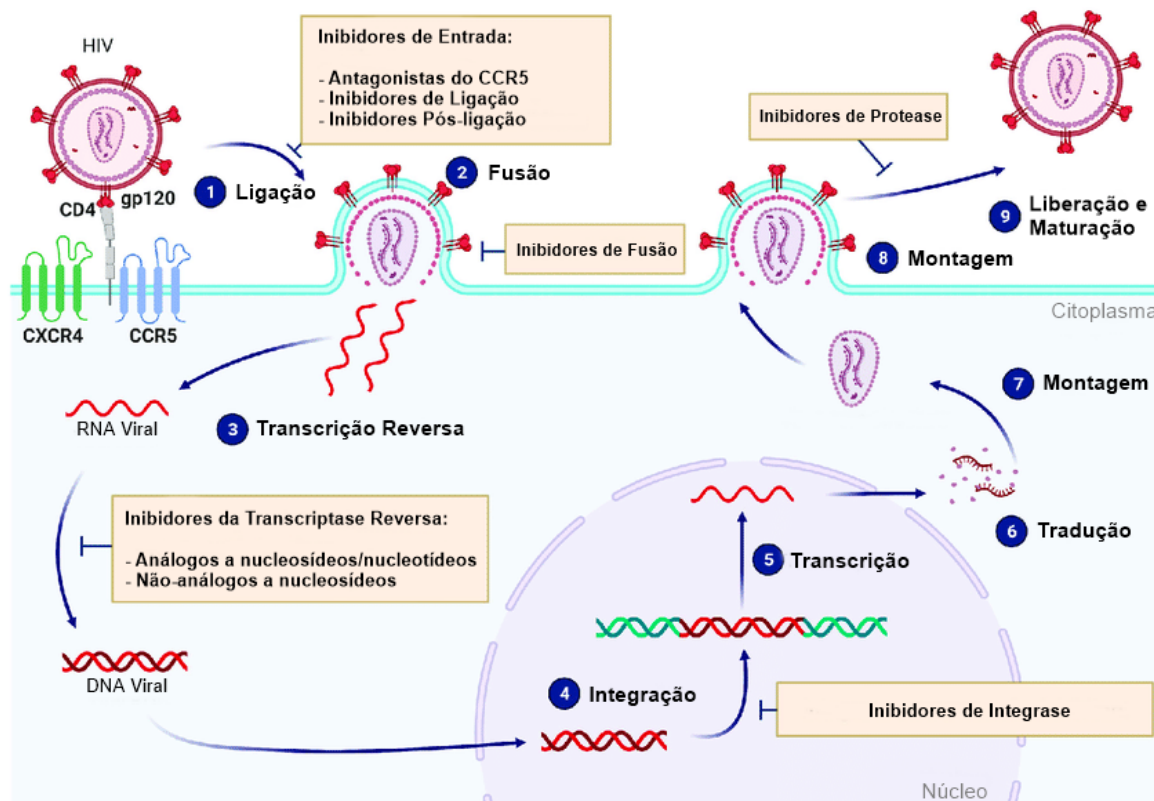
Segundo recomendações da OMS – adotadas também pelo Ministério da Saúde do Brasil – desde 2015 a TARV deve ser iniciada logo após o diagnóstico confirmado da infecção pelo HIV-1, independente da contagem de células T CD4+, como determinavam os protocolos anteriores, de modo a se obter uma boa resposta terapêutica precocemente (*test and treat*). A TARV é administrada numa combinação de três drogas, de modo a tentar reduzir as mutações de resistência, antes observadas no esquema de monoterapia ou diterapia, tendo este tipo de esquema proporcionado uma boa adesão dos indivíduos que fazem uso, bem como uma boa eficácia de modo geral (PRABHU; HARWELL; KUMARASAMY, 2019; WHO, 2020).

No mercado farmacêutico, estão disponíveis mais de 40 medicamentos antirretrovirais em formulações individuais e/ou combinadas (dupla ou tríade), tendo como alvo principal a diminuição da carga viral plasmática, com uma consequente recuperação de células T CD4+, uma vez que menos destas estarão sendo infectadas. Estes fármacos têm por alvo o bloqueio das etapas da replicação viral, estando distribuídos em seis classes diferentes, de acordo com o ponto inibitório no ciclo, sendo elas (Figura 9) (KEMNIC; GULICK, 2020; VITORIA et al., 2019):

- Antagonistas de CCR5: bloqueia o correceptor CCR5, impedindo a entrada da partícula viral na célula.
- Inibidores de Fusão: ligam-se à proteína gp41, impedindo a fusão do vírus na membrana da célula hospedeira.
- Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa: são análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos que interrompem a síntese do material genético do vírus.

- Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INNTR): impedem a síntese do material genético do vírus por se ligarem a sítios alostéricos da transcriptase reversa, inibindo sua atividade.
- Inibidores de Integrase: impedem a integração do DNA pró-viral ao genoma do hospedeiro.
- Inibidores de Protease (IP): se ligam a protease viral e bloqueiam a clivagem proteolítica necessária para a maturação das novas partículas.

Figura 9 – Etapas de bloqueio da terapia antirretroviral (TARV).



Fonte: Adaptado de Benedicto et al. 2021. Etapas de bloqueio da terapia antirretroviral (TARV).

Elencam-se os principais pontos de ação dos antirretrovirais de acordo com suas respectivas classes, que objetivam impedir a entrada do vírus na célula, a conversão do RNA em DNA pró-viral, a inserção no genoma da célula hospedeira e a maturação das novas partículas formadas.

Além destas principais classes, outras duas menos comuns ainda são disponíveis, os inibidores de entrada (anticorpos monoclonais que se ligam ao CD4) e os potenciadores farmacocinéticos (que inibem a atividade da proteína CYP3A, aumentando a disponibilidade de outros fármacos antirretrovirais no plasma). As drogas antirretrovirais, em sua maioria, são administradas via oral, em comprimidos diários, com absorção via intestinal. Para que os fármacos alcancem as células-alvo em concentrações eficazes, e evitem a toxicidade no organismo, estes precisam

seguir vias de administração, distribuição, metabolização e excreção (ADME), sendo influenciada por fatores como a integridade das enzimas da via ADME, fatores genéticos, interações medicamentosas e comorbidades (ATTA; DE SEIGNEUX; LUCAS, 2019; KEMNIC; GULICK, 2020; PEARCE et al., 2017).

O protocolo de medicamentos atualmente utilizado combina como primeiro esquema dois fármacos da classe dos INTRs, e o terceiro sendo das demais classes farmacológicas. No Brasil, este esquema é composto pela combinação de Lamivudina (3TC) e Tenofovir (TDF) com o inibidor de integrase Dolutegravir (DTG), podendo este último ser alterado de acordo com algumas condições como portadores de coinfeções, mulheres grávidas e indivíduos que apresentem uma baixa contagem de células T CD4+, sendo substituído pelo Efavirenz (EFV) ou Raltegravir (RAL). Desde 2017, a adição do DTG ao esquema terapêutico tem proporcionado significantes avanços, uma vez que este apresenta uma melhor tolerância associada a uma maior durabilidade a longo prazo, além de uma rápida supressão viral, com menos efeitos adversos relatados (BATISTA et al., 2019; BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a).

Desde 1996, o Brasil fornece às pessoas vivendo com HIV o acesso gratuito aos antirretrovirais, sendo um dos países pioneiros na produção destes fármacos. Atualmente, 17 medicamentos estão disponíveis pelo Sistema Único de Saúde (SUS), podendo ser apresentados em 34 formulações, como mostrado na tabela 3. Além disto, o país tem ampliado a atenção a infecção pelo HIV-1, de modo que os ARV estão sendo empregados na prevenção da contaminação. A exemplo disto, desde 2018, o Truvada, formulação combinada do TDF com a Emtricitabina (FTC), compõe a chamada Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) ao HIV-1, sendo distribuído entre os grupos-chave, constituindo a chamada prevenção combinada ao HIV, junto a métodos como o uso de preservativo e a Profilaxia Pós-Exposição (PEP) (BENZAKEN et al., 2019; BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Tabela 3 – Antirretrovirais disponíveis no SUS para PVHIV no Brasil.

Medicamento	Siglas	Posologia	Unidade de Fornecimento
Abacavir	(ABC)	300mg	Comprimido revestido
Abacavir	(ABC)	Solução oral 20mg/mL	Frasco
Atazanavir	(ATV)	300mg	Cápsula gelatinosa dura
Darunavir	(DRV)	75mg	Comprimido revestido
Darunavir	(DRV)	150mg	Comprimido revestido
Darunavir	(DRV)	600mg	Comprimido revestido
Darunavir	(DRV)	800mg	Comprimido revestido
Dolutegravir	(DTG)	50mg	Comprimido revestido
Efavirenz	(EFZ)	200mg	Cápsula gelatinosa dura
Efavirenz	(EFZ)	600mg	Comprimido revestido
Efavirenz	(EFZ)	Solução oral 30mg/mL	Frasco
Enfuvirtida	(T20)	Pó liof. injetável 90mg/mL	Frasco-ampola
Etravirina	(ETR)	100mg	Comprimido revestido
Etravirina	(ETR)	200mg	Comprimido revestido
Lamivudina	(3TC)	150mg	Comprimido revestido
Lamivudina	(3TC)	Solução oral 10 mg/mL	Frasco
Lopinavir + Ritonavir	(LPV/r)	100mg + 25mg	Comprimido revestido
Lopinavir + Ritonavir	(LPV/r)	80mg/mL + 20mg/mL	Frasco
Maraviroque	(MVC)	150mg	Comprimido revestido
Nevirapina	(NVP)	200mg	Comprimido simples
Nevirapina	(NVP)	Suspensão oral 50mg/5mL	Frasco
Raltegravir	(RAL)	100mg	Comprimido mastigável
Raltegravir	(RAL)	Granulado 100mg	Sachê
Raltegravir	(RAL)	400mg	Comprimido revestido
Ritonavir	(RTV)	100mg	Comprimido revestido
Ritonavir	(RTV)	Suspensão oral 100mg	Frasco
Tenofovir	(TDF)	300mg	Comprimido revestido
Tenofovir + Entricitabina	(TDF) + (FTC)	300mg + 200mg	Comprimido revestido
Tenofovir + Lamivudina	(TDF) + (3TC)	300mg + 300mg	Comprimido revestido
Tenofovir + Lamivudina + Efavirenz	(TDF) + (3TC) + (EFZ)	300mg + 300mg + 600mg	Comprimido revestido
Zidovudina	(AZT)	100mg	Cápsula gelatinosa dura
Zidovudina	(AZT)	Solução injetável 10mg/mL	Frasco-ampola
Zidovudina	(AZT)	Solução oral 10mg/mL	Frasco
Zidovudina + Lamivudina	(AZT) + (3TC)	300mg + 150mg	Comprimido revestido

Fonte: Disponível em <http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/hiv/tratamento>. Acessado em 05/07/2022.

Abordagens farmacogenéticas, que têm por objetivo um melhor direcionamento da resposta com base em aspectos genéticos individuais no contexto das enfermidades, também já são aplicadas na terapia anti-HIV. Indivíduos que possuem contraindicações ao TDF são direcionados à utilização do Abacavir (ABC), porém, este fármaco pode desencadear reações de hipersensibilidade em portadores da alteração HLA-B\*5701, sendo necessários testes de identificação genética para o seu uso. Assim, a observação de aspectos que podem alterar o sucesso da terapia, bem como a busca de alternativas que possam minimizar seus efeitos tem se mostrado práticos no contexto da TARV, colocando à disposição novas ferramentas para diretrizes eficazes na resposta terapêutica (VITORIA et al., 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b).

### **2.3.2 A Resposta Terapêutica: Sucesso e Falhas**

O sucesso da terapia antirretroviral é determinado com base em aspectos virológicos, imunológicos e clínicos, sendo estes precedentes uns aos outros. Apesar disto, o critério virológico segue sendo até os dias atuais o padrão ouro determinado para a análise da eficácia do esquema ao qual o indivíduo infectado está submetido. Assim, define-se como sucesso virológico a supressão da carga viral ao valor mínimo de detecção dos testes disponíveis após seis meses de terapia, com um consequente aumento no quantitativo de células T CD4+ e ausência de sinais clínicos associados à AIDS. Assim, aspectos divergentes deste padrão determinam a falha terapêutica (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017a).

A OMS determina falha virológica a detecção de carga viral plasmática, >1000 cópias/mL de plasma, em duas análises consecutivas após seis meses de uso do esquema terapêutico prescrito. No Brasil, considera-se falha terapêutica a carga viral superior a 50 cópias por mL de plasma, após seis meses de TARV ou troca de esquema, ou ainda quando se observa o chamado efeito rebote, evento em que os indivíduos sob terapia suprimem a carga viral inicialmente, mas que voltam a apresentar detecção. A confirmação da falha em todas as situações citadas deve ser realizada com exames consecutivos após quatro semanas do exame prévio (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017b, 2017a).

Diversos fatores podem explicar a ocorrência do fenômeno da falha dos antirretrovirais, podendo estar associados ao próprio indivíduo infectado, como a aderência ao tratamento por causas psicossociais e comorbidades, bem como os efeitos adversos decorrentes do tratamento e fatores genéticos; associados ao vírus, como as cepas resistentes que estabelecem uma resistência inata aos medicamentos e uma alta carga viral plasmática ao início da terapia; e aqueles associados ao próprio tratamento, como baixos padrões de farmacocinética e farmacodinâmica e interações medicamentosas (CUTRELL; JODLOWSKI; BEDIMO, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017b).

A falha virológica precede a falha clínica, que é definida pela presença de evidências que sugerem uma evolução para a síndrome após seis meses do início do uso da TARV. Este processo está interligado à ausência da recuperação imunológica destes indivíduos, uma vez que o quantitativo de células T CD4<sup>+</sup> é determinante na progressão entre as fases da patogênese viral, decorrendo, portanto, os sinais e sintomas clínicos na infecção pelo HIV a partir da depleção dos linfócitos T. É interessante destacar que nem o critério imunológico nem o clínico são fatores preditos para a troca de esquema terapêutico, uma vez que se acredita que indivíduos com carga viral suprimida possuem uma menor susceptibilidade às infecções oportunistas, e que indivíduos com infecções oportunistas e falha virológica podem ser decorrentes de uma insuficiência imune, e não de falha do esquema terapêutico (ASGEDOM et al., 2020; BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; JORAM et al., 2017).

Neste contexto, sabe-se, que entre 10 e 40% dos indivíduos que fazem uso da TARV e alcançam a supressão viral, não conseguem a recuperação nos níveis de células T CD4<sup>+</sup>. Além disso, é observado que indivíduos não respondedores imunológicos (INR, do inglês *immunological non-responders*) tendem a progredir mais rápido para a AIDS, contrariando os estudos que destacam apenas o critério virológico como fator determinante para o manejo das diretrizes relacionadas à terapia antirretroviral (GAARDBO et al., 2012; YANG et al., 2020a).

### **2.3.3 Falha na Recuperação Imune**

Considera-se não respondedor imunológico o indivíduo que após seis meses de TARV não consegue o aumento no quantitativo de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, apesar da supressão viral. A classificação dos níveis de células T CD4<sup>+</sup> que sugerem a

recuperação imune incompleta apresenta-se divergente de acordo com vários estudos. A OMS se baseia na contagem de linfócitos T CD4+ menor ou igual a 250 células/mm<sup>3</sup> de sangue após falha clínica ou níveis persistentes abaixo de 100 células/mm<sup>3</sup>. De modo geral, os estudos envolvendo a definição com base na quantificação variam entre níveis <100 células/mm<sup>3</sup> e <500 células/mm<sup>3</sup> (Corbeau and Reynes 2011; World Health Organization 2017a; Yang et al. 2020).

Os linfócitos T CD4+ são as principais células do sistema imunológico, sendo também conhecidos por linfócitos T *helper* ou auxiliares, responsáveis por mediar a resposta aos diversos patógenos com base na liberação de citocinas e quimiocinas que recrutam células de defesa para o sítio de infecção e geram a resposta inflamatória, além de atuarem como intercalantes entre a resposta imune inata e adaptativa. Sua ativação ocorre a partir da interação do receptor de célula T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*) presente na membrana do linfócito com o MHC de classe II (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) presente na membrana das células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen-presenting Cell*). Uma vez ativada, a liberação das citocinas e o direcionamento das células de defesa se dão de modo específico, podendo ser geradas diferentes respostas de acordo com o patógeno, sendo as mais comuns a T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> e T<sub>H17</sub> (FREEMAN et al., 2016; LUCKHEERAM et al., 2012).

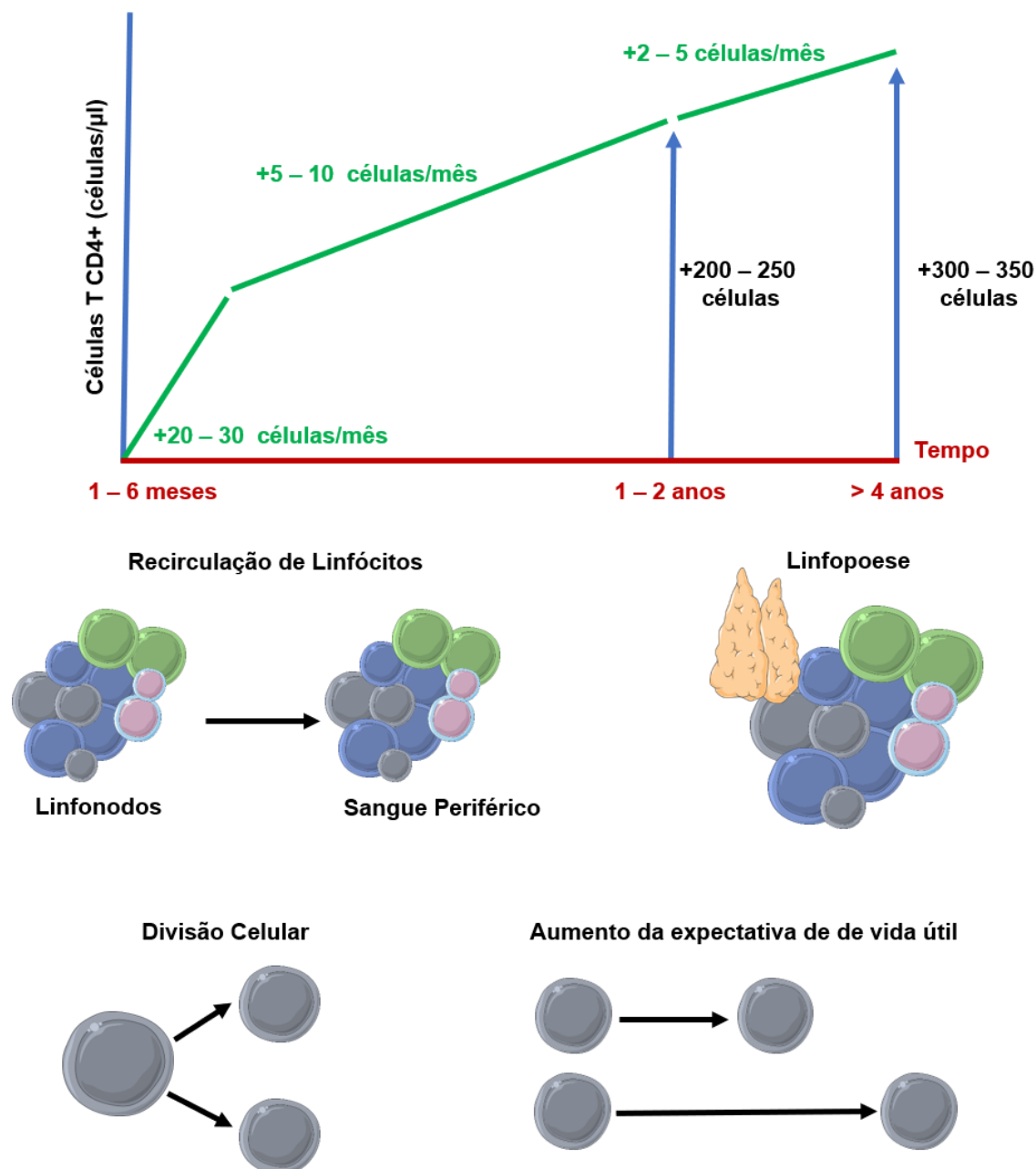
No contexto das infecções virais, a ativação das células T CD4+ desencadeiam uma resposta T<sub>H1</sub>, substancialmente mediada por Interferon (IFN), que culmina na expressão de MHC de classe I nas APCs com ligação e ativação das células T citotóxicas (T CD8+) como mecanismo efetor no combate à infecção, além de estimular a diferenciação em células T auxiliares foliculares (T<sub>FH</sub>), que atuam estimulando as células B a se diferenciarem e produzirem anticorpos. Em casos de infecções persistentes, é descrito que células T CD4+ diminuem sua capacidade de gerar citocinas que medeiam a resposta T<sub>H1</sub> por exposição constante ao antígeno nas fases iniciais, prejudicando também as células T CD8+ efetoras. Por fim, a constante ativação do TCR também faz com que as populações de células T CD4+ que induzem a resposta T<sub>H1</sub> se transformem em células T<sub>FH</sub>, reduzindo a eficiência da resposta (SANT; MCMICHAEL, 2012; SWAIN; MCKINSTY; STRUTT, 2012; YAMADA et al., 2016).

No decorrer da infecção pelo HIV-1, o início da baixa no quantitativo das células T CD4+ ocorre com a morte inicial de linfócitos residentes nos tecidos mucosos, seguido pela migração do vírus para os tecidos linfoides pela corrente sanguínea, atingindo as variadas populações de linfócitos, sobretudo as populações de células T de memória, até o estabelecimento da latência. Com a progressão desta destruição, os indivíduos evoluem ao comprometimento do sistema imune. A partir da utilização da TARV, porém, este processo tende a ser controlado, de modo que a destruição de células T CD4+ permanece reduzida, e a recuperação progressiva seja mediada por alguns eventos biológicos como a recirculação dos linfócitos, a linfopoese, o aumento da divisão celular e o aumento do tempo de vida útil dos linfócitos, de modo que os indivíduos sejam bons respondedores imunológicos (IR, do inglês *immunological responders*) (Figura 10) (CORBEAU; REYNES, 2011a; STRUTT; MCKINSTRY; SWAIN, 2011; VIDYA VIJAYAN et al., 2017).

Porém, nos indivíduos INR este processo não ocorre da maneira esperada. Inicialmente, os mecanismos celulares de recuperação imunológica não seguem o mesmo padrão de eficácia, como mostrado na figura 11, de modo que a perda de células reduz a variabilidade de reconhecimento antigênico pelos linfócitos. Junto a isso, a deficiência da recuperação imune apresenta-se num espectro multifatorial, estando associada a fatores, como a replicação residual, o tropismo viral, coinfeções, imunosenescência, a produção de citocinas que atuam na homeostase das células linfoides (a exemplo da IL-15, IL-2, IL-7, IL-6), disfunção tímica e medular, ativação imune, polimorfismos genéticos em genes moduladores do sistema imune, o sexo, a presença de translocação microbiana, o próprio esquema antirretroviral, dentre outros (CARVALHO-SILVA et al., 2020a; YANG et al., 2020a).



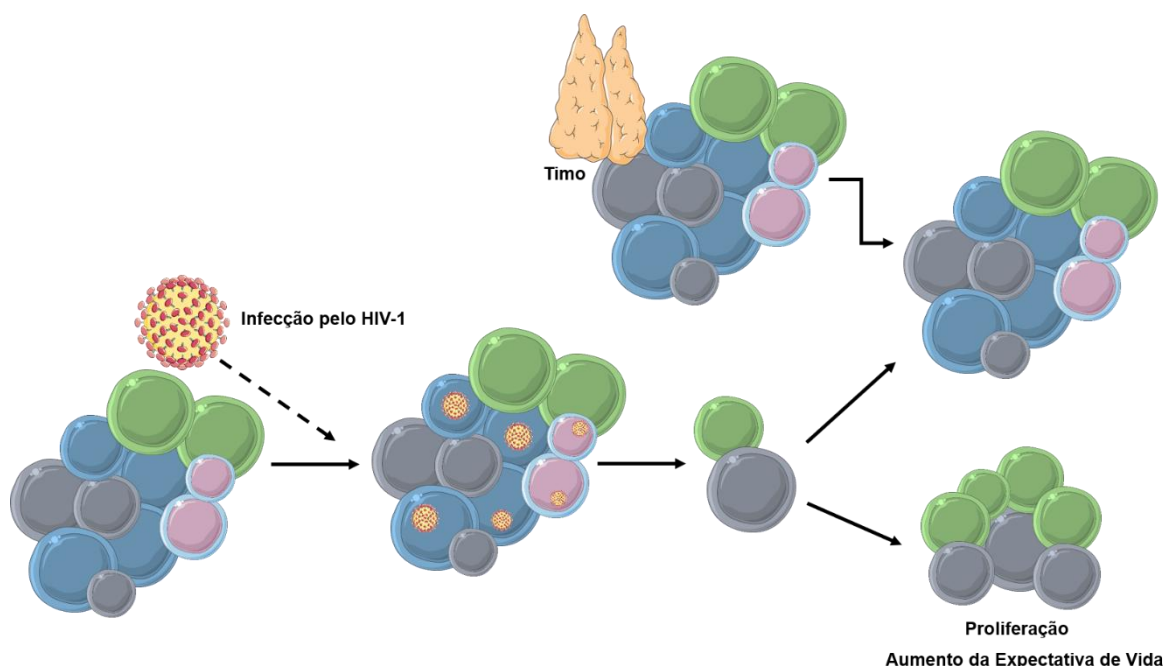
Figura 10 – Produção de Células T CD4+ durante a TARV.



Fonte: Adaptado de Corbeau and Reynes (2011). Após a introdução da TARV, os indivíduos tendem a recuperar o quantitativo de células T CD4+ por diversos mecanismos, como a recirculação dos linfócitos, estímulo a linfopoese e a divisão celular, além do aumento do tempo de vida útil das células. Este processo é dividido em três etapas, onde a primeira fase aumenta-se 20 – 30 células por mês, na segunda, de 5 a 10 células e na terceira, 2 a 5 células por mês.

Assim, o caráter do desenvolvimento da resposta imune durante a infecção pelo HIV-1 se apresenta bastante diversificado, onde todos os fatores podem ser agrupados em dois tópicos centrais: aqueles ligados a baixa síntese de novos linfócitos T CD4+ e os relacionados com a destruição exacerbada destas células, mecanismo denominado *tap and drain* (MCHUGH, 2018; YANG et al., 2020a).

Figura 11 – Perda da variabilidade de reconhecimento antigênico a partir da disseminação da infecção nos órgãos linfoides.



Fonte: Adaptado de Corbeau and Reynes (2011). Após o estabelecimento da infecção, o repertório de linfócitos tende a ser diminuído pela destruição de células no curso da invasão aos tecidos linfoides, deprimindo, assim, a variabilidade da eficácia da resposta imune dos indivíduos acometidos.

No contexto da morte celular durante a infecção pelo HIV-1, acreditava-se inicialmente que esta acontecia por um efeito citopático programado da célula, mediado pela ativação de moléculas pertencentes a via da morte celular por apoptose. Este processo, por sua vez, decorreria a partir da interação de proteínas regulatórias que induzem a ativação de fatores de transcrição na célula hospedeira. Atualmente, sabe-se que a apoptose desempenha um papel coadjuvante na perda massiva dos linfócitos T CD4+, onde esta perda ocorre a partir de um outro processo de morte celular programada denominado piroptose (DANTHI, 2016; DOITSH et al., 2014; FÉVRIER; DORGHAM; REBOLLO, 2011).

## 2.4 PIROPTOSE

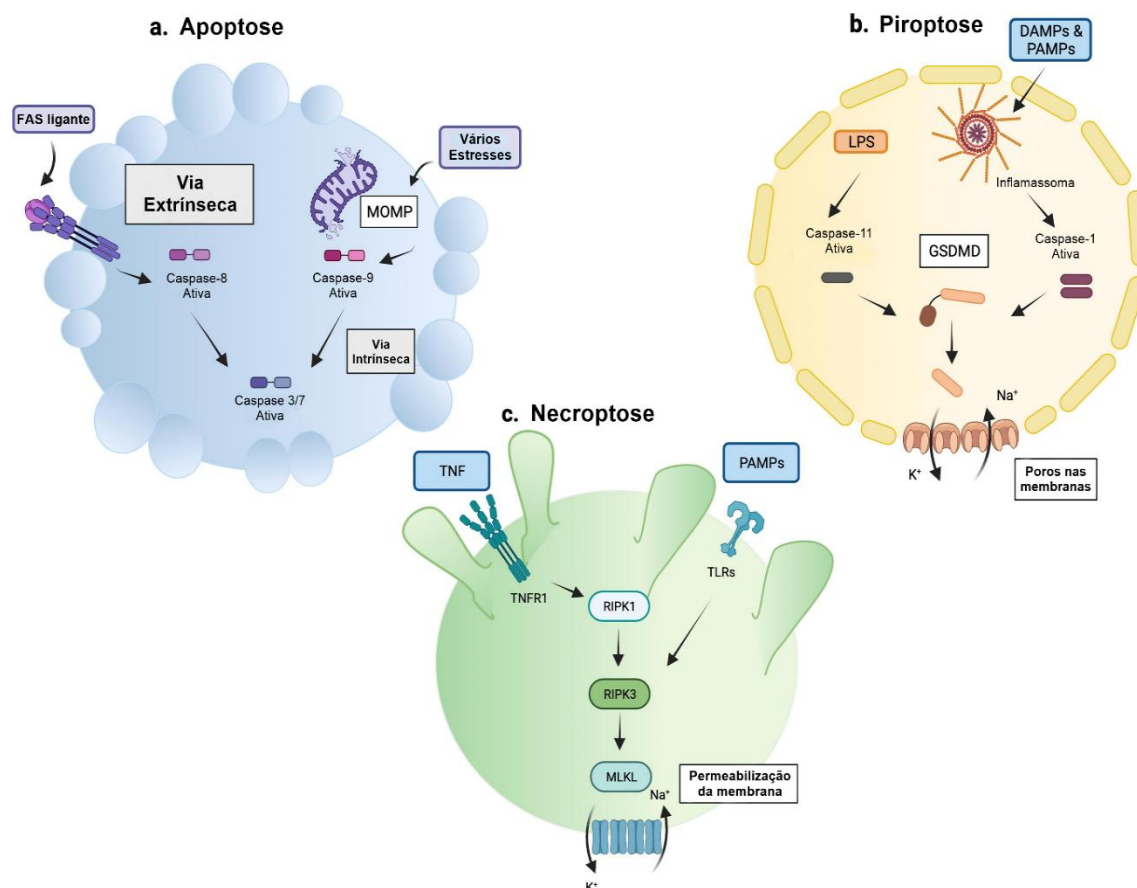
### 2.4.1 Piroptose, uma via de morte celular altamente inflamatória

A piroptose se apresenta como uma via de morte celular programada altamente inflamatória, atuando como um eficiente mecanismo da imunidade inata em infecções contra patógenos intracelulares. A descoberta da piroptose se deu em meados de 1992, a partir da observação da morte de macrófagos infectados com *Shigella* que mesclava características de apoptose e necroptose, mas que possuíam aspectos peculiares, onde a interação com o patógeno induzia a produção de citocinas pró-

inflamatórias, inchaço na célula, formação de poros e a consequente destruição celular. Porém, o termo piroptose só foi estabelecido em 2001 por Brad T. Cookson e Brennan, a partir de seus experimentos com macrófagos infectados por *Salmonella*, sendo derivado do grego, onde “piro” é direcionado a fogo, e “ptose” significa queda, remetendo assim a morte da célula mediada por uma elevada inflamação (COOKSON; BRENNAN, 2001; LU et al., 2020).

Além das características morfológicas divergentes entre a piroptose e as outras vias de morte celular programada (Figura 12), o aspecto molecular apresenta a ativação das caspases como ponto chave para a diferenciação, sendo a ativação destas ausente na necroptose e presente na apoptose, porém decorrendo por tipos diferentes de caspases. As caspases (do inglês, *cysteine-aspartic-acid-protease*) são proteases de cisteína intracelulares, sendo expressas em diversas populações celulares – imunes e não imunes – e produzidas na forma zimogênica de procaspases. Estas são clivadas em duas subunidades ativas, a p10 e a p20, ligadas de forma não-covalente. A clivagem da região efetora da pró-caspase resulta na formação de diversas subunidades que ampliam a sua atividade enzimática, culminando na ativação das proteínas alvo a partir da interação com um resíduo de ácido aspártico (KESAVARDHANA; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2020; MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017).

Figura 12 – Características das mortes celulares por apoptose, necroptose e piroptose.



Fonte: Adaptado de Ketelut-Carneiro and Fitzgerald (2022). As características morfológicas e moleculares variam entre os diferentes mecanismos de ativação de morte celular, caracterizando-as e diferenciando-as nos processos de infecção dos diferentes patógenos.

Com base nas funções fisiológicas, as caspases podem ser classificadas em dois grupos: àquelas voltadas à iniciação (caspase-2; caspase-8; caspase-9; caspase-10) e execução (caspase-3; caspase-6; caspase-7) da apoptose, e as que conseguem desencadear um mecanismo inflamatório na célula, sendo descritas as caspases -1, -4, -5, -11 e -12. Por sua vez, a ativação das caspases a partir da piroptose pode ser mediada por duas vias: a via canônica, a partir da ativação da caspase-1 (também denominada via caspase-1 dependente), e a via não canônica, que diz respeito a ativação da piroptose a partir das caspases -4 e -5 nos humanos e -11 em modelos murinos (BOUCHER; CHEN; SCHRODER, 2016; MCKENZIE; DIXIT; POWER, 2020).

A ativação da via canônica da piroptose é iniciada a partir da interação com sensores citoplasmáticos que atuam como receptores (PRR, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Estes

sensores constituem uma família de moléculas denominadas inflamassomas, que são complexos multiproteicos fortemente reticulados mantidos por interações entre domínios proteicos conservados. São reconhecidos e descritos três grupos distintos principais de inflamassoma, os NLRs (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*, os ALRs (do inglês, *absent in melanoma 2 (AIM2)-like* e os *pyrin inflamassome* (KESAVARDHANA; KANNEGANTI, 2017; KESAVARDHANA; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2020).

As diferenças entre estes grupos variam tanto estruturalmente, como também de acordo com a natureza da molécula indutora do reconhecimento pelos PRRs. Dentro dos NLRs, podem ser observados dois grupos que possuem domínios de ligação diferentes, os NLRP (sendo bem descritos o NLRP1 e o NLRP3) que possuem um domínio de pirina (PYD) e os NLRCs (destacando-se o NLRC4) formados a partir dos domínios de recrutamento de caspase (CARD). No grupo dos ALRs, dois inflamassomas são descritos, o AIM2 e o IFI16, caracterizados pela presença de um domínio PYD na região N-terminal, seguido de um (AIM2) ou dois (IFI16) domínios de repetições de resíduos de aminoácidos conservados na região C-terminal (*HIN-200 domain*). O terceiro tipo de inflamassoma é estruturalmente constituído por quatro domínios funcionais, um PYD na região N-terminal, dois domínios centrais dedos de zinco (bBox), um domínio *coiled coil* (CC) e um domínio C-terminal B30.2 / SPRY. Ademais, para que haja a ativação da caspase e o desencadeamento da piroptose, se faz necessária a presença do domínio CARD na estrutura do inflamassoma, sendo recrutado o adaptador ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-line protein containing a caspase activation and recruitment domain*) para esta atividade (HACHIM et al., 2020; LU et al., 2020).

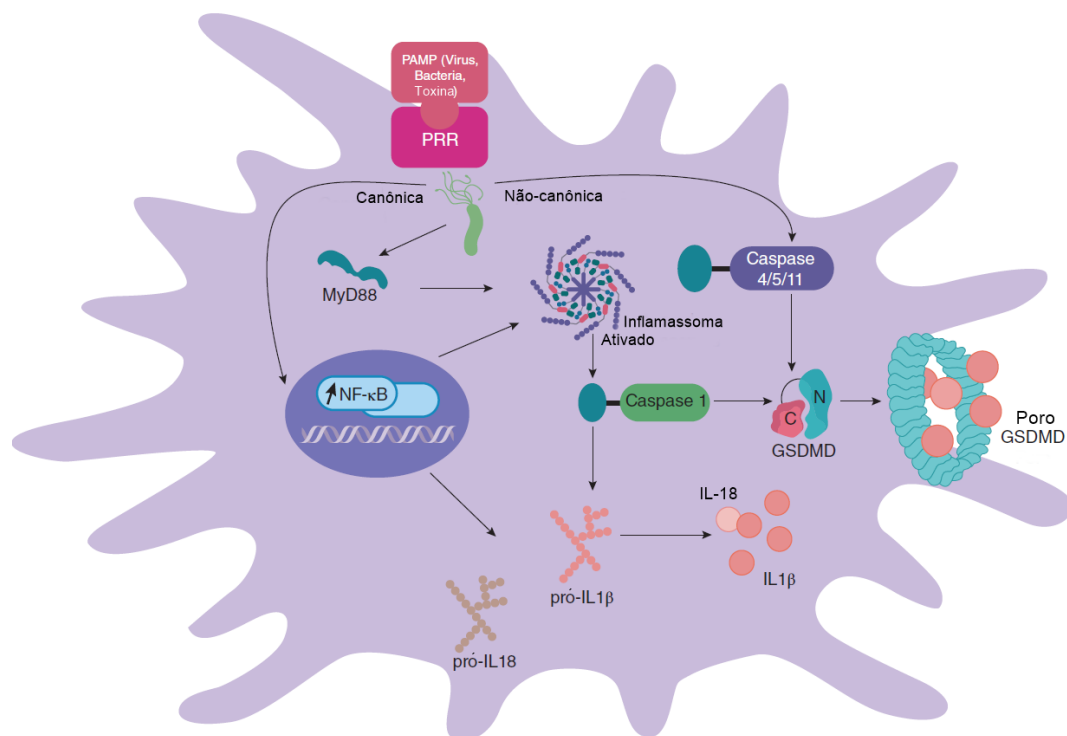
O tipo de PRR intracelular a ser ativado depende do reconhecimento inicial de receptores de conhecimento de padrões expostos na região transmembranar, a exemplo dos receptores do tipo Toll (TLR) e os receptores de lectinas tipo C ou ainda de sensores presentes no citoplasma, a exemplo do sensor IFI16, que reconhece moléculas DNA dupla fita ou transcritos incompletos em infecções por retrovírus. A partir deste primeiro contato, se induz a produção de fatores de transcrição que induzem a resposta inflamatória, destacando-se o NF- $\kappa$ B, que induz a transcrição de genes ligados ao inflamassoma e dá sequência à morte por piroptose (HEIL; BROCKMEYER, 2019).

Uma vez o sensor reconhecido, desencadeiam-se então os mecanismos moleculares que culminam na piroptose (Figura 13). A ativação da caspase-1 a partir do domínio CARD induz inicialmente a clivagem da pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 nas formas ativas IL-1 $\beta$  e IL-18. Além disso, ocorre também a clivagem proteolítica da proteína gasdermina-D. Esta clivagem é responsável por gerar duas subunidades proteicas, uma N-terminal (p30 - GN) e uma C-terminal (p20 - GC). A porção G-N direciona-se para a membrana celular, onde interage com moléculas lipídicas, tais quais fosfatidilserina, fosfatidilinositol e cardiolipinas, induzindo assim o processo de formação de poros a partir da oligomerização das subunidades G-N. A formação de poros na membrana da célula ocasiona a quebra do gradiente osmótico, que induz os eventos característicos da piroptose: o inchaço celular, extravasamento de conteúdo citoplasmático e a liberação das citocinas inflamatórias (KESAVARDHANA; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2020; KOVACS; MIAO, 2017; LIU; LIEBERMAN, 2017).

A via não-canônica da piroptose, por sua vez, é descrita a partir da ativação das caspases -4 e -5 em humanos e da caspase -11 em modelos murinos, presentes em macrófagos, monócitos e outros tipos celulares. Estas caspases interagem diretamente a partir da porção lipídica do lipopolissacarídeo presente na parede das bactérias gram-negativas, induzindo o mecanismo de clivagem da gasdermina D. Por conseguinte, o dano na membrana celular produz DAMPs, induzindo a ativação do inflamassoma NLRP3, que culmina nos posteriores eventos da piroptose (HACHIM et al., 2020; SHARMA; KANNEGANTI, 2016).

Com base no tipo de reconhecimento antigênico, os diversos tipos de inflamassomas podem ser ativados. O NLRP3, por exemplo, é ativado na presença de PAMPs e DAMPs, tanto na via canônica quanto na via não canônica; o NLRP1 é ativado, por sua vez, a partir do contato com toxinas bacterianas de bacilos anaeróbios facultativos (a exemplo do *Bacillus anthracis*), enquanto que os inflamassomas NLRC4 e o *Pyrin* decorrem de outros componentes de células bacterianas. Por fim, os inflamassomas do tipo AIM2 reconhecem vírus que possuem DNA dupla fita a partir da transcrição reversa (dsDNA-RT, do inglês, *double-stranded DNA reverse-transcribing viroses*) (MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017)

Figura 13 – Mecanismos geral de ativação da piroptose pelo inflamassoma.



Fonte: Adaptado de Hachim et al. 2020. Observa-se a ativação mediada pelas vias canônica e não-canônica. A via comum ou canônica é ativada a partir do reconhecimento de PAMPs e DAMPs decorrentes de processos inflamatórios em diversas doenças. Esta desencadeia a ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, que induz a ativação de inflamassomas, seguido da ativação de caspase-1 e a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18, bem como a Gasdermina D (GSDMD). A via não-canônica ativa a partir de bactérias a via independente de caspase-1, sendo neste caso ativadas as caspases -4, -5 ou -11, seguindo o mesmo fluxo da via comum.

Especificamente nas infecções virais, a ativação de alguns tipos de inflamassomas já foi caracterizada como mecanismo diretamente relacionado com a patogênese viral. O inflamassoma NLRP3 já é descrito em associação com infecções pelos vírus Influenza, Vírus Herpes Simples (HSV), Dengue Virus (DENV), Zika vírus (ZKV), dentre outros; os inflamassomas que reconhecem dsDNA-RT também já foram relacionados, como o AIM2, relatado em infecções por Citomegalovírus (CMV), Espstein-Barr (EBV), Vírus Chikungunya (CHIKV) e o IFI16, discutido em infecções pelo HIV (KURIAKOSE; KANNEGANTI, 2019; LEAL; REIS; PONTILLO, 2020).

#### 2.4.2 A piroptose na infecção pelo HIV-1

Desde o início da busca da compreensão dos mecanismos envolvendo a infecção pelo HIV-1, a depleção no quantitativo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> era referida como consequência da ativação da morte celular por apoptose. Porém, ensaios utilizando

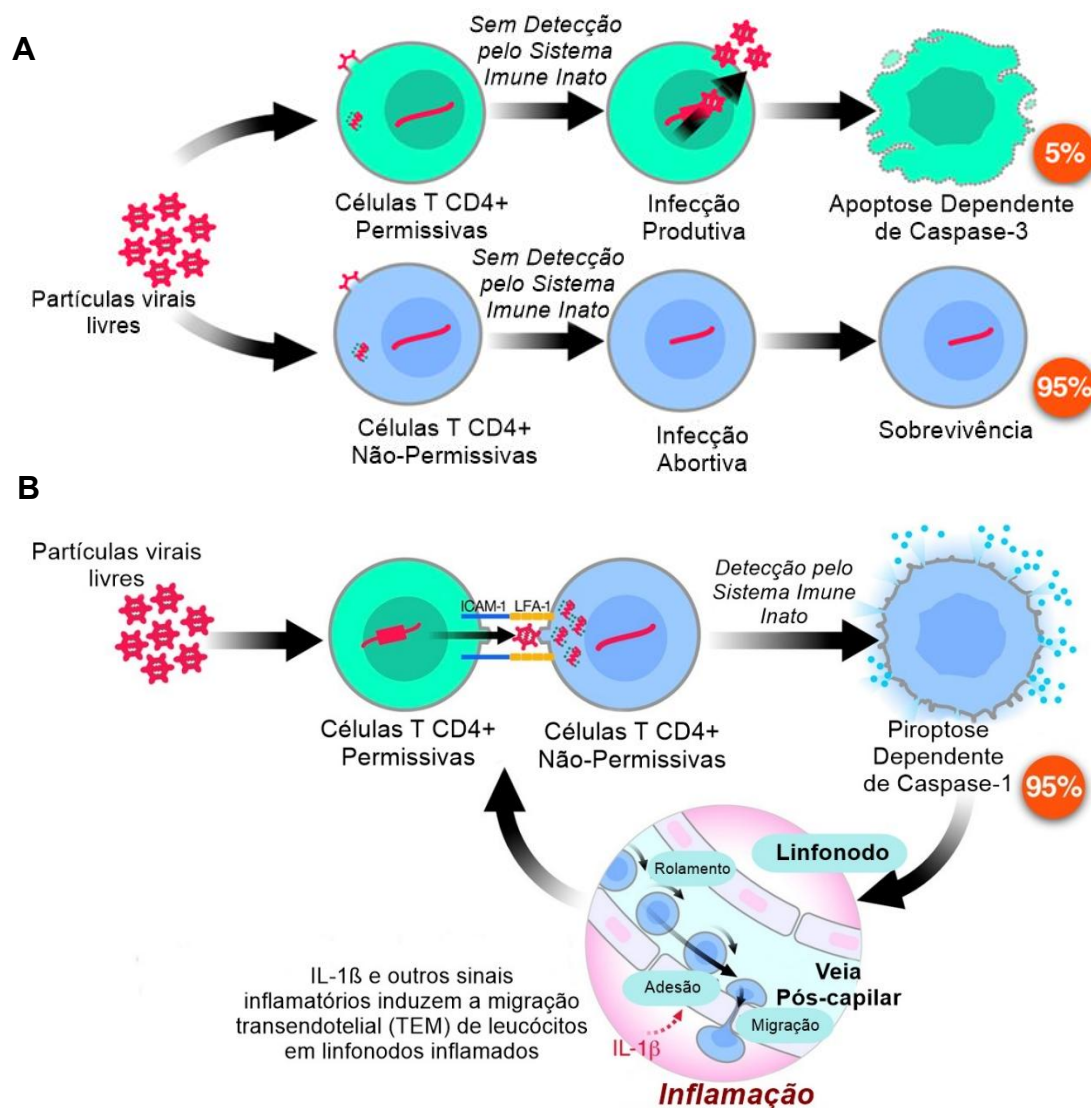
tecidos linfoides humanos demonstraram que, nestes tecidos, que são utilizados pelo vírus para a efetividade da infecção nos estágios iniciais e posteriormente estabelecer sua latência, 95% das células infectadas entravam em morte celular mediada pela piroptose, sendo os 5% remanescentes decorrentes de processos apoptóticos. Assim, os estudos atuais têm buscado cada vez mais compreender a ativação da via dependente de caspase-1 como mecanismo de imunossupressão nas PVHIV (DOITSH et al., 2010; VIDYA VIJAYAN et al., 2017).

Neste processo, a ativação da piroptose se dá através da tentativa de infecção do vírus nas chamadas células não-permissivas ao HIV-1. Nestas células, após a entrada do vírus, ocorre a sinalização a partir de sensores citoplasmáticos como o IFI16, que identifica transcritos reversos virais incompletos. O reconhecimento do conteúdo antigênico induz a sinalização celular que culmina na montagem do inflamassoma IFI16, seguindo a ativação enzimática da caspase-1, com a consequente liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, e a formação dos poros que caracterizam a morte celular por piroptose. Assim, diz-se que foi gerada uma infecção abortiva do vírus, uma vez que a produção das novas partículas virais foi bloqueada nos estágios iniciais da infecção da célula (DOITSH, 2016; DOITSH et al., 2014; MONROE et al., 2014).

Por outro lado, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> que morrem por apoptose são ditos permissivos à infecção pelo HIV-1. Isto ocorre, uma vez que mecanismos de reconhecimento da resposta imune inata não são ativados, permitindo assim, o curso da infecção viral até a integração do DNA proviral, e a ativação da célula, que induz a transcrição e a tradução das proteínas virais, gerando uma infecção denominada produtiva, uma vez que novos vírions conseguem ser liberados da célula infectada. No decorrer deste processo de replicação viral, a própria célula induz a ativação de caspase-, e a morte da célula ocorre de forma silenciosa (Figura 14) (DOITSH; GREENE, 2016).



Figura 14 – Mecanismo de morte celular nas células permissivas e não-permissivas à infecção.



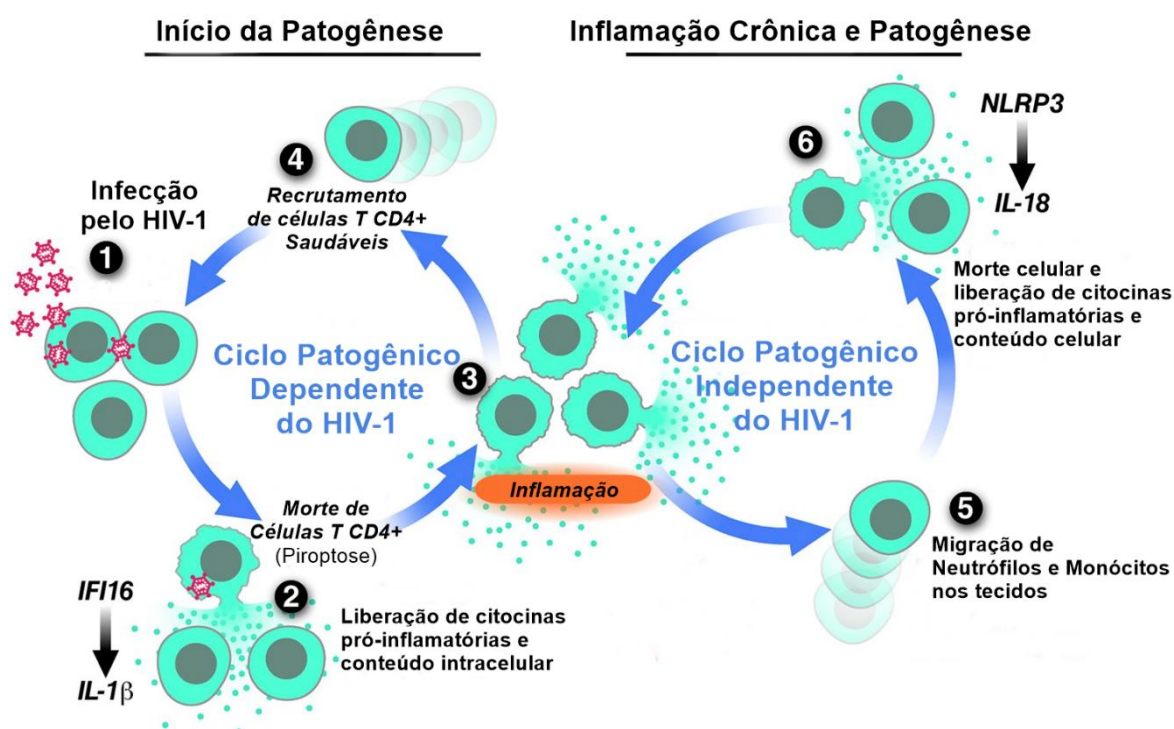
Fonte: Adaptado de Doitsh and Greene 2016. A – Ativação da infecção não-patogênica do HIV-1.

Exibe células T CD4+ permissivas circulantes, onde após a infecção por partículas virais livres, o processo de infecção induz a morte celular por apoptose, via ativação de caspase-3. Em células não-permissivas, que constituem 95% das células em tecidos linfoides, cujo reconhecimento pelo sistema imune inato não ocorre, a infecção gerada é do tipo abortiva, culminando na destruição do patógeno e na sobrevivência da célula. B – Ativação patogênica do HIV-1. As interações célula-célula são responsáveis pelo estímulo na depleção das células T CD4+ não-permissivas. O mecanismo de sinapse virológica gerado a partir da interação de linfócitos T CD4+ permissivos com linfócitos T CD4+ não-permissivos desencadeia o acúmulo de transcritos incompletos no citoplasma, sensibilizando o sistema imune inato e desencadeando a ativação da piroptose.

A ativação da via da piroptose constitui um dos principais mecanismos da resposta imune inata, agindo de modo efetivo contra a grande maioria dos organismos invasores. Porém, nos indivíduos HIV-positivos, estudos têm questionado o

desenvolvimento benéfico desta via de morte. Acredita-se que o papel da piroptose interfere diretamente na patogênese da infecção instituindo um ciclo inflamatório vicioso (Figura 15), onde a ativação do processo inflamatório mediado pelo inflamassoma e os mecanismos decorrentes de liberação de citocinas e recrutamento celular, ocasiona a depleção de células T CD4+ nestes indivíduos. Neste contexto, dois ciclos patogênicos mediados pelo inflamassoma contribuem para a ativação imune crônica nos pacientes infectados, o dependente de HIV-1, induzido pela ativação do IFI16, e o independente de HIV-1, mediado pela ativação do NLRP3 (BOUCHER; CHEN; SCHRODER, 2016; DOITSH; GREENE, 2016; LEAL; REIS; PONTILLO, 2020).

Figura 15 – Mecanismo de ativação imune crônica nos pacientes HIV-positivos.



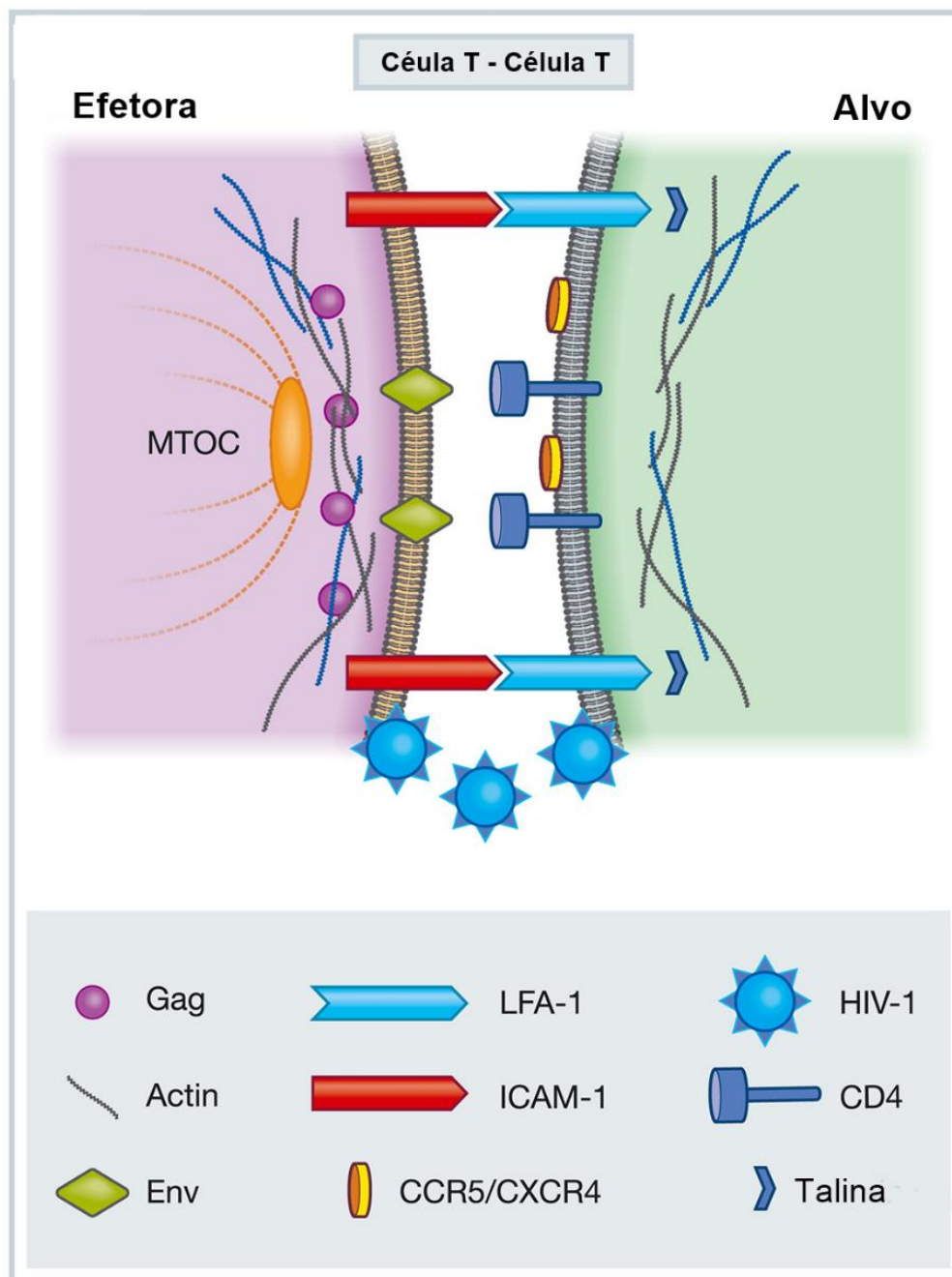
Fonte: Adaptado de DOITSH; GREENE (2016). A ativação decorre de dois mecanismos, sendo o primeiro dependente do vírus, decorrente da ativação do inflamassoma IFI16, que é reconhecido pelo acúmulo de transcritos reversos no citoplasma da célula. A destruição celular causada acarreta na liberação de conteúdo celular, que é reconhecido pelo inflamassoma NLRP3, exacerbando a ativação da piroptose pela via independente do HIV-1.

As interações que ocorrem dentro do microambiente em que o vírus está presente também se apresentam como fator determinante para a ativação imune crônica mediada pelos processos inerentes da piroptose. Como mostrado no estudo

desenvolvido por Galloway et al. 2015, dentro dos tecidos linfoides, as interações célula-célula atuam induzindo este mecanismo de morte nas variadas populações de linfócitos. As populações de células linfoides quiescentes acabam sendo induzidas à morte por piroptose, uma vez que células permissivas à infecção ativadas transferem partículas virais para as células não-permissivas vizinhas, mecanismo denominado sinapse virológica (Figura 16) (GALLOWAY et al., 2015; PEDRO; HENDERSON; AGOSTO, 2019).

A sinapse virológica decorre da interação entre moléculas presentes na superfície da célula permissiva com moléculas das células não-permissivas adjacentes, que induzem uma maior junção celular para a transferência de partículas virais. Destas, a interação da LFA-1 (do inglês, *integrin leukocyte function-association antigen 1*) com ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*) constitui o principal mecanismo de ligação entre estas células. Esta maior junção celular induz uma montagem de novas partículas virais polarizadas no sítio em que está ocorrendo a adesão, além do transporte de moléculas necessárias ao reconhecimento viral (CD4, CXCR4, CCR5) (PAIM; BADLEY; CUMMINS, 2020; PEDRO; HENDERSON; AGOSTO, 2019).

Figura 16 – Mecanismo de sinapse virológica.



Fonte: Adaptado de Bayliss and Piguet (2018). A interação entre a célula T CD4<sup>+</sup> efetora (permissiva) a partir da expressão de ICAM-1 interage com a célula alvo (não-permissiva) pela molécula de adesão LFA-1. Esta interação aproxima as duas células, induzindo alterações no citoesqueleto, facilitando o processo de migração direta de partículas virais.

À medida que novas partículas vão brotando e migram para as novas células alvo iniciando o processo replicativo, ocorre o reconhecimento do material genético viral pelos sensores IFI16, que culminam na morte por piroptose. Comparado aos linfócitos presentes nos tecidos linfoides, as células T CD4<sup>+</sup> presentes no sangue periférico estão mais associadas com infecções produtivas, sendo sugerido que isto

ocorra devido a um processo de perda das interações célula-célula. Porém, uma vez estas células em recirculação para os órgãos linfoides, podem ser sensibilizadas e direcionadas para a morte por piroptose, fato demonstrado em análises utilizando marcadores imunofenotípicos que identificaram maiores níveis de piroptose em células recém-emigradas do timo (RTE). (CARVALHO-SILVA et al., 2020b; MUÑOZ-ARIAS et al., 2015).

Assim, é evidente que a interação entre células abortivas e células produtivas não constituem vias independentes na depleção de células T CD4<sup>+</sup>, mas sim, uma cascata entrelaçada de mecanismos de ativação da piroptose (BAYLISS; PIGUET, 2018; DOITSH; GREENE, 2016).

### **2.4.3 Genes e proteínas da via da piroptose**

#### **2.4.3.1 NLRP3**

A proteína NLRP3 (do inglês, *NOD-like receptor Family, pyrin domain containing 3*) se apresenta como o inflamassoma melhor caracterizado e, por isso, amplamente estudado nos mais diversos processos infecciosos, autoimunes e inflamatórios. A proteína é sintetizada a partir do transcrito do gene homônimo *NLRP3*, localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q44). Sua estrutura gênica é formada por cerca de 10 a 11 éxons, onde são produzidos 8 transcritos por mecanismos de *splicing* alternativo.

Estruturalmente, o NLRP3 é dividido em três regiões: uma região amino-terminal composta por um domínio pirina; uma região central composta por um domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeos (NOD) e uma região C-terminal composta por um domínio de repetição rico em leucinas (LRR). Com base na sua composição, este inflamassoma não consegue interagir com a região de caspase indutora dos mecanismos de piroptose. Para tal, se faz necessária a ligação de um adaptador ASC na região N-terminal. Inicialmente descrito em macrófagos, estudos apontam que diversas populações celulares são capazes de induzir a atividade no NLRP3, principalmente células e tecidos do sistema imune, como monócitos, células T e B, neutrófilos e células dendríticas, podendo ter sua ativação mediada por diversos PAMPs e DAMPs (SONG et al., 2015; YANG et al., 2019).

A ativação do NLRP3 é mediada a partir da interação de PAMPs como os ácidos nucleicos associados a patógenos, ionofóros Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, componentes celulares e toxinas bacterianas e fúngicas. Além disso, eventos de sinalização celular e molecular

são também capazes de induzir a transcrição e ativação do NLRP3, produção de ROS decorrentes de disfunção mitocondrial, danos lisossomais, distúrbios iônicos na célula, como a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$ , a perda do equilíbrio  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  e o influxo de potássio. A partir do reconhecimento destes padrões, a ativação do NLRP3 ocorre em duas etapas, sendo a primeira decorrente do reconhecimento de receptores TLR, que induzem a ativação do fator NF- $\kappa\text{B}$ , que induz a transcrição de genes ligados à piroptose. A segunda etapa é composta pela oligomerização do NLRP3, conduzindo a montagem do inflamassoma, a ligação do ASC e a ativação da caspase-1, culminando na morte celular (ABDERRAZAK et al., 2015; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

Com base na sua importante função no reconhecimento e ativação de processos inflamatórios, a regulação do inflamassoma NLRP3 é mediada em sua maioria com base em modificações pós-traducionais, destacando-se a fosforilação e a ubiquitinação, tanto positivamente quanto negativamente, a depender das diferentes vias acometidas. Além disso, diversos padrões reconhecidos pelo NLRP3 são responsáveis por regular o gene *NLRP3*, sendo exemplos de vias de ativação mediadas pelos padrões reconhecidos a PKR (do inglês, *RNA-dependent protein kinase*), a *guanylate-binding protein 5* (GBP5), e a proteína quinase Nek7 (HE; HARA; NÚÑEZ, 2016; KELLEY et al., 2019).

#### 2.4.3.2 IFI16

A proteína IFI16 atua como sensor intracelular no combate a patógenos a partir do reconhecimento de ácidos nucleicos, destacando-se em infecções virais. O gene *IFI16* localiza-se na região 1q23.1, pertencente a uma família de genes indutores de interferon  $\text{P}200$ , responsável por codificar proteínas evolutivamente próximas que partilham um domínio HIN, do inglês *hematopoietic interferon-inducible nuclear*, formado por 200 resíduos de aminoácidos, responsáveis pela interação com o dsDNA, onde por mecanismos de *splicing*, três isoformas do IFI16 são geradas (A, B e C) (DELL'OSTE et al., 2015; XIAO, 2015).

Estruturalmente, o IFI16 é formado por duas regiões de repetição HIN-200, com uma região espaçada entre elas, rica em sequências de aminoácidos serina-treonina-prolina (S/T/P), sendo o tamanho da região espaçadora determinada a partir dos mecanismos de *splicing*, que podem apresentar divergências de até três cópias do domínio conservado de 56 aminoácidos S/T/P. Por fim, na extremidade N-terminal, se

encontra o domínio PYD, responsável pela interação com o adaptador ASC para a indução da ativação da caspase-1 (JONSSON et al., 2017; VEERANKI; CHOUBEY, 2012).

Constitutivamente, o *IFI16* apresenta uma ampla expressão nas populações celulares, tendo como exemplo células epiteliais e endoteliais, fibroblastos e células de origem hematopoiética, principalmente linfócitos, e apresentando uma variada distribuição na célula, localizando-se no núcleo, no citoplasma ou em ambos. Além disto, a proteína IFI16 consegue interagir com diversas proteínas regulatórias, tanto do ciclo celular, como a BRCA1, tp53 e RB, quanto ativadoras do sistema imune, a exemplo das proteínas ASC, que induz a formação do inflamassoma, e a STING, que atua na produção de IFN- $\beta$ . Por essa ampla variabilidade de expressão, diversas funções são associadas ao IFI16, como mecanismos regulatórios transcricionais, controle do ciclo celular, diferenciação celular, apoptose e piroptose, o que faz com que este venha se tornando alvo de estudos envolvendo processos crônicos, inflamatórios e autoimunes (MA; NI; DAMANIA, 2018; PICCALUGA et al., 2019).

#### 2.4.3.3 CASP1

A CASP1 (do inglês, *cysteinyl aspartate-specific protease-1*) é a proteína mais bem caracterizada da família das caspases, em decorrência do seu importante papel na regulação da produção das proteínas IL-1 $\beta$  e IL-18. O *cluster* do gene *CASP1* localiza-se na no braço longo do cromossomo 11 (11q22.2-q22.3), composto por 10 éxons, capazes de originar seis formas *splicing* variantes, sendo a forma *CASP1alpha* a mais presente em humanos.

Baseado na sua estreita relação com a ativação da resposta imune inata, a expressão da proteína CASP1 é comumente observada em células presentes nos órgãos linfoides como baço, timo e linfonodos, podendo também ser observado em células hepáticas, do intestino e adipócitos. Como mecanismos regulatórios de transcrição, pouco ainda se é descrito, porém, acredita-se que a relação com fatores de transcrição que induzem a produção das citocinas inflamatórias como o NF- $\kappa$ B e o IRF8 são passíveis de serem os principais mecanismos reguladores (LEE et al., 2015; LI et al., 2017; MOLLA et al., 2020).

A caspase-1 é produzida na forma zimogênica, ou seja, inativa na célula. Após a interação com o domínio de recrutamento de caspases (CARD), presente em alguns inflamassomas ou nos adaptadores necessários para a ativação da piroptose, esta

então é convertida na sua forma ativa. Assim, o processo de oligomerização para a montagem do complexo inflamassoma é o ponto inicial de ativação da caspase-1. A estrutura da CASP1 é formada por domínios catalíticos contendo duas subunidades, decorrentes do autoprocessamento enzimático, uma p10 e uma p20, estando presente nesta última o resíduo de cisteína responsável pelo processamento e ativação das interleucinas da via da piroptose que estão inativadas inicialmente (BOLÍVAR; VOGEL; BOUCHIER-HAYES, 2019; BOUCHER; CHEN; SCHRODER, 2016).

A caspase-1, apresenta como principal função na célula a ativação de vias de sinalização que induzem genes que produzam as interleucinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18, sendo por isso, inicialmente, descrita como uma IL-1 convertase, e só posteriormente estudos demonstraram que se tratava de uma protease, que possuía um resíduo de cisteína responsável pela sua atividade catalítica. Adicionalmente, a atividade proteolítica da CASP1 atua na ativação de mecanismos de morte celular, como na indução da piroptose mediada pela produção de poros decorrentes da clivagem da gasdermina D. Assim, estudos envolvendo processos inflamatórios crônicos têm buscado descobrir o papel da ativação da caspase na sua patogênese (BOLÍVAR; VOGEL; BOUCHIER-HAYES, 2019; CHRISTGEN; PLACE; KANNEGANTI, 2020).

#### 2.4.3.4 CARD

O domínio CARD pertence a superfamília de proteínas DDF (do inglês, *death domain fold*), sendo descritos aproximadamente 33 genes como codificadores do domínio CARD, com mais de 1.000 domínios variantes sendo descritos. O tamanho da proteína é de cerca de 90kDa, estando estas relacionadas com diversos mecanismos, como a ativação da apoptose, da inflamação e nos mecanismos de sinalização celular na resposta imune inata, todos mediados a partir de interações proteína-proteína (DORFLEUTNER; CHU; STEHLIK, 2015).

Estruturalmente, o domínio CARD é composto por uma estrutura proteica conservada, dobrada e agrupada em 6-hélices, morfologia comum a família DDF, porém, com uma quebra na posição H1, característica do CARD. O CARD pode estar presente na célula de duas formas, a primeira como um domínio único presente na região terminal, ou ainda associado como parte estrutural de outras proteínas, a exemplo do inflamassoma NLRC4 ou ainda do adaptador ASC, necessário para a



ativação dos inflamassomas que não possuem o domínio CARD, como no caso do NLRP3 e o IFI16 (PARK, 2019).

Considerando o aspecto funcional, o CARD atua diretamente a partir de interações proteína-proteína, formando dímeros e trímeros que iniciam o processo de ativação de complexos proteicos e induzem mecanismos de morte celular, como a conversão da caspase-1 na sua forma ativa, influenciando, assim, na montagem dos inflamassomas. Além disso, se apresenta como um regulador do NF- $\kappa$ B, mediando os processos inflamatórios. Dentre os papeis do CARD, existem domínios que também atuam como reguladores negativos dos inflamassomas, a exemplo do CARD8 (GARCÍA-BERMÚDEZ et al., 2013; JIN; XIAO, 2015).

O gene *CARD8* se localiza no braço longo do cromossomo 19 (q13.33), sendo expresso sumariamente em células do sistema imune como linfócitos T e B, monócitos e macrófagos. Em sua estrutura, contém um domínio FIIND na região N-terminal e um domínio CARD na região C-terminal. As diferentes isoformas geradas a partir dos transcritos derivados de *splicing* são responsáveis por sugerir funções diferentes nestas proteínas ao interagir com a caspase. A proteína de 54kDa gerada atua como um regulador negativo da ativação da caspase-1 (ITO; HARA; KUBOTA, 2014; TAABAZUING; GRISWOLD; BACHOVCHIN, 2020).

Estudos têm associados estes mecanismos de regulação negativa a partir do CARD8 com o inflamassoma NLRP3. Este processo pode decorrer de dois aspectos, o primeiro a partir da interação com a região de ligação entre o NOD e o LRR na estrutura do NLRP3, e o segundo a partir da ligação direta ao NOD, impedindo sua oligomerização e ativação da CASP1, podendo alterar a fisiopatologia da resposta imune frente aos patógenos (PARAMEL; SIRSJÖ; FRANSÉN, 2015; TAABAZUING; GRISWOLD; BACHOVCHIN, 2020).

#### 2.4.3.5 IL-1 $\beta$

A proteína IL-1 $\beta$  é uma das principais citocinas pró-inflamatórias da família da IL-1, associada a diversos processos infecciosos, autoimunes e inflamatórios crônicos. O gene *IL1B* localiza-se na região 2q14.1, que transcrevem RNAs que dão origem a proteína na sua forma inativa, de 269 aminoácidos (31kDa), antes de ser clivada e ativa por meio da caspase-1, em uma proteína madura de 153 aminoácidos (17kDa). Além da caspase, outras proteases presentes em outros tipos

celulares como neutrófilos são capazes de produzir sua forma ativa, a exemplo da elastase, granzima A, dentre outras (DAING et al., 2017; KANEKO et al., 2019).

Sua expressão é induzida principalmente em monócitos, podendo atuar em outras células mononucleares do sangue periférico, como células dendríticas e linfócitos (sendo bem presentes em tecidos linfoides) e adicionalmente atua na produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, de prostaglandinas pelos fibroblastos e células epiteliais, sendo regulada por fatores que interagem com a via de ativação do NF- $\kappa$ B (PULUGULLA et al., 2018; SOBKOWIAK et al., 2017; ZHU; KANNEGANTI, 2017).

De modo geral, esta indução da expressão não se dá sob homeostase, sendo necessários mecanismos moleculares de reconhecimento de padrões e/ou ativação mediada por outras citocinas para que ocorra sua produção. A exemplo disto, no processo de infecção pelo HIV-1, a indução da IL-1 $\beta$  se dá mediada pela ativação do inflamassoma NLRP3, que é ativado a partir dos PAMPs via receptores TLRs, bem como na sua ativação na resposta ao reconhecimento de dsDNA pelo sensor IFI16 (DELL'OSTE et al., 2015; DINARELLO, 2018; MANTOVANI et al., 2019).

#### 2.4.3.6 IL-18

O gene *IL18* localiza-se no braço longo do cromossomo 11 (11q22.2-q22.3), inicialmente descrito como fator indutor de IFN- $\gamma$ , composto por 7 éxons e duas regiões promotoras, uma localizada entre os éxons 1 e 2, onde a região promotora do primeiro éxon não é codificada, sendo o início da transcrição localizado na região 5' flanqueada após o primeiro éxon, enquanto a região *upstream* ao segundo éxon atua como sítio de ligação do fator de transcrição PU.1. A proteína IL-18 apresenta-se na sua forma inativa, de 193 aminoácidos (24kDa), assim como a IL-1 $\beta$ , sendo necessárias clivagens posteriormente para se chegar na forma ativa de 17kDa (YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019; ZHU; KANNEGANTI, 2017)

Embora pouco homólogos, diversas características são comuns a estas interleucinas, como a estrutura  $\beta$ -pregueada presente na sua morfologia, além do compartilhamento de vias de sinalização, como a necessária para a sua ativação, mediada pela caspase-1. Assim como a IL-1 $\beta$ , alguns inflamassomas já foram descritos pela sua efetividade na produção da IL-18 e sendo observadas em processos que possuem características inflamatórias na sua fisiopatologia (NOVICK et al., 2013).

A IL-18 é amplamente expressa em diversas células, a exemplo de monócitos e macrófagos, células dendríticas, queratinócitos e células epiteliais. Porém, um destaque é dado ao desempenho obtido na ativação de populações de linfócitos, uma vez que esta consegue induzir a ativação e diferenciação de células linfoides, bem como estimular uma integração da resposta Th1 e Th2, sendo este mecanismo mediado através do sinergismo com outras citocinas produzidas, como a IL-12, IL-15, IL-13 e IL-4 (KAPLANSKI, 2018; TARNOWSKI et al., 2017; UCHIDA et al., 2007).

É descrito que, na presença de IL-12 e/ou IL-15, a expressão do receptor da IL-18 se apresenta elevada, induzindo assim maiores níveis de IFN- $\gamma$  mediados pela atividade do fator NF- $\kappa$ B em células T CD4+, CD8+ e NK, além de aumentar a produção de perforinas e outras proteínas relacionadas com a atividade citotóxica. Já na ausência de IL-12 e IL-15, a IL-18 é capaz de mediar a resposta Th2 a partir da produção de outras interleucinas, a IL-13 e a IL-4, que atuam na resposta mediada por basófilos e mastócitos. Por fim, as funções pró-inflamatórias da IL-18 decorre de diversos processos, como a indução da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, produção de óxido nítrico, induzindo vasodilatação no endotélio e outras citocinas pró-inflamatórias (KAPLANSKI, 2018; NOVICK et al., 2013).

#### **2.4.4 Fatores do hospedeiro associados à não recuperação imune mediada pela morte celular**

##### **2.4.4.1 Sexo**

O sexo se apresenta como um mecanismo determinante na recuperação imune, uma vez que considerando aspectos biológicos, observa-se uma ampla variabilidade genética, hormonal e comportamental, além de aspectos sociais que se refletem diretamente na heterogeneidade clínica dos indivíduos. Especificamente na infecção pelo HIV, estudos demonstram que indivíduos do sexo feminino apresentam parâmetros imunológicos importantes na patogênese viral melhores em comparação aqueles do sexo masculino (ADDO; ALTFELD, 2014; SCULLY, 2018).

Observa-se, por exemplo, que homens possuem um quantitativo de células T CD4+ inferior a mulheres, além de uma menor proliferação de células T, uma menor quantidade de células T CD4+ RTE e uma razão CD4/CD8 também inferior; em contrapartida, indivíduos do sexo masculino apresentam uma maior quantidade de células T CD8+ e uma resposta T<sub>h1</sub> mais exacerbada, o que pode auxiliar em mecanismos de maior destruição celular no contexto da infecção pelo HIV a partir de

uma elevada ativação imune. Além disso, outros aspectos descritos são associados a influência dos aspectos hormonais femininos, a exemplo do estrógeno, capaz de diminuir a ativação transcricional viral e mediar a ativação de genes do sistema imune (CASTILHO; MELEKHIN; STERLING, 2014; CORBEAU; REYNES, 2011b; KLEIN; FLANAGAN, 2016).

#### 2.4.4.2 Aspectos Genéticos

O *background* genético dos indivíduos apresenta-se como um dos fatores mais discutidos ao longo dos anos no contexto da infecção pelo HIV. Considerando o critério imunológico, a ampla variabilidade apresenta-se associada a fatores epigenéticos e genéticos, como modificações regulatórias específicas em células do sistema imune, expressão diferencial de proteínas mediadas pela indução do próprio vírus, a carga gênica associada a modulação do cromossomo X, seja pela inativação ou por mecanismos regulatórios como a expressão de microRNAs, bem como a presença de variantes polimórficas genéticas em genes de vias de morte celular (GREENBLATT et al., 2019; YANG et al., 2020b).

Considerando os polimorfismos de base única (SNPs), diversas variantes importantes em genes que medeiam a ativação dessas vias são descritas. A presença de SNPs funcionais ocasionam consequências nestes genes, influenciando, assim, na patogênese de algumas doenças, dentre elas, a infecção pelo HIV. A expressão aumentada ou diminuída de genes das vias de morte celular a partir de variantes polimórficas pode ocasionar uma exacerbação ou redução dos mecanismos de morte associados à destruição de células T CD4+, modulando, desta forma, as etapas da patogênese viral e a progressão à AIDS (COELHO et al., 2018). A tabela 4 expõe as principais variantes descritas por influenciar na morte celular mediada pela piroptose.

Tabela 4 – Variantes em genes da via da piroptose.

Gene	Localização	Função	MAF	Descrição
<i>CARD8</i> rs2043211 (A<T)	Éxon (C10X)	Inserção de um stop códon	0.31	Ko et al. 2009
<i>IL18</i> rs187238 (C>G)	Região Promotora (-137)	Sítio de ligação do fator H4TF-1	0.22	Giedraitis et al. 2001
<i>IL1B</i> rs1143634 (G>A)	Éxon (Phe105Phe)	tagSNP (rs1071676)	0.13	Oliveira et al. 2014
<i>NLRP3</i> rs10754558 (C>G)	3'UTR	Sítio de ligação de miRNA	0.35	Hitomi et al. 2009
<i>IFI16</i> (rs6940 A>T)	Éxon (T723S)	Alteração conformacional da proteína	0.23	Marchesan et al. 2017

Fonte: elaborada pelo Autor (2022).

MAF – frequência alélica mínima.

#### 2.4.4.3 Ativação Imune

A constante ativação imune pode influenciar diretamente no quantitativo de células T CD4+ e de outros parâmetros importantes na infecção pelo HIV. De modo geral, este mecanismo apresenta-se como um fator de eficiência, considerando uma resposta imune mais eficaz. Porém, em situações de infecções crônicas, como ocorre com o HIV, este mecanismo pode levar a destruição de células como consequência do curso patogênico mediado pela ativação de vias de morte celular (SOKOYA et al., 2017; XIA et al., 2018).

A exemplo disto, a ativação imune por coinfeções é descrita por induzir nos indivíduos co-infectados uma exaustão tímica pela destruição constante de células, uma vez que a resposta imunológica nesse contexto precisa ser direcionada a mais de um patógeno. Também, durante o curso da infecção, partículas virais com tropismo R5 tendem a migrar para os tecidos linfoides do trato gastrointestinal, de modo que a infecção persistente nestes tecidos ocasiona danos aos tecidos. Em consequência disso, a perda dessa integridade leva a migração de microrganismos ao lúmen intestinal, mecanismo descrito como translocação microbiana, gerando infecções que requerem uma atividade maior de células T CD8+ e T CD4+, ocasionando uma resposta exacerbada, semelhante a observada nas coinfeções (BOULOUGOURA; SERETI, 2017; YOUNAS et al., 2016).

A presença da proteína CCR5, além de atuar como correceptor para cepas R5, também é capaz de modular a ativação imune de uma forma negativa, a partir da exacerbação desta resposta que culmina na destruição de linfócitos. Associado a isto, variantes em genes que produzem outras proteínas como citocinas pró-inflamatórias podem contribuir neste processo, a exemplo da IL-6, TNF $\alpha$  e IFN. (GAARDBO et al., 2012; SINGH, 2015).

Evidencia-se também, que a atividade induzida em decorrência do processo inflamatório crônico a partir da infecção patogênica desencadeada pelo HIV-1 atua como mecanismo importante na destruição de células, cujo processo decorre da atividade das citocinas pró-inflamatórias produzidas na ativação da via, e cujo produto atua na transmigração endotelial de leucócitos, favorecendo tanto a infecção e a possível destruição de novas células. Deste modo, o conjunto de fatores intrínsecos ao hospedeiro ou aqueles patogênicos associados à resposta do hospedeiro podem ser capazes de levar a deficiência imune na resposta terapêutica dos antirretrovirais (BOLÍVAR; VOGEL; BOUCHIER-HAYES, 2019; DOITSH; GREENE, 2016).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Tanto o alelo G quanto o genótipo GG do polimorfismo rs187238 no gene *IL18* demonstrou-se associado com a não-recuperação imune em indivíduos HIV-positivos submetidos a terapia antirretroviral;
- Indivíduos INR com genótipo GG apresentaram maiores níveis de linfócitos T recém-emigrados do timo, quando comparados a indivíduos com o genótipo CC;
- Não foi observada associação estatística dos polimorfismos nos genes *IL1B* (rs1143634), *NLRP3* (rs10754558), *CARD8* (2043211) e *IFI16* (rs6940) na população avaliada;
- A análise de fatores clínicos, sociodemográficos e laboratoriais demonstrou a associação das variáveis contagem de células T CD4+ ao início do tratamento e pós-tratamento, bem como o esquema terapêutico utilizando inibidores de protease com a recuperação imune;
- Mulheres apresentaram melhores contagens de células T CD4+ pré- e pós-tratamento quando comparadas a homens;
- Indivíduos do sexo masculino apresentaram níveis elevados de células RTE em piroptose quando comparados a indivíduos do sexo feminino;
- A meta-análise de RNA-seq comparando a expressão diferencial de linfócitos T CD4+ demonstrou uma variação em 64 genes, aos quais foram associados com vias de resposta imune, adesão e migração celular, inflamação, apoptose e as vias de sinalização Wnt, Notch e ERK/MAPK.

## REFERÊNCIAS

- ABDERRAZAK, A. et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. **Redox Biology**, v. 4, p. 296–307, 2015.
- ADDO, M. M.; ALTFELD, M. Sex-based differences in HIV type 1 pathogenesis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. SUPPL. 3, 2014.
- AGGARWAL, J. et al. Sex hormone profile in human immunodeficiency virus-infected men and it's correlation with CD4 cell counts. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 3, p. 328–334, 2018.
- AGHAJANI, R. et al. Genetic polymorphisms –137 (G > C) (rs187238) and –607 (C > A) (rs1946518) and serum level of interleukin 18 in Fars ethnic groups with metabolic syndrome in Northern Iran. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2020.
- AL-LAHHAM, Y. et al. Interleukin-18 (Rs187238) and glucose transporter 4 (rs5435) polymorphisms in Euro-Brazilians with type 1 diabetes. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1–7, 2017.
- ALESSANDRA BICK, M. et al. Intervening factors in the feeding of infants vertically-exposed to HIV: an integrative review Review Suggested citation. **Rev Panam Salud Publica**, v. 41, 2017.
- ALHETHEEL, A.; ALY, M.; KRYWORUCHKO, M. Immune Responses and Cell Signaling During Chronic HIV Infection. **Current Perspectives in HIV Infection**, 10 abr. 2013.
- AN, P. et al. Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 8, p. 1159–1165, 2008.
- ANDERSSON, G. Z. et al. Stigma reduction interventions in people living with HIV to improve health-related quality of life. **The Lancet HIV**, v. 7, n. 2, p. e129–e140, 2020.
- ARIF, M. S. et al. Pace of Coreceptor Tropism Switch in HIV-1-Infected Individuals after Recent Infection. **Journal of Virology**, v. 91, n. 19, 1 out. 2017.
- ASGEDOM, S. W. et al. Immunologic and Clinical Failure of Antiretroviral Therapy in People Living with Human Immunodeficiency Virus within Two Years of Treatment. 2020.
- ATTA, M. G.; DE SEIGNEUX, S.; LUCAS, G. M. Clinical pharmacology in HIV therapy. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 3, p. 435–444,



2019.

BAI, Y. et al. Regulation of CARD8 Expression by ANRIL and Association of CARD8 Single Nucleotide Polymorphism rs2043211 (p.C10X) With Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 45, p. 383–388, 2014.

BANDERA, A. et al. The NLRP3 inflammasome is upregulated in HIV-infected antiretroviral therapy-treated individuals with defective immune recovery. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–8, 2018.

BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868–871, 1983.

BATISTA, C. J. B. et al. The Brazilian experience of implementing the active pharmacovigilance of dolutegravir. **Medicine**, v. 98, n. 10, p. e14828, 2019.

BAYLISS, R. J.; PIGUET, V. Masters of manipulation: Viral modulation of the immunological synapse. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 1–11, 2018.

BBOSA, N.; KALEEBU, P.; SSEMWANGA, D. HIV subtype diversity worldwide. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 14, n. 3, p. 153–160, 1 maio 2019.

BEHJA, W. et al. Anti-HIV Drug Discovery, Development and Synthesis of Delavirdine: Review Articlecare Consultancy, Malaysia. (2) Senthil. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 1–16, 21 dez. 2019.

BEHNAZ, M. et al. The rs1143634 of IL-1 $\beta$  gene is associated with external apical root resorption in Iranian population. **Meta Gene**, v. 24, p. 100711, 1 jun. 2020.

BENEDICTO, A. M. et al. Nnrti and liver damage: Evidence of their association and the mechanisms involved. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2021.

BENZAKEN, A. S. et al. Antiretroviral treatment, government policy and economy of HIV/AIDS in Brazil: Is it time for HIV cure in the country? **AIDS Research and Therapy**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2019.

BERMICK, J. R. et al. Elevated Notch ligands in serum are associated with HIV/TB coinfection. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 24, 1 ago. 2021.

BHAGAT, A. K. et al. 420 ASSOCIATION IL1BGENE POLYMORPHISMS (RS1143634 AND RS1143627) WITH KNEE OSTEOARTHRITIS (KOA) RISK IN THE NORTH INDIAN POPULATION. 2019.

BHANGOO, A.; DESAI, N. Endocrinopathies in HIV, AIDS and HAART. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 14, n. 2, p. 101–103, 2013.

- BHAT, O. M. et al. Interleukin-18-induced cell adhesion molecule expression is associated with feedback regulation by PPAR- $\gamma$  and NF- $\kappa$ B in Apo E $^{-/-}$  mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 428, n. 1–2, p. 119–128, 2017.
- BIRSE, K. et al. Molecular Signatures of Immune Activation and Epithelial Barrier Remodeling Are Enhanced during the Luteal Phase of the Menstrual Cycle: Implications for HIV Susceptibility. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8793–8805, 2015.
- BOLÍVAR, B. E.; VOGEL, T. P.; BOUCHIER-HAYES, L. Inflammatory caspase regulation: maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease. **FEBS Journal**, v. 286, n. 14, p. 2628–2644, 2019.
- BOODHRAM, R. et al. Association of endogenous progesterone levels in young women using hormonal contraception with recent HIV-1 infection. **BMC Women's Health**, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2019.
- BOUCHER, D.; CHEN, K. W.; SCHRODER, K. Burn the house, save the day: pyroptosis in pathogen restriction. **Inflammasome**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2016.
- BOULOUGOURA, A.; SERETI, I. HIV Infection and Immune activation: the role of co-infections. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 11, n. 2, p. 191–200, 2017.
- BRAÑAS, F. et al. Sex Differences in People Aging With HIV. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 83, n. 3, p. 284–291, 1 mar. 2020.
- BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das**. [s.l.: s.n.].
- BRITES, C. et al. Editorial: HIV and Viral Co-infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 2144, 31 ago. 2021.
- BYRNE, E. H. et al. Association between injectable progestin-only contraceptives and HIV acquisition and HIV target cell frequency in the female genital tract in South African women: A prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 441–448, 2016.
- CAMPBELL, E. M.; HOPE, T. J. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 471–483, 2015.
- CARD, C. M. et al. Endothelial Cells Promote Productive HIV Infection of Resting CD4 $^{+}$ T Cells by an Integrin-Mediated Cell Adhesion-Dependent Mechanism. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 38, n. 2, p. 111–126, 1 fev. 2022.

- CARVALHO-SILVA, W. H. et al. **Genetics and immunological recovery with antiretroviral treatment for HIV** *Pharmacogenomics* NLM (Medline), , 1 set. 2020a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32893739/>>. Acesso em: 22 out. 2020
- CARVALHO-SILVA, W. H. V. et al. Immunological recovery failure in cART-treated HIV-positive patients is associated with reduced thymic output and RTE CD4+ T cell death by pyroptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 107, n. 1, p. 85–94, 1 jan. 2020b.
- CASADELLÀ, M. et al. Plasma HIV-1 Tropism and the Risk of Short-Term Clinical Progression to AIDS or Death. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0166613, 27 jan. 2017.
- CASTILHO, J. L.; MELEKHIN, V. V; STERLING, T. R. Sex Differences in HIV Outcomes in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era: A Systematic Review. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 5, p. 446–456, 2014.
- CAVALIN, R. F. et al. TB-HIV co-infection: spatial and temporal distribution in the largest Brazilian metropolis. **Revista de Saude Publica**, v. 54, n. 112, p. 1–13, 2020.
- CDC. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 30, n. 25, p. 305–8, 3 jul. 1981a.
- CDC. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. 1981. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 45, n. 34, p. 729–33, 30 ago. 1981b.
- CDC. Current trends update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) – United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 37, p. 507–8, 1982a.
- CDC. Opportunistic Infections and Kaposi ' s Sarcoma among Haitians in the United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 26, p. 353–354, 1982b.
- CDC. Epidemiologic Notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 27, p. 365–367, 1982c.
- CDC. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 31, n. 23, p. 305–7, 18 jun. 1982d.
- CDC. Current trends — prevention of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) — report of inter-agency recommendations. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 8, n. 4, p. 101–3, 1983a.
- CDC, C. FOR D. C. AND P. Epidemiologic Notes and Reports Immunodeficiency

among Female Sexual Partners of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome ( AIDS ) -- New York. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 52, p. 697–698, 1983b.

CHIBAWARA, T. et al. Effects of antiretroviral therapy in HIV-positive adults on new HIV infections among young women: a systematic review protocol. **Systematic Reviews**, v. 8, n. 68, p. 1–6, 2019.

CHOJNACKI, J.; EGGELING, C. Super-resolution fluorescence microscopy studies of human immunodeficiency virus. **Retrovirology**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2018.

CHRISTGEN, S.; PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T. D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. **Cell Research**, v. 30, n. 4, p. 315–327, 2020.

COELHO, A. V. C. et al. Antiretroviral therapy immunologic non-response in a Brazilian population: association study using pharmaco- and immunogenetic markers. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 392–401, 2018.

COHEN, M. S. **Successful treatment of HIV eliminates sexual transmission**The LancetLancet Publishing Group, , 15 jun. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736>>. Acesso em: 10 ago. 2020

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

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

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

CULLY, M. Protease inhibitors give wings to combination therapy. **Nature Milestones**, v. 14, n. 1, p. 16, 2018.

CUTRELL, J.; JODLOWSKI, T.; BEDIMO, R. The management of treatment-experienced HIV patients (including virologic failure and switches). **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 7, p. 204993612090139, 20 jan. 2020.

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

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

- DE MARTINI, W. et al. Kinases: Understanding Their Role in HIV Infection. **World Journal of AIDS**, v. 9, p. 142–160, 2019.
- DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 1–22, 1 out. 2015.
- DELL'OSTE, V. et al. The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: A key player in the antiviral response. **New Microbiologica**, v. 38, n. 1, p. 5–20, 2015.
- DES JARLAIS, D. C. et al. **HIV infection among persons who inject drugs: Ending old epidemics and addressing new outbreaks** **AIDS** Lippincott Williams and Wilkins, , 27 mar. 2016.
- DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 8–27, 2018.
- DOITSH, G. et al. Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 789–801, nov. 2010.
- DOITSH, G. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509–14, 2014.
- DOITSH, G. **Pyroptosis in HIV Infection: HIV Offense Meets a Fiery Host Defense**, 2016. (Nota técnica).
- DOITSH, G.; GREENE, W. C. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost during HIV Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 3, p. 280–291, 2016.
- DORFLEUTNER, A.; CHU, L.; STEHLIK, C. Inhibiting the inflammasome: one domain at a time. **Physiology & behavior**, v. 265, n. 1, p. 205–216, 2015.
- DU TOIT, A. From Sequence to Attention. **Nature Milestones**, v. 5, n. 1, p. 7, 2018.
- ECLINICALMEDICINE. Four decades of HIV/AIDS—where do we stand? **EClinicalMedicine**, v. 35, p. 100943, 2021.
- ESBJÖRNSSON, J. et al. **HIV-2 as a model to identify a functional HIV cure** **AIDS Research and Therapy** BioMed Central Ltd., , 5 set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12981-019-0239-x>>. Acesso em: 3 ago. 2020
- FANTUZZI, L. et al. Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 24, p. 4869–4886, 1 dez. 2019.
- FAUCI, A. S.; LANE, H. C. Four Decades of HIV/AIDS — Much Accomplished, Much to Do. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 1, p. 1–2, 2020a.
- FAUCI, A. S.; LANE, H. C. Four Decades of HIV/AIDS — Much Accomplished, Much to Do. **New England Journal of Medicine**, v. 6, n. 1, p. 510–512, 2020b.

- FEHERVARI, Z. Origin Story. **Nature Milestones**, v. 7, n. 1, p. 9, 2018.
- FÉVRIER, M.; DORGHAM, K.; REBOLLO, A. CD4 +T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: Role of apoptosis. **Viruses**, v. 3, n. 5, p. 586–612, 2011.
- FOLEY, B. et al. **HIV Sequence Compendium 2018**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2018/sequence2018.pdf>>.
- FORSYTHE, S. S. et al. Twenty years of antiretroviral therapy for people living with hiv: Global costs, health achievements, economic benefits. **Health Affairs**, v. 38, n. 7, p. 1163–1172, 2019.
- FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 8, p. 484–496, 2015.
- FREEMAN, M. L. et al. Cytokines and T-Cell Homeostasis in HIV Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. Suppl 2, p. S51–S57, 2016.
- GAARDBO, J. C. et al. Incomplete immune recovery in HIV infection: Mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- GALLO, R. VIC et al. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. **Science**, v. 224, p. 500–503, 1984.
- GALLOWAY, N. L. K. et al. Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells. **Cell Reports**, v. 12, n. 10, p. 1555–1563, 2015.
- GANGEMI, S. et al. Serum levels of interleukin-18 and s-ICAM-1 in patients affected by psoriasis: Preliminary considerations. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 17, n. 1, p. 42–46, 2003.
- GARCÍA-BERMÚDEZ, M. et al. CARD8 rs2043211 (p.C10X) polymorphism is not associated with disease susceptibility or cardiovascular events in Spanish rheumatoid arthritis patients. **DNA and cell biology**, v. 32, n. 1, p. 28–33, jan. 2013.
- GERMAN ADVISORY COMITEE BLOOD. Human Immunodeficiency Virus (HIV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 203–222, 2016.
- GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter : a possible role of polymorphisms in expression regulation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 112, p. 146–152, 2001.

- GIROIR, B. P. The time is now to end the HIV epidemic. **American Journal of Public Health**, v. 110, n. 1, p. 22–24, 2020.
- GREENBLATT, R. et al. Genetic and clinical predictors of CD4 lymphocyte recovery during suppressive antiretroviral therapy: Whole exome sequencing and antiretroviral therapy response phenotypes. 2019.
- GU, J. et al. SNP rs2043211 (p.C10X) in CARD8 Is Associated with Large-Artery Atherosclerosis Stroke in a Chinese Population. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, p. 276–283, 2021.
- HACHIM, M. Y. et al. Pyroptosis: The missing puzzle among innate and adaptive immunity crosstalk. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 323–338, 2020.
- HALL, O. J.; KLEIN, S. L. Progesterone-based compounds affect immune responses and susceptibility to infections at diverse mucosal sites. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 5, p. 1097–1107, 2017.
- HE, S.; WU, Y. Relationships Between HIV-Mediated Chemokine Coreceptor Signaling, Cofilin Hyperactivation, Viral Tropism Switch and HIV-Mediated CD4 Depletion. **Current HIV Research**, v. 17, n. 6, p. 388–396, 8 nov. 2019.
- HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 12, p. 1012–1021, 2016.
- HEIL, M.; BROCKMEYER, N. H. Self-DNA Sensing Fuels HIV-1-Associated Inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 11, p. 941–954, 2019.
- HITOMI, Y. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin- induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 4, p. 779- 785.e6, 2009.
- HOVE-SKOVSGAARD, M. et al. Impact of Age and HIV Status on Immune Activation, Senescence and Apoptosis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2441, 30 set. 2020.
- ICTV. **Retroviridae - Reverse Transcribing DNA and RNA Viruses**. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt\\_viruses/161/retroviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae)>. Acesso em: 3 ago. 2020.
- ISGRÒ, A. et al. Altered Clonogenic Capability and Stromal Cell Function Characterize Bone Marrow of HIV-Infected Subjects with Low CD4 + T Cell Counts Despite Viral Suppression during HAART. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 1902–10, 2008.
- ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes

- escapes the restriction. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 1, p. R52, 2014.
- JACOBSON, K.; OGBUAGU, O. Integrase inhibitor-based regimens result in more rapid virologic suppression rates among treatment-naïve human immunodeficiency virus-infected patients compared to non-nucleoside and protease inhibitor-based regimens in a real-world clinical setting: A retrospective cohort study. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 43, 1 out. 2018.
- JESUS, D. et al. Genotoxic and Cytotoxic Effects of Antiretroviral Combinations in Mice Bone Marrow. p. 1–12, 2016.
- JIANG, Y.; SU, S.; BORNÉ, Y. A meta-analysis of the efficacy of HAART on HIV transmission and its impact on sexual risk behaviours among men who have sex with men. **Scientific reports**, v. 10, n. 1075, p. 1–11, 2020.
- JIN, T.; XIAO, T. S. Activation and assembly of the inflammasomes through conserved protein domain families. **Physiology & behavior**, v. 20, n. 2, p. 151–156, 2015.
- JONSSON, K. L. et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–17, 2017.
- JORAM, S. L. et al. Misdiagnosis of HIV treatment failure based on clinical and immunological criteria in Eastern and Central Kenya. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 383, 2017.
- JUNQUEIRA, D. M.; DE MATOS ALMEIDA, S. E. **HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic** Virology Academic Press Inc., , 1 ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.05.003>>. Acesso em: 3 ago. 2020
- KADI, F. A. et al. The association of rs187238, rs1946518 and rs1946519 IL-8 polymorphisms with acute kidney injury in preterm infants. **BioMedicine (Taiwan)**, v. 11, n. 4, p. 43–50, 2021.
- KALIDASAN, V.; THEVA DAS, K. Lessons Learned From Failures and Success Stories of HIV Breakthroughs: Are We Getting Closer to an HIV Cure? **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, 2020.
- KAMADA, A. J. et al. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 109, n. 7, p. 957–960, 2014.
- KANEKO, N. et al. The role of interleukin-1 in general pathology. **Inflammation and Regeneration**, v. 39, n. 1, p. 1–16, 2019.
- KAPLANSKI, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis.



**Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 138–153, 2018.

KARED, H. et al. Immunological history governs human stem cell memory CD4 heterogeneity via the Wnt signaling pathway. **Nature Communications**, v. 11, n. 821, p. 1–17, 2020.

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

KASSA, G. M. Mother-to-child transmission of HIV infection and its associated factors in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 216, 10 maio 2018.

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

KELLEY, N. et al. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 1–24, 2019.

KEMNIC, T. R.; GULICK, P. G. **HIV Antiretroviral Therapy**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30020680>>. Acesso em: 13 ago. 2020.

KEMNIC, T. R.; GULICK, P. G. **HIV Antiretroviral Therapy**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513308/>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

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

KESAVARDHANA, S.; MALIREDDI, R. K. S.; KANNEGANTI, T. D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. **Annual Review of Immunology**, v. 38, p. 567–595, 2020.

KETELUT-CARNEIRO, N.; FITZGERALD, K. A. Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 4, 2022.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626–638, 2016.

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

KONG, W.-H. et al. Estimation of the Seroconversion Duration of HIV-1 Antibodies in Individuals With Recent Infection in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN,

p. 1322, 12 jun. 2019.

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

KURIAKOSE, T.; KANNEGANTI, T.-D. Pyroptosis in Antiviral Immunity. p. 1–19, 2019.

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

LEAL, V. N. C.; REIS, E. C.; PONTILLO, A. Inflammasome in HIV infection: Lights and shadows. **Molecular Immunology**, v. 118, n. July 2019, p. 9–18, 2020.

LEE, C. Options for the treatment of HIV: A review claire lee. **Pharmacy Today**, v. 21, p. 60–61, 2015.

LEE, D. J. et al. Regulation and function of the caspase-1 in an inflammatory microenvironment. v. 135, n. 8, p. 289–313, 2015.

LEVY, J. A. et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v. 225, n. 4664, p. 840–842, 1984.

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

LI, J. Z. et al. Antiretroviral Therapy Reduces T-cell Activation and Immune Exhaustion Markers in Human Immunodeficiency Virus Controllers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 02139, n. 8, p. 1636–1642, 2020.

LI, Y. F. et al. Analyses of caspase-1-regulated transcriptomes in various tissues lead to identification of novel IL-1 $\beta$ -, IL-18- and sirtuin-1-independent pathways. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2017.

LIU, Q. et al. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Molecular Immunology**, v. 103, p. 115–124, 1 nov. 2018.

LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. 2017.

LIU, X.; LIEBERMAN, J. **A Mechanistic Understanding of Pyroptosis : The Fiery Death Triggered by Invasive Infection**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 135

LOTTER, H. et al. Sex differences in immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 41, p. 133–135, 2019.

LU, F. et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 4, p. 3207–3221, 2020.

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

**Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

LUO, X. et al. Bystander cd4 t-cell death is inhibited by broadly neutralizing anti-hiv antibodies only at levels blocking cell-to-cell viral transmission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 4, p. 101098, 2021.

LV, Z.; CHU, Y.; WANG, Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. 2015.

M. ZIEGLER, S. et al. Human pDCs display sex-specific differences in type I interferon subtypes and interferon  $\alpha/\beta$  receptor expression. **European journal of immunology**, v. 47, n. 2, p. 251–256, 1 fev. 2017.

MA, Z.; NI, G.; DAMANIA, B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. **Annual Review of Virology**, v. 5, p. 341–362, 2018.

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

MAGALIS, B. R. et al. Evaluation of global HIV/SIV envelope gp120 RNA structure and evolution within and among infected hosts. **Virus Evolution**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2018.

MAILLER, E. et al. **The life-cycle of the HIV-1 gag–RNA complex** Viruses MDPI AG, , 10 set. 2016. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/viruses](http://www.mdpi.com/journal/viruses)>. Acesso em: 7 ago. 2020

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

MANOTO, S. L. et al. Point of care diagnostics for HIV in resource limited settings: An overview. **Medicina (Lithuania)**, v. 54, n. 1, p. 1–14, 2018.

MANTOVANI, A. et al. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 778–795, 2019.

MARCHESAN, J. T. et al. Common Polymorphisms in *IFI16* and *AIM2* Genes Are Associated With Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 7, p. 663–672, 2017.

MÁRQUEZ, E. J. et al. Sexual-dimorphism in human immune system aging. **Nature Communications**, v. 11, n. 751, p. 1–17, 2020.

MARSH, K. et al. Global, regional and country-level 90-90-90 estimates for 2018:

- Assessing progress towards the 2020 target. **Aids**, v. 33, n. April 2019, p. S213–S226, 2019.
- MARTINEZ-VESGA, J. Editing a Cure. **Nature Milestones**, v. 18, n. 1, p. 20, 2018.
- MCHUGH, J. A tap and drain: sinking CD4 + T cells. **Nature Communications**, v. 13, p. 2018, 2018.
- MCKENZIE, B. A.; DIXIT, V. M.; POWER, C. Fiery Cell Death: Pyroptosis in the Central Nervous System. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 1, p. 55–73, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças** Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l.: s.n.].
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. Boletim Epidemiológico HIV / Aids | 2019. 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL. **Boletim Epidemiológico HIV / Aids | 2021** Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l.: s.n.].
- MOHAMAD, N. V. et al. The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. **Aging Male**, v. 22, n. 2, p. 129–140, 2019.
- MOLLA, M. D. et al. Caspase-1 as a regulatory molecule of lipid metabolism. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2020.
- MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T-cells Abortively Infected with HIV. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 428–432, 2014.
- MORAN, J. A.; TURNER, S. R.; MARSDEN, M. D. Contribution of Sex Differences to HIV Immunology, Pathogenesis, and Cure Approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. May, p. 1–8, 2022.
- MOREL, J. C. M. et al. A Novel Role for Interleukin-18 in Adhesion Molecule Induction through NFkB and Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase-dependent Signal Transduction Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 37069–37075, 2001.
- MUÑOZ-ARIAS, I. et al. Blood-Derived CD4 T Cells Naturally Resist Pyroptosis during Abortive HIV-1 Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 4, p. 463–470, 2015.
- NAGATA, S. et al. Evolutionary analysis of HIV-1 pol proteins reveals representative residues for viral subtype differentiation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–10, 2017.
- NAQVI, S. et al. Conserved microRNA targeting reveals preexisting gene dosage sensitivities that shaped amniote sex chromosome evolution. 2018.
- NISHIBORI, M.; TAKAHASHI, H. K.; MORI, S. The Regulation of ICAM-1 and LFA-1 Interaction by Autacoids and Statins: a Novel Strategy for Controlling Inflammation and Immune Responses. **J Pharmacol Sci**, v. 92, p. 7–12, 2003.

- NOMURA, R. et al. Azidothymidine-triphosphate impairs mitochondrial dynamics by disrupting the quality control system. **Redox Biology**, v. 13, p. 407–417, 1 out. 2017.
- NOVICK, D. et al. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 439–448, 2013.
- NOVIKOVA, M. et al. Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 2, p. 119–134, 2019.
- OFFENBACHER, S. et al. Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 10, p. 2113–2129, 2016.
- OKAY, G. et al. The Effect of Antiretroviral Therapy on IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  Levels and their Relationship with HIV-RNA and CD4+ T Cells in HIV Patients. **Current HIV Research**, v. 18, n. 5, p. 354–361, 12 jul. 2020.
- OLIVEIRA, A. et al. Interleukin-1  $\beta$  genotype and circulating levels in cancer patients : Metastatic status and pain perception. **Clinical Biochemistry**, p. 5–9, 2014.
- ORTIZ-FERNÁNDEZ, L. et al. Variants of the IFI16 gene affecting the levels of expression of mRNA are associated with susceptibility to Behet disease. **Journal of Rheumatology**, v. 42, n. 4, p. 695–701, 2015.
- PAIM, A. C.; BADLEY, A. D.; CUMMINS, N. W. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte regulated cell death. **AIDS Research and Human Retroviruses**, n. 507, p. 1–36, 2020.
- PANDEY, D.; CHOUHAN, U.; VERMA, N. HIV infection: A review of their inhibitors progression. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 10, n. 2, p. 749–758, 2017.
- PARAMEL, G. V.; SIRSJÖ, A.; FRANSÉN, K. Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- PAREKH, B. S. et al. **Diagnosis of human immunodeficiency virus infection** *Clinical Microbiology Reviews* American Society for Microbiology, , 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00064-18>>. Acesso em: 10 ago. 2020
- PARK, H. H. Caspase recruitment domains for protein interactions in cellular signaling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 3, p. 1119–1127, 2019.
- PASTERNAK, A. O. et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based combination antiretroviral therapy is associated with lower cell-associated hiv rna and dna levels as compared with therapy based on protease inhibitors. **eLife**, v. 10, p. 1–

21, 2021.

PEARCE, C. L. et al. Pharmacogenetic Associations with ADME Variants and Virologic Response to an Initial HAART Regimen in HIV-Infected Women. **International Journal of HIV/AIDS and Research**, v. 4, n. 3, p. 149–155, 5 set. 2017.

PEDRO, K. D.; HENDERSON, A. J.; AGOSTO, L. M. Mechanisms of HIV-1 cell-to-cell transmission and the establishment of the latent reservoir. **Virus Research**, v. 265, n. February, p. 115–121, 2019.

PFAENDER, S. et al. Prevention strategies for blood-borne viruses-in the Era of vaccines, direct acting antivirals and antiretroviral therapy. **Reviews in medical virology**, v. 26, p. 330–339, 2016.

PICCALUGA, P. P. et al. Interferon gamma inducible protein 16 (IFI16) expression is reduced in mantle cell lymphoma. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02643, 2019.

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

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

PRABHU, S.; HARWELL, J. I.; KUMARASAMY, N. Advanced HIV: diagnosis, treatment, and prevention. **The Lancet HIV**, v. 6, n. 8, p. e540–e551, 2019.

PULUGULLA, S. H. et al. Distinct Mechanisms Regulate IL1B Gene Transcription In Lymphoid CD4 T Cells and Monocytes. **Cytokine**, v. 111, p. 373–381, 2018.

PURI, R. V. et al. Notch4 activation aggravates NF-κB-mediated inflammation in HIV-1-associated nephropathy. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 12, n. 12, 2019.

RB-SILVA, R. et al. Thymic fuction as a predictor of immune recovery in chronically HIV-infected patients initiating antiretreoviral therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, p. 25, 2019.

RECHTIEN, A.; ALTFELD, M. Sexual dimorphism in HIV-1 infection. **Seminars in Immunopathology**, v. 41, p. 195–202, 2019.

ROBB, M. L.; ANANWORANICH, J. **Lessons from acute HIV infection** *Current Opinion in HIV and AIDS* Lippincott Williams and Wilkins, , 1 out. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5642316/?report=abstract>. Acesso em: 11 ago. 2020

ROBERTS, R. L. et al. Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3

- rs35829419 in Crohn ' s disease. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 351–356, 2010.
- RODGER, A. J. et al. Articles Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. **The Lancet**, v. 393, p. 2428–2438, 2019.
- RUGGIERI, A. et al. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. **Ann Ist Super Sanità**, v. 52, n. 2, p. 198–204, 2016.
- RUTSTEIN, S. E. et al. Clinical and public health implications of acute and early HIV detection and treatment: a scoping review. **Journal of the International AIDS Society**, v. 20, n. 1, p. 21579, 1 jan. 2017.
- SAHANI, S. K.; YASHI. Effects of eclipse phase and delay on the dynamics of HIV infection. **Journal of Biological Systems**, v. 26, n. 3, p. 421–454, 1 set. 2018.
- SANDSTRÖM, E. G.; KAPLAN, J. C. Antiviral therapy in AIDS. Clinical pharmacological properties and therapeutic experience to date. **Drugs**, v. 34, n. 3, p. 372–90, set. 1987.
- SANT, A. J.; MCMICHAEL, A. Revealing the role of CD4+ T cells in viral immunity. **J. Exp. Med**, v. 209, n. 8, p. 1391–1395, 2012.
- SAÚDE/PERNAMBUCO, S. DE. **HIV e Aids**. [s.l.: s.n.].
- SCHMID, S. The discovery of HIV-1. **Nature Milestones**, v. 2, n. 1, p. 4, 2018.
- SCHURZ, H. et al. The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. **Human Genomics**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2019.
- SCULLY, E. P. Sex Differences in HIV Infection. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 15, n. 2, p. 136–146, 2018.
- SCULLY, E. P. et al. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. **Nature Reviews Immunology** 2020 20:7, v. 20, n. 7, p. 442–447, 11 jun. 2020.
- SERTZNIG, H. et al. **Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet****Virology**Academic Press Inc., , 1 mar. 2018.
- SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 617–629, 2016.
- SHOWA, S. P.; NYABADZA, F.; HOVE-MUSEKWA, S. D. On the efficiency of HIV transmission: Insights through discrete time HIV models. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0222574, 2019.

- SHRESTHA, L. B. et al. Co-infection of Hepatitis B and Hepatitis C among HIV-infected patients: A cross-sectional study from tertiary care hospital of eastern Nepal. **PLOS ONE**, v. 17, n. 3, p. e0264791, 1 mar. 2022.
- SILVA, A. F. C.; CUETO, M. HIV/AIDS, its stigma and history. **História, Ciência, Saúde**, v. 25, p. 315–318, 2018.
- SINGH, S. Impact of Cytokine Gene Polymorphism on the HIV-1 Disease Progression and Response to Therapy. **Journal of AIDS & Clinical Research**, v. 06, n. 10, 2015.
- SOBKOWIAK, P. et al. Interleukin 1 $\beta$  polymorphism and serum level are associated with pediatric asthma. **Pediatric Pulmonology**, v. 52, n. 12, p. 1565–1571, 2017.
- SOKOYA, T. et al. HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–16, 2017.
- SONG, W. et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. 2015.
- SOUYRIS, M. et al. Female predisposition to TLR7-driven autoimmunity: gene dosage and the escape from X chromosome inactivation. **Seminars in Immunopathology** **2018 41:2**, v. 41, n. 2, p. 153–164, 1 out. 2018.
- SOZZANI, S. et al. Editorial: Sex Hormones and Gender Differences in Immune Responses Editorial on the Research Topic Sex Hormones and Gender Differences in Immune Responses. **Frontiers in Immunology** | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org), v. 1, p. 1076, 2019.
- STARLING, S. The levee breaks — initial reports of AIDS. **Nature Milestones**, v. 1, n. 1, p. 3, 2018.
- STRUTT, T. M.; MCKINSTY, K. K.; SWAIN, S. L. Control of Innate Immunity by Memory CD4 T Cells. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.: s.n.]. v. 780p. 57–68.
- SWAIN, S. L.; MCKINSTY, K. K.; STRUTT, T. M. Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 136–148, 2012.
- TAABAZUING, C. Y.; GRISWOLD, A. R.; BACHOVCHIN, D. A. The NLRP1 and CARD8 inflammasomes. **Immunological Reviews**, v. 297, n. 1, p. 13–25, 2020.
- TAKAHASHI, T. et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. **Nature**, v. 588, n. 7837, p. 315, 10 dez. 2020.
- TARNOWSKI, M. et al. IL16 and IL18 gene polymorphisms in women with gestational diabetes. **Ginekologia Polska**, v. 88, n. 5, p. 249–254, 2017.
- TASSACHEW, Y. et al. Prevalence of HIV and Its Co-Infection with Hepatitis B/C Virus Among Chronic Liver Disease Patients in Ethiopia. 2022.



- TAVARES, N. A. C. et al. Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine**, v. 62, n. 2, p. 286–289, 2013.
- THE LANCET. 40 years of HIV/AIDS: a painful anniversary. **The Lancet**, v. 397, n. 10290, p. 2125, 2021.
- THIAGO DE MELLO. Poesia comprometida com a minha e a tua vida. **Civilização Brasileira**, v. 2, 1975.
- TORIBIO, M. et al. Effects of Integrase Inhibitor-Based ART on the NLRP3 Inflammasome Among ART-Naïve People With HIV. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, n. 10, p. 1–5, 2020.
- TRISTRAM-NAGLE, S. Physics of HIV. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 51, n. 18, 2018.
- TSUKAMOTO, T. HIV impacts CD34+ progenitors involved in T-cell differentiation during coculture with mouse stromal OP9-DL1 cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 81, 2019.
- UCHIDA, T. et al. IL-18 time-dependently modulates Th1/Th2 cytokine production by ligand-activated NKT cells. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 4, p. 966–977, abr. 2007.
- UNAIDS. 90-90-90 An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. p. 40, 2014.
- UNAIDS. **UNAIDS DATA 2020**. [s.l.: s.n.].
- UNAIDS. **Seizing the momentUNAIDS**. [s.l.: s.n.].
- UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **Prevailing against pandemics by putting people at the centre. World AIDS day report**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/prevailing-against-pandemics>>.
- UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **UNAIDS data 2021**. [s.l.: s.n.].
- UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **Global Commitments, Local Action**. [s.l.: s.n.].
- VALDÉS RUBIO, E.; GUIÑEZ GAHONA, R. Vertical Transmission of HIV — Medical Diagnosis, Therapeutic Options and Prevention Strategy. In: **Trends in Basic and Therapeutic Options in HIV Infection - Towards a Functional Cure**. [s.l.] InTech, 2015.

VALENZUELA, F. et al. Identification of il-18 and soluble cell adhesion molecules in the gingival crevicular fluid as novel biomarkers of psoriasis. **Life**, v. 11, n. 10, p. 1–12, 2021.

VEERANKI, S.; CHOUBEY, D. Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: Regulation of subcellular localization. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012.

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

VITORIA, M. et al. Current and future priorities for the development of optimal HIV drugs. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 14, n. 2, p. 143–149, 2019.

WHO. **Point-of-care CD4 tests to support the identification of individuals with advanced HIV disease, 03 April 2020.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331681>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHAT'S NEW IN TREATMENT MONITORING: VIRAL LOAD AND CD4 TESTING.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.who.int/hiv](http://www.who.int/hiv)>. Acesso em: 10 set. 2020a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **MANAGING ADVANCED HIV DISEASE AND RAPID INITIATION OF ANTIRETROVIRAL THERAPY.** [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **UPDATE OF RECOMMENDATIONS ON FIRST- AND SECOND-LINE ANTIRETROVIRAL REGIMENS.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>. Acesso em: 15 ago. 2020a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV Drug Resistance Report.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://scholar.google.com/scholar/Who hiv drug resistance report 2012](http://scholar.google.com/scholar/Who+hiv+drug+resistance+report+2012)>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2020 - Monitoring Health for the SDGs.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.02.027%0Ahttps://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/%0A???>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/worldhealthstatistics\\_2022.pdf?sfvrsn=6fbb4d17\\_3](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/worldhealthstatistics_2022.pdf?sfvrsn=6fbb4d17_3)>.

WU, Z.; WU, S.; LIANG, T. Association of NLRP3 rs35829419 and rs10754558 Polymorphisms With Risks of Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Analysis. Front. Genet**, v. 12, p. 690860, 2021.

- XIA, H. et al. Elevated Level of CD4+ T Cell Immune Activation in Acutely HIV-1-Infected Stage Associates With Increased IL-2 Production and Cycling Expression, and Subsequent CD4+ T Cell Preservation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 9, 2018.
- XIAO, T. S. The nucleic acid-sensing inflammasomes. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 103–111, 2015.
- YAMADA, D. H. et al. Overcoming CD4 Th1 Cell Fate Restrictions to Sustain Antiviral CD8 T Cells and Control Persistent Virus Infection. **Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 3286–3296, 2016.
- YANG, X. et al. Incomplete immune reconstitution in HIV / AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. **Journal of leukocyte biology**, v. 107, p. 597–612, 2020a.
- YANG, X. et al. Incomplete immune reconstitution in HIV / AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. n. October 2019, p. 1–16, 2020b.
- YANG, Y. et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 in inflammasome activation and its inhibitors. **Cell Death and Disease**, 2019.
- YASUDA, K.; NAKANISHI, K.; TSUTSUI, H. Interleukin-18 in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.
- YELWA, A. A. et al. Evaluation of serum sex hormones and CD4+ count among HIV patients on HAART, HAART naive patients and apparently healthy subjects in Sokoto, Nigeria. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 891–895, 2020.
- YI, M. et al. rs2043211 polymorphism in *CARD8* is not associated with Tourette syndrome in a family-based association study in the Chinese Han population. **The International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 49, n. 3, p. 208–214, 28 abr. 2015.
- YOUNAS, M. et al. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. **HIV Medicine**, v. 17, n. 2, p. 89–105, 1 fev. 2016.
- YU, A. et al. TRIM5 $\alpha$  self-assembly and compartmentalization of the HIV-1 viral capsid. **Nature Communications** 2020 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–10, 11 mar. 2020.
- YU, Y. et al. Relationship of genetic polymorphisms in CTLA-4 and IL-18 with viral hepatitis: Evidence from a meta-analysis. **Epidemiology and Infection**, 2019.
- ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Inflammasome activation and regulation:

toward a better understanding of complex mechanisms. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, 2020.

ZHU, Q.; KANNEGANTI, T.-D. Distinct regulatory mechanisms control proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1 $\beta$ . **Physiology & behavior**, v. 198, n. 11, p. 4210–4215, 2017.

## 5 APÊNDICES

### APÊNDICE A – *IL18* GENE POLYMORPHISM AND ITS INFLUENCE ON CD4+ T-CELL RECOVERY IN HIV-POSITIVE PATIENTS RECEIVING ANTIRETROVIRAL THERAPY

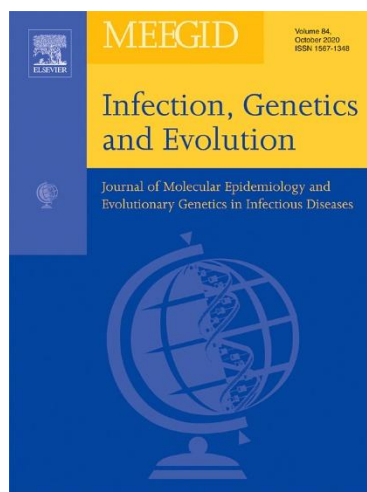
José Leandro Andrade-Santos<sup>a,b,\*</sup>, Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>b</sup>, Antônio Victor Campos Coelho<sup>b</sup>, Fabrício Oliveira Souto<sup>b</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>, Lucas André Cavalcanti Brandão<sup>b,c</sup>, Rafael Lima Guimarães<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Genetics, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup>Department of Pathology, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

\*Corresponding author at: Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 2126-8484; Fax: +55 81 2126-8485. *E-mail address:* [jlandrades19@gmail.com](mailto:jlandrades19@gmail.com)



**Infection, Genetics and Evolution (ISSN 1567-1348)**



Contents lists available at ScienceDirect

## Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

## Research Paper

IL18 gene polymorphism and its influence on CD4<sup>+</sup> T-cell recovery in HIV positive patients receiving antiretroviral therapy

José Leandro Andrade-Santos<sup>a,b,\*</sup>, Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>b</sup>,  
Antonio Victor Campos Coelho<sup>b</sup>, Fabrício Oliveira Souto<sup>b</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>, Lucas André  
Cavalcanti Brandão<sup>b,c</sup>, Rafael Lima Guimarães<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Genetics, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil <sup>b</sup> Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil <sup>c</sup> Department of Pathology, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

## ARTICLE INFO

Keywords:  
AIDS  
ART  
HIV-1  
Immunological recovery failure  
Cell death  
Pyroptosis

## ABSTRACT

**Background:** Pyroptosis has been reported to be critical in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pathogenesis and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) progression. Even after achieving viral suppression to undetectable levels during antiretroviral therapy (ART), exacerbated CD4<sup>+</sup> T-cell death by pyroptosis has been suggested as one of the main causes of immunological non-response. Thus, variants in genes of pyroptosis pathway were studied in individuals with poor CD4<sup>+</sup> T-cell reconstitution under antiretroviral therapy against HIV-1.

**Methods:** 248 virologically suppressed ART-treated patients, 126 immunological non-responders (INR) and 122 immunological responders (IR) were recruited. Genotyping was performed using TaqMan probe-based real-time PCR platform. Genotype-guided flow cytometry analysis with general and recent thymic emigrant (RTE) CD4<sup>+</sup> T-cells in pyroptosis was performed based on associated polymorphisms.

**Results:** Both IL18 rs187238 G allele and GG genotype were associated as protection factors against poor CD4<sup>+</sup> T-cell recovery (OR = 0.22; 95%CI = 0.50–0.77; P = .010 and OR = 0.58; 95%CI = 0.36–0.93; P = .022, respectively). It was demonstrated a statistical association between IL18 rs187238 genotypes of ART-treated patients and death by Caspase-1 levels (P = .020). The GG genotype showed lower pyroptotic RTE CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes levels in the ART-treated groups comparing with CC (P = .029) and CG (P = .018) genotypes, suggesting that the G allele presence may be related to a lower IL-18 production and thus reduced dead CD4<sup>+</sup> T-cells levels by Caspase-1.

**Conclusion:** We observed that IL18 G variant allele and genotype were associated with a better immunological response, which may influence on immunological recovery of HIV-positive patients receiving antiretroviral therapy, and low Caspase-1 activity levels was observed on GG genotype when compared CC genotypes.

## 1. Introduction

It is widely known that approximately 30% of patients achieving plasma human immunodeficiency virus (HIV) load suppression do not recover their CD4<sup>+</sup> T-cell levels during antiretroviral therapy (ART). These ART-treated patients are defined as immunological non-responders (Aiuti and Mezzaroma, 2006; Li et al., 2011). Despite being considered a multifactorial condition, poor CD4<sup>+</sup> T-cell reconstitution has been associated with two main mechanisms: reduced CD4<sup>+</sup> T-cells production and exacerbated cell death of these lymphocytes (Corbeau and Reynes, 2011; Gaardbo et al., 2012).

Pyroptosis is inflammatory programmed cell death, mainly mediated by caspase-1, that has emerged as an important mechanism of innate immunity against pathogens (Boucher et al., 2016; Jorgensen and Miao, 2015). The main activation pathway of caspase-1 occurs through inflammasome, a signaling protein complex assembled in response to cell disorders or intracellular pathogens. Several types of inflammasome are able to activate caspase-1 but, specifically in HIV-1 infection, the NLRP3 and IFI16 inflammasomes are the major signaling pathways into cells that recognize this virus in the early stages of its replicative cycle and prevent cell infection, called non-permissive cells. Both IFI16 and NLRP3 sensors connect to caspase-1 via ASC, an adapter

\* Corresponding author at: Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail addresses: [jlandrades19@gmail.com](mailto:jlandrades19@gmail.com), [leandr\\_andrad@hotmail.com](mailto:leandr_andrad@hotmail.com) (J.L. Andrade-Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103997>

Received 18 May 2019; Received in revised form 27 July 2019; Accepted 6 August 2019 Available online 08 August 2019

1567-1348/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domain) region that promote the interaction. Among CARDs variety, studies have demonstrated that CARD8 acts as a negative regulator of the NLRP3 inflammasome, thus dampening NF- $\kappa$ B, with consequent absence of caspase-1 activation (Ito et al., 2014; Kesavardhana and Kanneganti, 2017; Miao, 2011). Once caspase-1 is activated, the cleavage of the pro-IL-1B and pro-IL-18 molecules occurs, converting them into active proinflammatory cytokines, resulting in an inflammatory process following HIV infection (Kesavardhana and Kanneganti, 2017; Man et al., 2017; Miao, 2011).

In HIV-1 infection, it is believed that pyroptosis presents as a pathogenic vicious cycle, in which inflammatory stimuli are released, recruiting more cells to the sites of infection thus promoting augmented cell death (Doitsh et al., 2014). Hence, the activation of the pyroptosis pathway turns out to be a form of chronic immune activation in lymphoid tissues, contributing to the progression to AIDS (Doitsh and Greene, 2016; Gaiha and Brass, 2014).

In this study, we evaluated SNPs in CARD8, NLRP3, IL1B, IL18 and IFI16 genes involved in the pyroptosis pathway, aimed at finding a possible association with poor immune recovery of CD4 + T cells in subjects living with HIV submitted to antiretroviral therapy.

## 1. Methodology

### 1.1. Study population

The study population consisted of 248 HIV-positive patients (107 males and 141 females) under ART enrolled at Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Pernambuco state (Northeast Brazil), between 2011 and 2014. The subjects were recruited according to the following inclusion criteria: age over 18 years old, on ART for at least one year with prolonged undetectable viral load (< 50 copies/mL), good adherence to treatment; and exclusion criteria: pregnancy, autoimmune diseases and history of injecting drug use. Sociodemographic and clinical data were collected from medical records: age and body mass at ART start date; time until ART start after HIV infection tests; ART regimens received (2NRTI + PI/r or 2NRTI + NNRTI regimens, as recommended by the Brazilian guidelines available at the time of patient recruitment); pre- and post-treatment viral loads as well as CD4+ T-cell counts; and serological data regarding co-infections (hepatitis B virus – HBV, hepatitis C virus – HCV, syphilis, cytomegalovirus – CMV, toxoplasmosis, human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II)). All patients answered standard questionnaires and signed written informed consent, providing blood samples for genetic and immunological analyses. The IMIP Research Ethics Committee approved this study (protocol number: 3629-13)

### 1.2. Determination of study groups

The ART-treated patients, who had persistently undetectable plasma HIV concentration (< 50 copies/mL) during the first year of therapy, were classified according to gains in CD4+ T cell counts or percentages. Patients that gained < 200 CD4+ T-cells/ $\mu$ L compared with pretreatment count or presented T-cell percentages in relation to total lymphocytes < 30% (if absolute counts were not available) after the first year of ART were classified as immunological non-responders (INR) (adapted from (Li et al., 2011)). All others subjects were defined as immunological responders (IR).

### 1.3. Selection of single base polymorphisms (SNPs)

The SNPs selection was based on the literature, functional characteristics and minor allele frequency (MAF) > 10% in European, Amerindian and African populations, which reflect the Brazilian genetic admixture (Coelho et al., 2015). Thus, five SNPs in pyroptosis pathway genes were evaluated: NLRP3 (rs10754558 C > G, MAF: 0.35) inflammasome activator; CARD8 (rs2043211 A > T, MAF: 0.32) – molecular adapter; IL1B (rs1143634 G > A, MAF: 0.13)

and IL18 (rs187238 C > G, MAF: 0.21) – effector molecules; and IFI16 (rs6940 A > T, MAF: 0.23) – intracellular DNA sensor. SNPs selection was performed using NCBI dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) and 1000 Genomes Project Browser (<http://browser.1000genomes.org>).

### 1.4. Sampling and DNA extraction

Peripheral blood sample (4 mL) was collected from all ART-treated patients in EDTA tubes for genomic DNA extraction using mini salting out protocol (Miller et al., 1988) with “in-house” modifications. DNA quantification and purity were assessed using the Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (ThermoFisher) spectrophotometer, considering absorbance values: 260/280 nm and 260/230 nm ratios.

Genotyping was performed using TaqMan® allele-specific probes: NLRP3 rs10754558 (C\_\_26052028\_10), CARD8 rs2043211 (C\_\_11708080\_1), IL18 rs187238 (C\_\_2408543\_10), IL1B rs1143634 (C\_\_9546517\_10) and IFI16 rs6940 (C\_\_7483779\_10); on ABI® realtime platform 7500 (Applied Biosystems) using protocols recommended by the manufacturer.

### 1.5. Genotype-guided flow cytometry analysis

Flow cytometric analysis was performed according to IL18 rs187238 polymorphism genotypes, the only one associated with immunological non-response. The Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by Ficoll-Paque density gradient technique and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS 1 $\times$ ), following manufacturer's guidelines (Healthcare, 2007). Cell viability (> 90% in average) was determined by Trypan blue (0.4%) exclusion test. For pyroptosis detection, we employed FAM-FLICA Caspase-1 (FAM-YVAD-FMK) Assay kit following the manufacturer's instructions (ImmunoChemistry Technologies), and PBMCs were also stained with immunofluorescent monoclonal antibodies APC-CD4 and PE-CD31 (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry using BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences). In this analysis, 20,000 events were acquired and gated to detect death by Caspase-1 CD4+ T-cells (CD4 + FLICA-Caspase1+) and dead recent thymic emigrant CD4+ T-cells by Caspase-1 activation (CD4 + CD31 + FLICA-Caspase1+). Acquired data were analyzed using FCS Express 6 Plus software.

### 1.6. Statistical analysis

Genotypic and allelic frequencies were calculated by direct counting, and  $\chi^2$  test was used to verify the conformity with HardyWeinberg equilibrium. Sample size analyses were performed in the G\*Power® software using post-roc power test. Student's t-test was used to compare means of groups for variables that followed a normal distribution (according to Shapiro-Wilk test), and Wilcoxon-MannWhitney test for variables that do not follow a normal distribution. Fisher exact test was used to assess whether genetic, sociodemographic and clinical variables were associated with INR status. The variables deemed to have clinical importance or reached a p-value  $\leq$  0.20 during univariate analysis were included in the logistic regression analysis. The statistical significance level ( $\alpha$ ) was set at 0.05 for all tests. Statistical analyses were performed using R program, version 3.5.0.

Table 1

Allelic and genotype frequencies of polymorphisms among ART-treated groups (immunological non-responders and immunological responders).

Gene (SNP)	INR n (%)	IR n (%)	OR (95%CI)	p-Value <sup>a</sup>
------------	--------------	-------------	------------	----------------------

NLRP3 rs10754558 (n = 206/248)	Genotypes		Reference	–
	CC	39 (38)		
	CG	48 (47)	0.93	0.88
			(0.49–1.77)	
	GG	16 (15)	1.03	1.00
			(0.42–2.53)	
	Alleles		1 (0.66–1.51)	1.00
	C	126 (61)		
	G	80 (39)		
CARD8 rs2043211 (n = 181/248)	Genotypes		Reference	–
	AA	49 (56)		
	AT	32 (36)	1.56	0.16
			(0.81–3.02)	
	TT	7 (8)	0.97	1.00
			(0.25–3.69)	
	Alleles		1.21	0.41
	A	130 (74)		
	T	46 (26)	(0.74–1.98)	
IL1B rs1143634 (n = 195/248)	Genotypes		Reference	–
	GG	59 (60)		
	GA	35 (35)	0.91	0.88
			(0.48–1.73)	
	AA	5 (5)	0.39	0.44
			(0.03–2.5)	
	Alleles		0.81	0.46
	G	153 (77)		
	A	45 (23)	(0.48–1.36)	
IL18 rs187238 (n = 193/248)	Genotypes		Reference	–
	CC	60 (60)		
	CG	36 (36)	0.84	0.64
			(0.44–1.61)	
	GG	4 (4)	0.22	0.010
			(0.50–0.77)	
	Alleles		0.58	0.022
	C	156 (78)		
	G	44 (22)	(0.36–0.93)	
IFI16 rs6940 (n = 187/248)	Genotypes		Reference	–
	AA	62 (64)		
	AT	66 (73)	0.62	0.19
			(0.30–1.23)	
	TT	3 (3)	0.94	1.00
			(0.12–7.28)	
	Alleles		0.72	0.27
	A	156 (80)		
	T	38 (19)	(0.40–1.29)	

INR = Immunological non-responders; IR = Immunological Responders; OR = Odds Ratio; SNP = Single Nucleotide Polymorphism.  
a Fisher's Exact Test.

## 1. Results

### 1.1. Genotype analysis

A total of 248 virologically suppressed patients living with HIV were recruited for this study. Thus, 126 ART-treated patients (62 males and 64 females) were classified as INR, whereas the remaining 122 subjects (45 males and 77 females) were included in the IR group; the median age at the beginning of therapy in both groups was 32 years (28.5–37.5). Population characterization data are shown in Supplementary Table 1.

Five variants of genes involved in cell death pathway by pyroptosis (NLRP3, CARD8, IL1B, IL18 and IFI16) were genotyped (Table 1). Genotypes distribution was consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium for all the variants analyzed. The post-hoc power tests for all genes was > 80%, where the sampled N of the population has shown representative for the analysis.

The NLRP3 polymorphism (rs10754558) analysis included 206 subjects (INR = 103 and IR = 103 groups). The G allele frequency in the both groups was 39%. Fisher's exact test showed that there was no association of neither G variant allele (OR = 1.00; 95%CI = 0.66–

1.51; P = 1.00) nor GG genotype (OR = 1.03; CI-95% = 0.42–2.53; P = 1.00) with immunological recovery failure in the analyzed population. The CARD8 rs2043211 polymorphism also showed no association with poor CD4 + T-cell reconstitution, either the T allele (OR = 0.97, 95%CI = 0.25–3.69; P = 1.00) or the TT genotype (OR = 1.21, 95%CI = 0.74–1.98, P = .41). The polymorphism frequencies observed in the INR and IR groups were 26% and 30% respectively, being analyzed in 181 individuals (88 immunological nonresponders and 93 immunological responders).

The IL1B (rs1143634) and IFI16 (rs6940) polymorphisms were analyzed in 195 and 187 individuals, respectively. The allelic frequency of variant A (rs1143634 G > A) was 23% in the INRs and 19% in the IR group. Association analysis for this polymorphism did not show correlation between the AA genotype (OR = 0.39; 95%CI = 0.03–2.5; P = .44) and A variant allele (OR = 0.81; 95%CI = 0.48–1.36; P = .46) with immunological recovery failure. For IFI16 gene, the observed T allele (rs6940 A > T) frequencies were 19% in the INR group and 15% in the IR group. The hypothesis that this variant could be associated with immunological recovery failure was not confirmed in our study population: TT genotype (OR = 0.94; 95%CI = 0.12–7.28; P = 1.00) or T variant allele (OR = 0.72; 95%CI = 0.40–1.29; P = .27).

The IL18 (rs187238 C > G) polymorphism analysis demonstrated a G allele frequency of 22% in the immunological non-responders group and 33% in the immunological responders group, among a total of 193 individuals genotyped (100 in the case group and 93 in the control group). According to Fisher test both the GG genotype (OR = 0.22; 95%CI = 0.50–0.77; P = .010) and the G variant allele (OR = 0.58; 95%CI = 0.36–0.93; P = .022) were statistically associated with immune reconstitution as a protection factor against the occurrence of immunological non-response in the ART-treated groups.

### 1.2. Genotype-guided immunophenotypic analysis

The genotype-guided analysis consisted of 29 individuals, 13 immunological non-responders (CC = 01; CG = 05; GG = 07) and 16 immunological responders (CC = 02; CG = 04; GG = 10) (Fig. 1).

When comparing the CD4+/FLICA-Caspase1+ T-cell population, no statistical association (P = .67) was found among the ART-treated groups regarding genotype presence. Despite this, it was observed a lower death CD4+ T-cell levels in the ART-treated individuals carrying the G variant allele.

Regarding recent thymic emigrants (RTE) CD4+ T-cell death by Caspase-1 (CD4+/CD31 + FLICACaspase1+) it was demonstrated statistical association between IL18 genotypes of ART-treated patients and pyroptosis levels (P = .020). An immunological non-responder individual with CC genotype showed higher Caspase-1 RTE CD4+ T-cell levels (99.3%) than individuals carrying GG genotype in the same group (48.1%), as well as comparing with the immunological responders for these genotypes (CC = 53.9%; GG = 50.3%; P = .018). Considering CG and GG genotypes in the ART-treated groups (INR = CG (62.5%) and GG (48.1%) vs IR = CG (32.8%) and GG (50.3%), it was also observed statistically significant difference (P = .029) in relation RTE CD4+ T-cell death by Caspase-1, suggesting that the G allele presence may be related to a lower IL-18 production and thus reduced level of Caspase-1 detection in CD4+ T-cells.

### 1.3. Logistic regression analysis

Even though some clinical variables have not been associated with immunological recovery failure in univariate tests, they were included in the logistic regression analyses together with associated rs187238 (IL18) genotype because of their clinical importance and p-values (Table 2). Others were not included because they showed either not



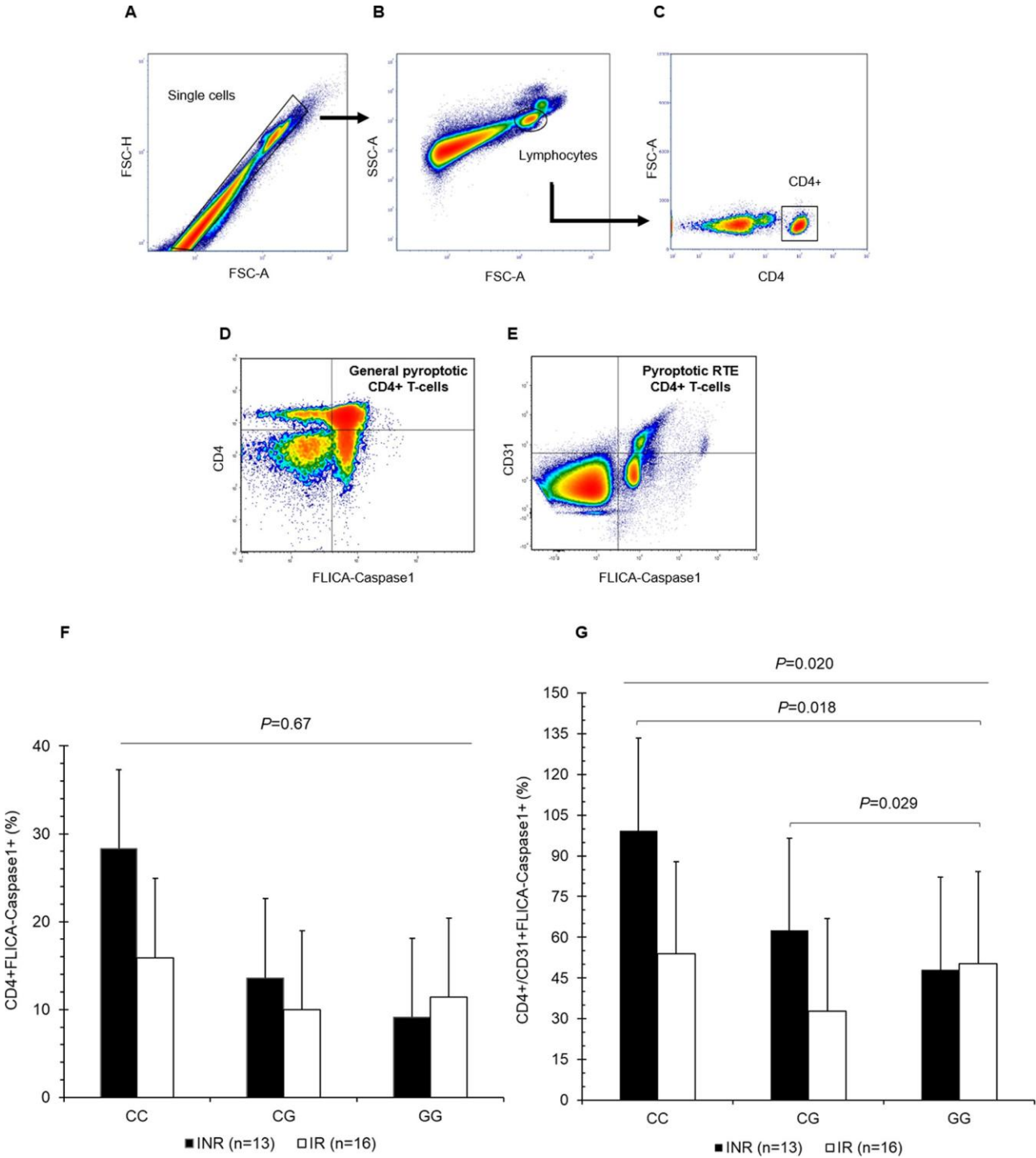


Fig. 1. Pyroptosis levels of CD4 T-cells based on FLICA-Caspase1 activity in ART-treated patients (immunological non-responders – INR and immunological responders – IR). (A) Initial gating was performed to identify single cells. (B) Lymphocytes were selected from singles cells based on forward scatter (FSC) and side scatter (SSC). (C) Cells expressing CD4+ were selected to genotype-guided pyroptosis analyses. (D) Representative flow cytometry plots illustrating the gating strategy for (D) general pyroptotic CD4+ T-lymphocytes (CD4 + FLICA-Caspase1+) and (E) pyroptotic recent thymic emigrants (RTE) CD4+ T-cells (CD4+/ CD31 + FLICA-Caspase1+). Pyroptosis levels of general CD4+ T-cells and RTE CD4+ T-cells are shown in (F) and (G) bar plots, respectively. Mean values, standard deviation, and P value (according to t-test) are shown. FLICA: Fluorescent-Labeled Inhibitors of Caspases.

had good quality and adherence, fitting adequately the data (AUROC = 0.699; Z = -0.452; P = .651) and, thus,

Table 2  
Variables included in a fitted logistic regression model to explain immunological recovery failure of HIV-positive patients receiving antiretroviral therapy.

Variables	Estimate (B) <sup>a</sup>	OR	95% CI	P

rs187238 (IL18) CC genotype	0.0968	1.102	0.425–2.856	0.842
rs187238 (IL18) CG genotype	0.0113	1.011	0.345–2.966	0.984
rs187238 (IL18) GG genotype	–1.8540	0.157	0.027–0.921	0.040
Male sex	0.7233	2.061	0.848–5.011	0.110
ART regimen change	–0.4697	0.625	0.060–6.486	0.694
IP/r-containing ART	–0.7905	0.454	0.204–1.011	0.053
Pre-treatment CD4+ T-cell count	0.0006	1.001	0.998–1.003	0.680
(intercept)	0.1485	–	–	0.783

ART: antiretroviral therapy; CI: confidence interval; OR: odds ratio; PI/r: ritonavir-  
“boosted” protease inhibitor. \*Model's internal validation: AUROC = 0.699; Z = –0.452;  
P = .651.

being appropriated to do predictions for immunological recovery failure occurrence.

## 1. Discussion

Evidence shows that only 5% of the cells are permissive to HIV-1 infection, generating new viral particles and culminating in apoptosis. The remaining 95% of cells are non-permissive and provoke an abortive infection through the recognition of the new synthesized HIV-1 cDNA by cytoplasmic DNA sensors, eliciting cell death by pyroptosis, suggested as death by activation of caspase-1 (Doitsh et al., 2010; Doitsh and Greene, 2016).

Functional analysis evidenced that the SNP located at the position –137 of the promoter region of the IL18 gene alters the binding site of the H4TF-1 nuclear transcription factor. Thus, the G allele variant may decrease the bindings site strength, decreasing IL18 gene expression (Giedraitis et al., 2001). Increase in the transcriptional level of some genes, among them the IL18 gene, in the pyroptosis pathway, suggested as Caspase-1 activation cell death in immunological non-responders was observed in some studies, while lower levels of expression were observed in the group of immunologic responders (Bandera et al., 2018). Thus, considering more complete analyzes, the presence of the G allele may present as an influencing aspect that corroborates both studies.

Once interleukin-18 is released after activation via Caspase 1, it recruits cells to the infection site, stimulating the differentiation of naive T cells into Th1 response cells (Arimitsu et al., 2006), which in turn can be infected and the death via pyroptosis process activated, generating a chronic inflammatory cycle as demonstrated by (Doitsh and Greene, 2016). Thus, a decrease in the transcriptional level and IL18 protein production would entail a functional reduction in recruitment of cells, resulting in the possible protective character of the polymorphism.

We observed higher levels of Caspase-1 activation RTE CD4+ T cells in INRs compared to the IR group. This difference may be related to the immune modulation in response of released cytokines and cellular contents during pyroptosis pathway (Man et al., 2017). After caspase-1 activation, pro-interleukins IL-18 is cleaved into their active form, which modulate inflammatory responses and promote cell activation and migration to the infection site (Boucher et al., 2016). Researches have also demonstrated that IL-18 is able to play functions in synergy with other interleukins inducing CCR5 expression, which acts as the main co-receptor in the process of HIV-1 infection (Li et al., 2004; Rodriguez-Galan et al., 2005). Although the observed results were methodologically concise, these results may be observed carefully, since the scarce number of individuals with CC genotype.

An increased expression of this gene could be related to higher level of abortive infections in the thymus. As a result, it may indicate stimulate pyroptosis as the T lymphocytes migrate to mature in the secondary lymphoid organs, as observed in our study according to pyroptotic by Caspase-1 RTE CD4+ T cells, which was higher in the INR group. Another explanation is based on cellular contents released by pyroptosis. Besides pro-inflammatory cytokines, pyroptotic cells also release pathogen- and damage-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs, respectively), stimulating the NLRP3 inflammasome activation and assembly (Guo et al., 2014). In the thymus, lipid

molecules from membrane destruction or age-related lipid depositions act as triggers for NLRP3 activation, stimulating cell death by pyroptosis in T lymphocytes that migrate to peripheral blood (Chanpimol et al., 2017; Harijith et al., 2014; Lecossier et al., 2001).

Despite our study we did not find any association, some studies have shown the importance of IFI16, NLRP3, CARD8, and IL1B genes to HIV1 infection and CASP-1 cell death pathway. IFI16 was described as the main DNA sensor that triggers inflammasome pathways and pyroptosis in HIV-1 infection. It was suggested that HIV-1 has the capacity to increase the expression of NLRP3 inflammasome (Bandera et al., 2018; Pontillo et al., 2010) and CARD8 protein is suggested as NLRP3 inhibitor, while IL1 $\beta$  is correlated with inflammatory process (Langmia et al., 2016; Pontillo et al., 2013). However, the association of these polymorphisms observed in other studies was not observed in our population. So, new studies should be performed in other polymorphisms and populations, given the functional importance of these genes in pyroptosis pathway.

Thus, based on the analyzed data, the present study demonstrated a possible association of the IL18 rs187238 polymorphism with immunological recovery failure in ART-treated patients.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103997>.

## Declaration of Competing Interest

There is no conflict interest on this paper.

## References

- Aiuti, F., Mezzaroma, I., 2006. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS Rev.* 8, 88–97.
- Arimitsu, J., Hirano, T., Higa, S., Kawai, M., Naka, T., Ogata, A., Shima, Y., Fujimoto, M., Yamadori, T., Hagiwara, K., Ohgawara, T., Kuwabara, Y., Kawase, I., Tanaka, T., 2006. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1413–1416. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.096>.
- Bandera, A., Masetti, M., Fabbiani, M., Biasin, M., Muscatello, A., Squillace, N., Clerici, M., Gori, A., Trabattini, D., 2018. The NLRP3 inflammasome is upregulated in HIV-infected antiretroviral therapy-treated individuals with defective immune recovery. *Front. Immunol.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00214>.
- Boucher, D., Chen, K.W., Schroder, K., 2016. Burn the house, save the day: pyroptosis in pathogen restriction. *Inflammasome* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1515/infl-20150001>.
- Chanpimol, S., Seamon, B., Hernandez, H., Harris-love, M., Blackman, M.R., 2017. Age-associated alterations in the levels of cytotoxic lipid molecular species and oxidative stress in the murine thymus are reduced by growth hormone treatment. *Mech. Ageing Dev.* 167, 46–55. <https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>.
- Coelho, A., Moura, R.R., Cavalcanti, C., Guimarães, R.L., Sandrin-Garcia, P., Crovella, S., Brandão, L.A.C., 2015. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14, 2876–2884. <https://doi.org/10.4238/2015.March.31.18>.
- Corbeau, P., Reynes, J., 2011. Review article immune reconstitution under antiretroviral therapy : the new challenge in HIV-1 infection. *Therapy* 117, 5582–5590. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-322453>.
- Doitsh, G., Greene, W.C., 2016. Dissecting how CD4 T cells are lost during HIV infection. *Cell Host Microbe* 19, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.012>.
- Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K.G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M.L., Hebbeler, A.M., Greene, W.C., 2010. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell* 143, 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.001>.
- Doitsh, G., Galloway, N.L.K., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Muñoz-Arias, I., Greene, W.C., 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505, 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature12940>.
- Gaardbo, J.C., Hartling, H.J., Gerstoft, J., Nielsen, S.D., 2012. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/670957>.
- Gaiha, G.D., Brass, A.L., 2014. The fiery side of HIV-induced T cell death. *Science* (80-) 343, 383–384. <https://doi.org/10.1126/science.1250175>.
- Giedraitis, V., He, B., Huang, W., Hillert, J., 2001. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter : a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J. Neuroimmunol.* 112, 146–152.
- Guo, H., Gao, J., Taxman, D.J., Ting, J.P.Y., Su, L., 2014. HIV-1 infection induces interleukin-1 $\beta$  production via TLR8 protein-dependent and NLRP3 inflammasome mechanisms in

- human monocytes. *J. Biol. Chem.* 289, 21716–21726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566620>.
- Harijith, A., Ebenezer, D.L., Natarajan, V., 2014. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front. Physiol.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00352>.
- Healthcare GE, 2007. Ficoll-Paque PLUS.
- Ito, S., Hara, Y., Kubota, T., 2014. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res. Ther.* 16, R52. <https://doi.org/10.1186/ar4483>.
- Jorgensen, I., Miao, E.A., 2015. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol. Rev.* 265, 130–142. <https://doi.org/10.1111/immr.12287>.
- Kesavardhana, S., Kanneganti, T., 2017. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *Int. Immunol.* 29, 201–210. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx018>.
- Langmia, I.M., Apalasy, Y.D., Omar, S.Z., Mohamed, Z., 2016. Impact of IL1B gene polymorphisms and interleukin 1B levels on susceptibility to spontaneous preterm birth. *Pharmacogenet. Genomics* 26, 505–509. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000243>.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Schneider, P., Clavel, F., Hance, A.J., 2001. Discordant increases in CD4+ T cells in human immunodeficiency virus-infected patients experiencing virologic treatment failure: role of changes in thymic output and T cell death. *J. Infect. Dis.* 183, 1009–1016. <https://doi.org/10.1086/319285>.
- Li, L., Hsu, H.-C., Stockard, C.R., Yang, P., Zhou, J., Wu, Q., Grizzle, W.E., Mountz, J.D., 2004. IL-12 inhibits thymic involution by enhancing IL-7- and IL-2-induced thymocyte proliferation. *J. Immunol.* 172, 2909–2916. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2909>.
- Li, T., Wu, N., Dai, Y., Qiu, Z., Han, Y., Xie, J., Zhu, T., Li, Y., 2011. Reduced thymic output is a major mechanism of immune reconstitution failure in HIV-infected patients after long-term antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 53, 944–951. <https://doi.org/10.1093/cid/cir552>.
- Man, S.M., Karki, R., Kanneganti, T.D., 2017. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol. Rev.* 277, 61–75. <https://doi.org/10.1111/immr.12534>.
- Miao, E.A., 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* 243, 206–214.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- Pontillo, A., Guimarães, R.L., Branda, L.A., Segat, L., Athanasakis, E., Crovella, S., 2010. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54, 236–240.
- Pontillo, A., Carvalho, M.S., Kamada, A.J., Moura, R., Schindler, H.C., Duarte, A.J.S., Crovella, S., 2013. Susceptibility to mycobacterium tuberculosis infection in HIVpositive patients is associated with CARD8 genetic variant. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 63, 147–151. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31828f93bb>.
- Rodriguez-Galan, M.C., Bream, J.H., Farr, A., Young, H.A., 2005. Synergistic effect of IL2, IL-12, and IL-18 on Thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. *J. Immunol.* 174, 2796–2804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2796>.

**Supplementary Table.** Sociodemographic and clinical characteristics of the HIV-positive patients under antiretroviral therapy enrolled in our study.

Variables		INR n=126 (%)	IR n=122 (%)	P
Sex	Male	62 (49.2)	45 (36.9)	0.055 <sup>a</sup>
	Female	64 (50.8)	77 (63.1)	
Age (years old) at ART start date, median (IQR)		32.0 (29.0–39.0)	32.0 (28.0–36.0)	0.212 <sup>b</sup>
Body mass (kg) at ART start date, median (IQR)		61.5 (55.0–70.5)	64.0 (54.0–75.0)	0.293 <sup>b</sup>
Time (months) until ART starting post-diagnosis, median (IQR)		5.0 (1.0–30.0)	11.0 (3.0–29.0)	0.101 <sup>b</sup>
PI/r-containing ART (n=219/248)	Yes	38 (34.2)	52 (48.2)	0.040 <sup>a</sup>
	No (NNRTI use instead)	73 (65.8)	56 (51.8)	
AZT-containing ART (n=212/248)	Yes	92 (86.8)	91 (85.8)	1.00 <sup>a</sup>
	No (TDF use instead)	14 (13.2)	15 (14.2)	
ART regimen change (n=229/248)	Yes	12 (10.1)	4 (3.6)	0.070 <sup>a</sup>
	No	107 (89.9)	106 (96.4)	
Pre-treatment CD4+ T-cell count		267 ± 192	332 ± 170	0.024 <sup>c</sup>
Post-treatment CD4+ T-cell count		402 ± 167	723 ± 261	<0.001 <sup>c</sup>
Pre-treatment PVL (log <sub>10</sub> RNA copies/mL)		4.51 (3.25 – 5.07)	4.43 (3.71 – 5.10)	0.648 <sup>b</sup>
<i>Coinfections Serology Status</i>				
Syphilis (VDRL test)		13 (10.3)	10 (8.2)	0.663 <sup>a</sup>
Toxoplasmosis* (IgG test)		10 (7.9)	15 (12.3)	0.295 <sup>a</sup>
CMV* (IgG test)		14 (11.1)	19 (15.6)	0.352 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fisher exact test. <sup>b</sup>Wilcoxon-Mann-Whitney test (Shapiro Wilk: <0.05). <sup>c</sup>t-test (Shapiro Wilk: >0.05).

\* Chronic infection – Immunoglobulin G tests.

ART: antiretroviral therapy; AZT: zidovudine; CMV: cytomegalovirus; INR: immunological non-responders; IR: immunological responders; IQR: interquartile range; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI/r: ritonavir-“boosted” protease inhibitor; PVL: plasma viral load; TDF: Tenofovir; VDRL: venereal disease research laboratory.

**APÊNDICE B – DIFFERENCES IN PYROPTOSIS OF RECENT THYMIC  
EMIGRANTS CD4+ T-LYMPHOCYTES IN ART-TREATED HIV-POSITIVE  
PATIENTS ARE INFLUENCED BY SEX**

José Leandro Andrade-Santos<sup>a,b,\*</sup>, Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>b</sup>, Fabrício Oliveira Souto<sup>b</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>, Rafael Lima Guimarães<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Genetics, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

\*Corresponding author at: Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 2126-8484; Fax: +55 81 2126-8485. *E-mail address:* [jlandrades19@gmail.com](mailto:jlandrades19@gmail.com)



**Immunogenetics (ISSN 0093-7711)**

<https://doi.org/10.1007/s00251-020-01202-5>

SHORT COMMUNICATION



## Differences in pyroptosis of recent thymic emigrants CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes in ART-treated HIV-positive patients are influenced by sex

José Leandro Andrade-Santos<sup>1,2</sup> · Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>2</sup> · Fabrício Oliveira Souto<sup>2</sup> · Sergio Crovella<sup>1,2</sup> · Rafael Lima Guimarães<sup>1,2</sup>

Received: 28 August 2020 / Accepted: 20 December 2020

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021, corrected publication 2021

### Abstract

Pyroptosis cell death in recent thymus emigrants (RTE) CD4<sup>+</sup> T lymphocytes plays an important role on HIV-1 infection as a cause of CD4<sup>+</sup> T cell depletion, being influenced by several factors, among them, the sex. Thus, the aim of this study was evaluated pyroptosis levels in RTE CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of individuals under antiretroviral therapy (ART) stratified by sex. Thirty-seven ART-treated HIV-positive patients (22 females and 15 males) and 12 (seven females and five males) clinically health subjects were recruited. Analysis by flow-cytometry of RTE CD4<sup>+</sup> cells (CD4<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> /fluorescent-labeled inhibitors of caspases-Caspase-1+) were performed. Clinical and sociodemographic aspects were also evaluated from medical records. We observed statistically higher levels of pyroptosis RTE CD4<sup>+</sup> T cells in male individuals (69.3%) compared with female group (39.1%) ( $P = 0.0356$ ). Pre- and post-treatment CD4<sup>+</sup> T cell counts were also higher in women than men ( $P = 0.004$  and  $P = 0.012$ , respectively). Our data provides important evidence of the sex as a potential predictor of immunological reconstitution in ART-treated individuals.

**Keywords** Antiretroviral therapy · Caspase-1 activity · Cell death · Immunological recovery

Despite the advances provided to human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals under antiretroviral therapy (ART), there are some clinical features that still influence the therapeutic responses even though suppressed viral concentration, such as deficiency of immune reconstitution. Immunological non-recovery (INR) is characterized by decreased plasma viral load but incomplete recovery of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, affecting between 10 and 40% of ART-treated patients (Gaardbo et al. 2012; Yang et al. 2020).

The exact mechanisms that lead to impaired CD4<sup>+</sup> T cell recovery are still unclear. However, several studies have demonstrated that INR condition is a consequence of two main processes: reduced production and exacerbated

death of CD4<sup>+</sup> T cells, mainly by pyroptosis, a highly inflammatory cell death pathway mediated by caspase-1 (Doitsh and Greene 2016). In HIV-1 infection, caspase-1 activation is increased in the lymphoid organs generating high levels of pyroptotic lymphocyte populations (Vidya Vijayan et al. 2017).

Diverse factors have already been associated with poor immunological recovery, considered a multifactorial condition (Massanella et al. 2013). Sex has been shown as an important factor in maintaining the immune response during HIV-1 infection. Although sometimes contradictory, there are immune parameters that demonstrate female advantages compared with male, such as lower plasma viral load and higher CD4<sup>+</sup> T cell count during ART (Castilho et al. 2014). Additionally, supporting the hypothesis that women has a better thymic function, higher numbers of recent thymic emigrant (RTE) CD4<sup>+</sup> T cells have been observed in female individuals compared with males, resulting in better immune performance mainly under treatments, besides to effects related to steroids hormones of female individuals. Moreover, it is widely shown the importance of RTE CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in INR individuals during ART (Corbeau and Reynes 2011; Carvalho-Silva et al. 2020).

✉ José Leandro Andrade-Santos  
jlandrades19@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Genetics, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil



Based on this context, differences between males and females in HIV-infection and the importance of cell death for disease progression, this study aimed to evaluate cell death levels mediated by caspase-1 in RTE CD4<sup>+</sup> T lymphocytes according to sex, evaluating the possible relationship with CD4<sup>+</sup> T cells count.

The study consisted of 49 individuals (37 ART-treated HIV-positive patients and 12 uninfected healthy controls). HIV-positive patients came from different regions of Pernambuco (Northeast Brazil) and were recruited at Instituto of Medicina Integral Professor Fernando Figueira—IMIP, between 2016 and 2018. Inclusion criteria were age over 18 years old, being under ART for at least 18 months, good adherence to therapy, and achieved prolonged undetectable viral load (< 40 RNA copies/mL). Exclusion criteria were pregnancy, autoimmune diseases, and history of injecting drug use. Clinical, laboratory and sociodemographic data were collected from medical records. All study subjects answered standard questionnaires and gave written informed consent authorizing the collection of data and blood samples for further analysis. This study was approved by the IMIP Research Ethics Committee under protocol no. 3629-13.

Peripheral blood samples (4 mL) were collected in tubes containing EDTA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained using the Ficoll-Paque Plus gradient technique with consecutive washes in phosphate-buffered saline (PBS 1x) following the manufacturer's recommendations (Healthcare GE, 2007). Cellular viability (> 90% in average) was determined by Trypan Blue staining (0.4%) exclusion test. FAM-fluorescent-labeled inhibitors of caspases (FLICA) Caspase-1 Kit (FAM-YVAD-FMK) following the manufacturer's instructions (ImmunoChemistry Technologies) was used for pyroptosis detection. Then, immunophenotypic analysis for detection of CD8<sup>+</sup> and RTE CD4<sup>+</sup> T cells was also carried out by staining with monoclonal antibodies PECy7-CD8, APC-CD4, and PE-CD31 (BD Biosciences). Flow cytometry analyses were performed by BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences). A total of 50,000 events were acquired in each analysis and gated to detect dead RTE CD4<sup>+</sup> T cells by caspase-1 activation (CD4<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> FLICA-Caspase1<sup>+</sup>). Acquired data were analyzed using FCS Express 6 Plus software.

The obtained data were evaluated by Shapiro–Wilk test to determine the normality distribution. For variables in normal distribution, the Student *t* test was used; data that did not present a normal distribution were assessed by Wilcoxon–Mann–Whitney test. Fisher's exact test was performed for categorical variables. The significance level ( $\alpha$ ) was set at 0.05. All statistical analyses were performed using software R version 3.5.0.

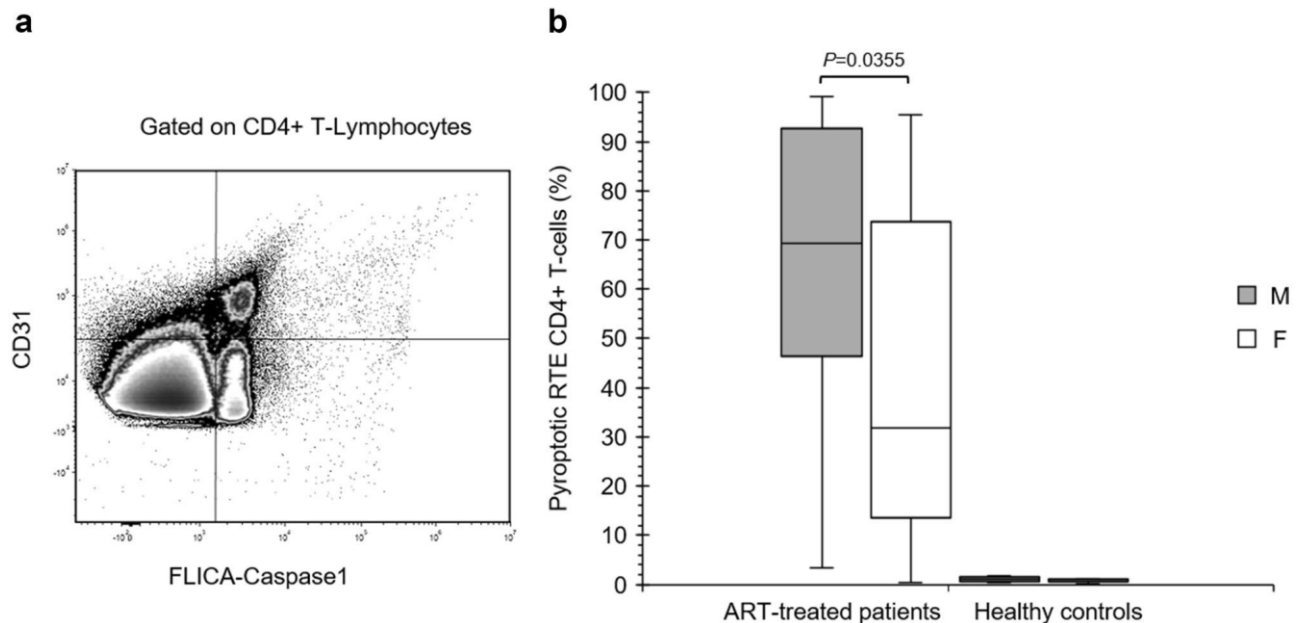
HIV-positive group consisted of 37 individuals, 15 males and 22 females. The mean age at the start of ART was lower in the female group ( $29.2 \pm 8.41$ ) compared with the male group ( $34.9 \pm 7.95$ ); however, the difference was not statistically significant but showed a trend ( $P = 0.046$ ). PreART viral load was similar between the groups.

However, the number of pre-treatment CD4<sup>+</sup> cells were higher in the female group (352 cells/ $\mu$ L) as well as the post-ART CD4<sup>+</sup> cell count, mean 792 cells/ $\mu$ L, while the male group showed 228 and 529 cells/ $\mu$ L in pre- and post-treatment CD<sup>+</sup> cell count, respectively, both with significant statistical differences ( $P = 0.004$  and  $P = 0.012$ , respectively; Table 1). Regarding CD8<sup>+</sup> lymphocytes, there was no statistical difference for pre- and post-ART CD8<sup>+</sup> T cell counts as well as for CD4/CD8 ratio though slightly higher in female compared with male individuals. Moreover, there was no significant differences for therapeutic regimens: NNRTI versus PI/r-based ART, or zidovudine- versus tenofovir-containing ART. The HIV-positive patients did not present any active coinfection during ART. The healthy control group consisted of 12 individuals, seven males and five females; average age was  $28.4 \pm 8.04$  and  $24.1 \pm 4.5$ , respectively. Population characterization data grouped by sex are shown in Supplementary Table 1 (HIV-infected patients) and Supplementary Table 2 (healthy control).

The CD4<sup>+</sup> T lymphocyte percentage determined by flow cytometry in HIV-positive patients was higher in female group ( $30.0 \pm 9.93\%$ ) compared with male individuals ( $23.1 \pm 6.14\%$ ) with significant statistical difference  $P = 0.02$ ; Table 1. On the other hand, CD8<sup>+</sup> T cell percentage was lower in female than male individuals, 16.9% and 22.4%, respectively, but with no statistical difference. Furthermore, the male group demonstrated 69.3% (43.7–96.7) of dead recent thymic emigrants CD4<sup>+</sup> T cell by caspase-1 activity (CD4<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> FLICA-Caspase1<sup>+</sup>) compared with 39.1% (10.1–75.0) in female individuals. This difference was statistically significant  $P = 0.0356$  (Fig. 1a). Cell death levels of RTE CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was quite low and similar between male (1.04%) and female (0.81%) healthy controls.

Several parameters have already been correlated with differences in ART outcomes and immune response of HIVinfected patients comparing male and female sex, such as viral load, body mass, CD4<sup>+</sup> T cell count, and survival rate of these individuals. Most of these studies indicated the female advantage over males (Scully 2018). In agreement with some studies (Jarrin et al. 2008; Maskew et al. 2013; Klein and Flanagan 2016), which evaluated the T cell profile in female and male individuals, our results demonstrated significant differences regarding pre- and post-treatment CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts as well as CD4<sup>+</sup> percentage among sexes, being higher in female patients. This trend was also observed in the study developed by Qiu et al. (2017), which demonstrated that there is a higher susceptibility of

**Fig. 1** Pyroptosis levels in recent thymic emigrants (RTE) CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of ART-treated individuals stratified by sex. **a** Representative flow cytometry plot showing gating strategy for pyroptotic RTE CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> FLICA-Caspase1<sup>+</sup>)



male individuals to exhibit poor immune reconstitution during ART being, among other factors, a consequence of low pre-treatment CD4<sup>+</sup> T cell count.

A study by our group has shown that HIV-positive patients under ART have high cell death levels of RTE CD4<sup>+</sup> T lymphocytes mainly by pyroptosis, and female sex as a protective factor for immunological recovery but no correlation with cell death (Carvalho-Silva et al. 2020). Comparing with these data in the context of incomplete immunological recovery, our findings suggested that there is a considerable difference between the sex' outcome, mainly in terms of cell death. ART-treated males showed elevated dead RTE CD4<sup>+</sup> T cell by pyroptosis when compared with ART-treated females. These highlight the immune vulnerability of males under ART and evidence the increased loss of CD4<sup>+</sup> cells in ART-treated patients during treatment. Previous analyses of cell death in HIV-1 infection showed apoptosis as the main pathway for massive cell loss. However, other studies have demonstrated that this cell death pathway acts as adjuvant, being pyroptosis the main cause of CD4<sup>+</sup> T cell depression during HIV-1 infection (Doitsh et al. 2014; Cai et al. 2017). RTE T cell population has a crucial role in immune responses and, consequently, in inflammatory mechanisms that are evidenced by HIV-positive individuals. Cell death process by pyroptosis is exacerbated in lymphoid organs to induce cell death of neighboring cells since proximity between cells from adhesion molecules such as ICAM-1 and LFA-1 triggers a mechanism of virological synapse, which induces persistent inflammation in these tissues (Galloway et al. 2015).

In addition, RTE cells have structures called T cell receptor excision circle (TRECs), which is formed during gene rearrangement process for TCR production and to

from lymphocytes gated on CD4<sup>+</sup>. **b** Pyroptosis levels of RTE among HIVpositive individuals on ART by sex; data from control subjects. Medians, IQR, and *P* value (according Student's *t* test) are shown. ART antiretroviral therapy, FLICA fluorescent-labeled inhibitors of caspases, IQR interquartile range

ensure the variability of immune responses (Corbeau and Reynes 2011). According to Pido-Lopez et al. (2001) there is a meaningful variance in the amount of RTE CD4<sup>+</sup> T cells, being higher in females. Corroborating with these data, a

study developed by De Voeght et al. (2017) demonstrated that males have fewer TRECs than female individuals, resulting in decreased immune activity since they show reduced diversity in CD4<sup>+</sup> T cell populations.

Investigations, comparing immunological mechanisms based on sex, demonstrated that steroid hormones in women are strong protective factors for immune responses due to their physiological functions (Klein and Flanagan 2016). Chen et al. (2020) observed in knockout mice that removing estrogen and progesterone could increase the activation of NLRP3 inflammasome, culminating in caspase-1 activation and thus increasing inflammatory process in atherosclerotic plaques of female mice. In addition, estrogen hormones may influence the release of pro-inflammatory interleukin IL-1 $\beta$  during pyroptosis pathway; therefore, high cell death levels are correlated with low estrogens concentration (Straub 2007).

Accordingly, protective character previously associated with anti-apoptotic aspects (Morrissy et al. 2010; Chen et al. 2013) may also be related to cell death by pyroptosis. Variations in immune protein production may be linked to the triggering of cell death by pyroptosis depending on sex. Studies have shown that accumulation of reactive oxygen species (ROS) is able to induce response mediated by



inflammasome complex activation (Abais et al. 2015). Comparative proteomic analysis among sexes carried out by Zhang et al. (2015) demonstrated a decreased production of SOD2, an important mitochondrial antioxidant that is active in response to cellular damage and high production of  $\alpha$ -Synuclein (SNCA), in males (Zhang et al. 2015). Accumulation of SNCA can induce mitochondrial damage and proteasome dysfunction, which may lead cell death by pyroptosis (Yang et al. 2019). In addition, CD4-cell surface CCR5 density is a suggestive factor in susceptibility of males to cell loss. This occurs since these individuals present higher CCR5 distribution in the lymphocyte surface, increasing immune activation with consequent inflammatory response mediated by caspase-1 activation (Corbeau and Reynes 2011). Furthermore, CCR5 expression on cell surface seems to be influenced by synergy exerted by interleukin-18, a product of caspase-1 activation, with other pro-inflammatory cytokines (Rodriguez-Galan et al. 2005).

Based on recent data focusing on pyroptosis as the main mechanism of CD4<sup>+</sup> T cell depletion during ART, our results demonstrate male sex as a predisposing factor to immunological non-recovery. This study, being aware of the limitation due to the analyses performed on a low number of patients, provides new subsidies for a better understanding of mechanisms involved in poor immune reconstitution of HIV-positive individuals undergoing ART.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01202-5>.

**Funding** This study was partially supported by grants from CNPq (442225/2014-8), FACEPE (APQ-0599-2.02/14), and CAPES (BEX 7715-15-3) to GUIMARÃES, R. L.

## References

- Abais JM, Xia M, Zhang Y et al (2015) Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? 22:1111–1129. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5994>
- Cai R, Liu L, Luo B et al (2017) Caspase-1 activity in CD4 T cells is downregulated following antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 33:164–171. <https://doi.org/10.1089/aid.2016.0234>
- Carvalho-Silva WHV, Andrade-Santos JL, Souto FO et al (2020) Immunological recovery failure in cART-treated HIV-positive patients is associated with reduced thymic output and RTE CD4<sup>+</sup> T cell death by pyroptosis. *J Leukoc Biol* 107:85–94. <https://doi.org/10.1002/JLB.4A0919-235R>
- Castilho JL, Melekchin VV, Sterling TR (2014) Sex differences in HIV outcomes in the highly active antiretroviral therapy era: a systematic review. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5:446–456. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0208>
- Chen FP, Chien MH, Chen HY et al (2013) Effects of estradiol and progestogens on human breast cells: regulation of sex steroid receptors. *Taiwan J Obstet Gynecol* 52:365–373. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2012.09.038>
- Chen S, Markman JL, Shimada K et al (2020) Sex-specific effects of the Nlrp3 inflammasome on atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *JACC Basic to Transl Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.jacbt.2020.03.016>
- Corbeau P, Reynes J (2011) Review article Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection. *Therapy* 117:5582–5590. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-322453>
- De Voeght A, Martens H, Renard C et al (2017) Exploring the link between innate immune activation and thymic function by measuring sCD14 and TRECs in HIV patients living in Belgium. *PLoS ONE* 12:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185761>
- Doitsh G, Galloway NLK, Geng X et al (2014) Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505:509–514. <https://doi.org/10.1038/nature12940>
- Doitsh G, Greene WC (2016) Dissecting how CD4 T cells are lost during HIV infection. *Cell Host Microbe* 19:280–291. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.012>
- Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD (2012) Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin Dev Immunol* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/670957>
- Galloway NLK, Doitsh G, Monroe KM et al (2015) Cell-to-cell transmission of HIV-1 is required to trigger pyroptotic death of lymphoid tissue-derived CD4 T cells. *Cell Rep* 12:1555–1563. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.011>
- Healthcare, G. E. (2007). Ficoll-Paque Plus intended use for in vitro isolation of lymphocytes. *GE Healthcare, Uppsala, Sweden*.
- Jarrin I, Geskus R, Bhaskaran K et al (2008) Gender differences in HIV progression to AIDS and death in industrialized countries: slower disease progression following HIV seroconversion in women. *Am J Epidemiol* 168:532–540. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn179>
- Klein SL, Flanagan KL (2016) Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 16:626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Maskew M, Brennan AT, Westreich D et al (2013) Gender differences in mortality and CD4 count response among virally suppressed HIV-positive patients. *J Women's Heal* 22:113–120. <https://doi.org/10.1089/jwh.2012.3585>
- Massanella M, Negro E, Clotet B, Blanco J (2013) Immunodiscordant responses to HAART-mechanisms and consequences. *Expert Rev Clin Immunol* 9:1135–1149. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2013.842897>
- Morrissey S, Xu B, Aguilar D et al (2010) Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell* 9:799–809. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00619.x>
- Pido-Lopez J, Imami N, Aspinall R (2001) Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clin Exp Immunol* 125:409–413
- Qiu T, Ding P, Fu G et al (2017) Immunologic treatment failure among HIV-infected adult patients in Jiangsu province, China. *Sci Rep* 7:1–6. <https://doi.org/10.1038/srep42381>
- Rodriguez-Galan MC, Bream JH, Farr A, Young HA (2005) Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. *J Immunol* 174:2796–2804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2796>
- Scully EP (2018) Sex Differences in HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 15:136–146. <https://doi.org/10.1007/s11904-018-0383-2>
- Straub RH (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28:521–574. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>
- Vidya Vijayan KK, Karthigeyan KP, Tripathi SP, Hanna LE (2017) Pathophysiology of CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV-1 and HIV-2 infections. *Front Immunol* 8:580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00580>

- Yang, X, Su, B, Zhang, X, Liu, Y, Wu, H, Zhang, T (2020) Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. *J Leukoc Biol* 107:597–612. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR1019-189R>
- Yang Y, Wang H, Kouadir M et al (2019) Recent advances in the mechanisms of NLRP3 in inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1413-8>
- Zhang L, Wang Z, Chen Y et al (2015) Label-free proteomic analysis of PBMCs reveals gender differences in response to long-term antiretroviral therapy of HIV. *J Proteomics* 126:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.033>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Differences in Pyroptosis of Recent Thymic Emigrants Lymphocytes in ART-Treated HIV-Positive Patients are influenced by the gender

**Table 1.** Sociodemographic, clinical and laboratory parameters of HIV-positive patients under ART according to sex.

Variables	ART-treated HIV-positive patients		
	Male n= 15	Female n=22	P
Age (years old) at ART start date, mean $\pm$ SD	34.9 $\pm$ 7.95	29.2 $\pm$ 8.41	0.046
Body mass (kg) at ART start date, mean $\pm$ SD	67.1 $\pm$ 12.7	67.1 $\pm$ 13.3	1.00
PI/r-containing ART n= 34/37 (%)	Yes	8 (23.5)	1.00
	No (NNRTI instead)	6 (17.7)	
AZT-containing ART n=34/37 (%)	Yes	13 (38.2)	0.41
	No (TDF instead)	1 (2.9)	
ART regimen change <sup>a</sup> n=2/37 (%)	01 (50)	01 (50)	-
Therapy Time (years), mean $\pm$ SD	10.4 $\pm$ 3.0	9.3 $\pm$ 2.7	0.232
Pre-treatment PVL (log <sub>10</sub> RNA copies/mL) (IQR)	4.14 (3.19 – 5.01)	4.52 (3.70 – 4.81)	0.82
Pre-treatment CD4+ T- cell count (IQR)	228 (58 – 316)	352 (295 – 450)	0.004**
Post-treatment CD4+ T- cell count, mean $\pm$ SD	529 $\pm$ 261	792 $\pm$ 285	0.012**
Pre-treatment CD8+ T- cell count (IQR)	772 (569 – 987)	862 (719 – 1368)	0.14
Post-treatment CD8+ T- cell count, mean $\pm$ SD	916 $\pm$ 227	994 $\pm$ 408	0.57
CD4/CD8 ratio (IQR)	0.63 (0.28 – 0.82)	0.76 (0.60 – 0.90)	0.16
Most recent CD4+ (%), mean $\pm$ SD	23.1 $\pm$ 6.14	30.0 $\pm$ 9.93	0.02**
Most recent CD8+ (%) (IQR)	22.4 (15.8 – 26.9)	16.9 (13.2 – 25.6)	0.16
CD4+/CD31+FLICA+ (%) (IQR)	69.3 (43.7 – 96.7)	31.9 (10.1 – 75.0)	0.035**
Coinfections Serology Status*	Syphilis n=3/37 (%)	2 (67)	1 (33)
	Toxoplasmosis n= 6/37 (%)	3 (50)	3 (50)
	CMV n= 3/37 (%)	3 (50)	3 (50)

\*Chronic infection – Immunoglobulin G tests. \*\*Significant statistical difference; <sup>a</sup>Change from a NNRTI-containing cART to a PI/r-containing cART regime ART: antiretroviral therapy; AZT: zidovudine; CMV: cytomegalovirus; IQR: interquartile range; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI/r: ritonavir- “boosted” protease inhibitor; PVL: plasma viral load; SD: standard deviation; TDF: tenofovir.

**Table 1.** Sociodemographic and clinical dates of healthy controls according to sex.

Variables	Controls	
	Male (n=05)	Female (n=07)
Age (years old) mean $\pm$ SD*	28.4 $\pm$ 8.04	24.1 $\pm$ 4.5
Body mass (kg) mean $\pm$ SD*	78.8 $\pm$ 8.6	62.7 $\pm$ 13.3
CD4+ count (%)*	26.2 $\pm$ 10.9	17.8 $\pm$ 7.81
CD8+ count (%)*	14.6 $\pm$ 3.8	16.4 $\pm$ 5.8
CD4+CD31+/FLICA+	1.04 $\pm$ 0.66	0.81 $\pm$ 0.60

SD: standard deviation;

## APÊNDICE C – HIV-1 INFECTION TRANSCRIPTOMICS: META-ANALYSIS OF CD4+ CELLS GENE EXPRESSION PROFILES

Antonio Victor Campos Coelho<sup>1\*</sup>, Rossella Gratton<sup>2</sup>, João Paulo Britto de Melo<sup>1</sup>, José Leandro Andrade-Santos<sup>3,4</sup>, Rafael Lima Guimarães<sup>3,4</sup>, Sergio Crovella<sup>5</sup>, Paola Maura Tricarico<sup>2</sup> and Lucas André Cavalcanti Brandão<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil; joaobritto26@gmail.com (J.P.B.d.M.); lucabrand@gmail.com (L.A.C.B.)

<sup>2</sup> Department of Advanced Translational Microbiology, Institute for Maternal and Child Health IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria 65/1, 34137 Trieste, Italy; rossella.gratton@gmail.com (R.G.); tricaricopa@gmail.com (P.M.T.)

<sup>3</sup> Department of Genetics-Federal, University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil; jlandrades19@gmail.com (J.L.A.-S.); rafaellg@gmail.com (R.L.G.)

<sup>4</sup> Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil

<sup>5</sup> Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, University of Qatar, Doha P.O. Box 2713, Qatar; sgrovella@qu.edu.qa

\* Correspondence: avccbio@gmail.com; Tel.: +55-81-2126-8522



*viruses*

**Viruses (ISSN 1999-4915)**



## Review

# HIV-1 Infection Transcriptomics: Meta-Analysis of CD4+ T Cells Gene Expression Profiles

Antonio Victor Campos Coelho <sup>1,\*</sup>, Rossella Gratton <sup>2</sup>, João Paulo Britto de Melo <sup>1</sup>, José Leandro Andrade-Santos <sup>3,4</sup>, Rafael Lima Guimarães <sup>3,4</sup>, Sergio Crovella <sup>5</sup>, Paola Maura Tricarico <sup>2</sup> and Lucas André Cavalcanti Brandão <sup>1,2</sup>



[https://www.mdpi.com/1999-4915/13/2/244?type=check\\_update&version=1](https://www.mdpi.com/1999-4915/13/2/244?type=check_update&version=1)  
[https://www.mdpi.com/1999-4915/13/2/244?type=check\\_update&version=1](https://www.mdpi.com/1999-4915/13/2/244?type=check_update&version=1)

**Citation:** Coelho, A.V.C.; Gratton, R.; Melo, J.P.B.d.; Andrade-Santos, J.L.; Guimarães, R.L.; Crovella, S.; Tricarico, P.M.; Brandão, L.A.C. HIV-1 Infection Transcriptomics: Meta-Analysis of CD4+ T Cells Gene Expression Profiles. *Viruses* **2021**, *13*, 244. <https://doi.org/10.3390/v13020244>

Academic Editor: Julien Van Grevenynghe  
 Received: 17 December 2020 Accepted: 1 February 2021  
 Published: 4 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Department of Pathology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil; joaobritto26@gmail.com (J.P.B.d.M.); lucabrand@gmail.com (L.A.C.B.)
  - <sup>2</sup> Department of Advanced Translational Microbiology, Institute for Maternal and Child Health IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria 65/1, 34137 Trieste, Italy; rossella.gratton@gmail.com (R.G.); tricaricopa@gmail.com (P.M.T.)
  - <sup>3</sup> Department of Genetics-Federal, University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil; jlandrades19@gmail.com (J.L.A.-S.); rafaellg@gmail.com (R.L.G.)
  - <sup>4</sup> Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil
  - <sup>5</sup> Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, University of Qatar, Doha P.O. Box 2713, Qatar; sgrovella@qu.edu.qa
- \* Correspondence: avccbio@gmail.com; Tel.: +55-81-2126-8522

**Abstract:** HIV-1 infection elicits a complex dynamic of the expression various host genes. High throughput sequencing added an expressive amount of information regarding HIV-1 infections and pathogenesis. RNA sequencing (RNA-Seq) is currently the tool of choice to investigate gene expression in a several range of experimental setting. This study aims at performing a meta-analysis of RNA-Seq expression profiles in samples of HIV-1 infected CD4+ T cells compared to uninfected cells to assess consistently differentially expressed genes in the context of HIV-1 infection. We selected two studies (22 samples: 15 experimentally infected and 7 mock-infected). We found 208 differentially expressed genes in infected cells when compared to uninfected/mock-infected cells. This result had moderate overlap when compared to previous studies of HIV-1 infection transcriptomics, but we identified 64 genes already known to interact with HIV-1 according to the HIV-1 Human Interaction Database. A gene ontology (GO) analysis revealed enrichment of several pathways involved in immune response, cell adhesion, cell migration, inflammation, apoptosis, Wnt, Notch and ERK/MAPK signaling.

**Keywords:** infection; latency; transcriptomics; genomics; gene ontology; pathway analysis

## 1. Introduction

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the etiological agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). HIV-1 infection is still prevalent, with 1.7 million new cases and 690,000 deaths in 2019 [1]. HIV-1 infection is known to elicit a complex dynamic of various host genes expression [2].

High throughput sequencing contributed to a meaningful amount of information regarding HIV-1 infections and pathogenesis. RNA sequencing (RNA-Seq) is currently the tool of choice to assess gene expression in a range of experiments with distinct conditions or cell types [3].

HIV-1 infection is a complex multifactorial phenomenon, making it suitable to transcriptomic analyses for the understanding of the viral pathogenesis, allowing the detection of altered cellular pathways during all phases of the infectious process [2].

In this article we performed a meta-analysis of RNA-Seq expression profiles in samples of HIV-1 CD4+ T infected cells compared to uninfected cells to assess consistently differentially expressed genes in the context of HIV-1 infection.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Search Strategy

We searched the Sequence Read Archive (SRA) [4] for studies involving RNA-Seq in the context of HIV-1 infection through Entrez Direct, National Center for Biotechnology Information (NCBI)'s command line utility [5]. We looked for titles and abstracts containing the keywords "HIV", "HIV-1", "HIV-infection", "HIV positive" and variations thereof in the Bioprojects database division of the SRA. The results were filtered to include only studies in human samples (*Homo sapiens* organism filter) and transcriptome gene expression (RNA-Seq). We did not consider gene expression microarray ("chip") studies in order to work with comparable findings.

The results of the search were curated to identify HIV-1 infection experiments involving primary CD4+ T cells and their associated publications via PubMed id (PMID). The publications were downloaded for further review. The curation process was performed by, at least, two independent readers prior to inclusion.

### 2.2. RNA-Seq Data Collection, Processing and Meta-Analysis

The raw sequencing reads (.fastq) files were downloaded through Entrez Direct [5]. Only the sequencing reads needed for the meta-analysis objectives were downloaded. For time-repeated studies, we downloaded the runs for the last time point only.

The reads were re-processed using Trimmomatic software v0.39 [6] to trim Illumina adapters and to exclude reads counting fewer than 25 bases. Then, the remaining reads were mapped on the National Center for Biotechnology (NCBI) human GRCh38 reference genome and sorted by coordinates using STAR aligner [7]. Aligned reads (BAM files) were imported into R software and processed with the *Rsubread* package [8], whose *featureCounts* function mapped sequencing reads to genomic features using an in-built human GRCh38 genome annotation (28,395 genes), quantifying raw expression levels per gene per sample, producing a gene count table for each sample. All subsequent analyses were made with R software version 4.0.2 [9].

The gene count tables were then converted into a *DESeq2* package [10] object. During this process, the counts from technical replicates were collapsed into single count per unique sample.

The *RankProd* package for R software was used to perform the meta-analysis. The package performs the rank product (RP) and rank sum tests, non-parametric tests that detect consistently differentially expressed genes in independent and replicated experiments. We adopted the meta-analysis methodology derived from a previously published study [11].

Then, we filtered the meta-analysis results to obtain a list of meta-analysis differentially expressed genes (maDEGs) meeting the following criteria: (1) pooled, percentage of false prediction (pfp)-adjusted *p*-value < 0.05 and (2)  $|\log_2(\text{fold-changes})| > 1$ .

Gene names (symbols) were derived from gene ids with *annotate* [12] and *org.Hs.eg.db* [13] packages.

### 2.3. Gene Ontology Enrichment Analysis

Following the identification of DEGs via meta-analysis as described above, we performed a gene ontology (GO) enrichment analysis through the *goana* function of the *limma* package [14]. The GO ids which (1) belong to biological processes (BP) ontology; (2) have FDR-adjusted enrichment test *p*-value < 0.05; and (3) are related to at least five DEGs identified in the step above were considered to be enriched pathways during HIV-1 infection.

### 2.4. Cross-Referencing and Set Analysis of DEGs

Following the production of the list of DEGs by the meta-analysis, we compared it to previous studies involving HIV-1 replication and life-cycle [15–18] and data deposited in public databases, such as the HIV-1 Human Interaction Database [19–21] and RNAcentral, a database of non-coding RNA [22].

We created a cross-reference table using structured query language (SQL) to extract genes in common from all sources. Therefore, we could identify consistently associated genes as well as new candidates involved in HIV-1 infection.

To assess if the observed intersection of the meta-analysis list with the other sources is within the expected by random chance, we performed simulations to determine an expected

intersection number by producing empirical simulations using “mock genes”, a list of random but unique strings to represent gene symbols with the `ids` package of R software [23] (Script S1).

First, we produced a list of 28,395 unique random strings to represent our annotated human genome. From this list, we randomly sampled two independent sets. The first one contained  $D$  elements, representing our DEG list. The second one contained  $O$  elements, where  $O$  was the size of the original genes list reported by each source. The process of formation of these two sets was repeated 10,000 times. Each time, the two sets were different from the previous ones, and the number of overlapping genes (intersection) was calculated.

Thus, we obtained 10,000 intersection values. The median of these values was considered the expected number. Therefore, the binomial distribution was used to test the observed intersection number with this expected number via one-sided tests under the null hypothesis that the intersection of the original source with the meta-analysis list is equal or less than expected by chance. If  $p$ -value  $< 0.05$ , we would reject the null hypothesis and assume that our DEG list had a higher concordance with the source than expected by chance.

### 3. Results

The search strategy resulted in 94 experiment abstracts. Among those, nine had experiments involving primary CD4+ T cells. Four among these nine involved experiments regarding HIV-1 infection. Two studies with a total of 22 unique samples were included in the meta-analysis. The remaining seven were removed due to absence of publication, preventing assessment of the study design ( $n = 1$ ), the authors sequenced just non-coding RNA, preventing comparability ( $n = 1$ ), absence of biological replicates in the sample ( $n = 1$ ), or because they involved testing of drugs for HIV-1 latency reactivation ( $n = 4$ ).

The first study, from Langer et al. (PRJNA482835, GSE117655) [24] infected CD4+ T cells collected from four independent HIV-1 negative donors with three different HIV-1 primary isolates in vitro. The RNA of infected cells was collected 72 h post-infection and sequenced.

The second study, by Shytaj et al. (PRJNA524856, GSE127468) [25], collected primary CD4+ T cells from total blood of three HIV-1 negative donors (referred to as donor 14, donor 49 and donor 50). After isolation, CD4+ T-cells were activated for 72 h. Following activation, cells were divided in two groups and either infected with HIV-1 NL4-3 isolate or mock-infected. Total RNA extraction was performed at 3, 7, 9 and 14 days post-infection for subsequent RNA-Seq. The 3 days post-infection samples were selected for further analysis.

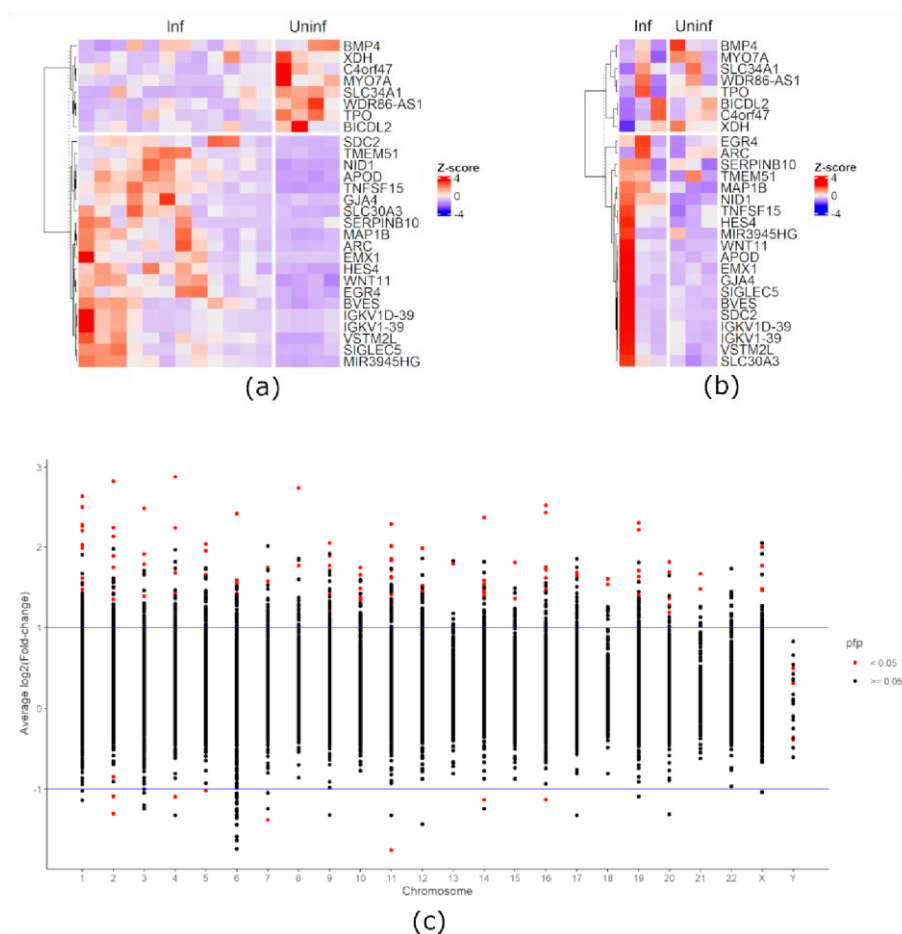
Overall, 22 unique samples were selected for inclusion in the meta-analysis, 15 being experimentally infected and 7 mock-infected (Table 1 and Table S1).

Among the 28,395 annotated genes, 28,165 genes were deemed to be not differentially expressed; among the remaining 230 genes, 22 did not pass the  $|\log_2(\text{fold-change})| > 1$  condition. Therefore, the remaining 208 genes were deemed as maDEGs during HIV-1 infection. Two hundred were up-regulated in infected cells when compared to uninfected/mock-infected cells and eight were down-regulated in infected cells when compared to uninfected/mock-infected cells. Figure 1 contains heatmaps of trimmed mean of M-values (TMM)-normalized [26] and standardized gene expression among the studies samples as well as stripcharts displaying the distribution of gene expression among the samples and pfp-adjusted  $p$ -values and  $\log_2(\text{Fold-change})$  across genes.

**Table 1.** Summary of studies included in the meta-analysis of gene expression profiles of CD4+ T infected with HIV-1 in vitro.

Study	PRJ, GSE IDs	Selected Samples	Control:Infected Ratio
Langer et al., 2019 [24]	PRJNA482835, GSE117655	16	1:3
Shytaj et al., 2020 [25]	PRJNA524856, GSE127468	6	1:1





**Figure 1.** Trimmed mean of M-values (TMM)-normalized [26] and standardized heatmaps gene expression of: (a) Langer et al. (2019) [24] and (b) Shytaj et al. (2020) [25]. Both (a) and (b) display the 8 down-regulated genes and the first 20 up-regulated genes ranked by percentage of false prediction (pfp)-adjusted  $p$ -value. (c) Stripchart of average  $\log_2(\text{Fold-change})$  of genes in infected cells when compared to uninfected/mock-infected cells identified by rank product method. Red dots in (c) represent differentially expressed genes with percentage of false prediction (pfp)-adjusted  $p$ -value  $< 0.05$ . The horizontal blue lines demarcate the  $|\log_2(\text{Fold-change})|$  thresholds.

The comparison of our 208 maDEGs with other predicted genes found in three studies [15–18] and two databases [19–22] revealed low concordance (Table 2). The one-sided binomial tests revealed that almost all intersections were within the rates expected by random chance. However, interestingly, the maDEGs list included 64 genes already known to interact with HIV-1 according to the HIV-1 Human Interaction Database [19–21]. The complete list of maDEGs is displayed in Table S2 alongside average  $\log_2(\text{fold-changes})$  and comparison with previous studies and public databases.

**Table 2.** Cross-reference of individual studies with the meta-analysis results and other studies involving HIV-1 replication and life cycle, alongside HIV Human Interaction Database and RNAcentral, a database of non-coding RNA. The binomial distribution was used to test the null hypothesis that the intersection of the original source with the meta-analysis list is equal or less than expected by chance via one-sided tests.

Reference or Database	Unique Genes	Observed Intersection	Expected Intersection	$p$ -Value
Konig et al., 2008 [16] <sup>a</sup>	406	4	3	0.35
Zhou et al., 2008 [17]	264	2	2	0.60
Yeung et al., 2009 [18]	262	3	2	0.32
HIV interaction database [19–21] <sup>b</sup>	4667	64	34	$<0.001$
RNAcentral [22] <sup>b</sup>	7972	3	58	1.00

<sup>a</sup> includes some genes detected by the Brass et al. 2008 study [15]. <sup>b</sup> Data retrieved as of 13 August 2020.

The GO analysis revealed enrichment of 923 pathways involved in immune response, cell proliferation, cell adhesion, apoptosis, inflammation. Noticeably, Wnt, Notch and MAPK/ERK pathway signaling also were present. A summary of the GO analysis is displayed in Table 3. The complete list is displayed in Table S3.

**Table 3.** Selected enriched pathways reported by gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes identified through meta-analysis of gene expression profiles of CD4+ T cells infected with HIV-1 in vivo.

Pathways and Ranks	GO ID	Term	FDR-Adjusted <i>p</i> -Value
Immune response 1			
	GO:0006958	complement activation, classical pathway	$6.4 \times 10^{-46}$
9	GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	$1.2 \times 10^{-41}$
12	GO:0006955	immune response	$7.8 \times 10^{-39}$
Cell proliferation 97			
	GO:0008283	cell population proliferation	$2.9 \times 10^{-14}$
116	GO:0042127	regulation of cell population proliferation	$5.0 \times 10^{-12}$
351	GO:0046651	lymphocyte proliferation	0.00004
Cell adhesion 151			
	GO:0007155	cell adhesion	$5.9 \times 10^{-9}$
826	GO:0007159	leukocyte cell–cell adhesion	0.0136
Cell migration 23			
	GO:0016477	cell migration	$1.2 \times 10^{-31}$
39	GO:0050900	leukocyte migration	$2.1 \times 10^{-28}$
Apoptosis 216			
	GO:0012501	programmed cell death	$1.1 \times 10^{-6}$
225	GO:0008219	cell death	$1.7 \times 10^{-6}$
234	GO:0042981	regulation of apoptotic process	$2.5 \times 10^{-6}$
Inflammation 259			
	GO:0050727	regulation of inflammatory response	$5.1 \times 10^{-6}$
611	GO:0002526	acute inflammatory response	0.001
Wnt signaling 441			
	GO:0016055	Wnt signaling pathway	0.0002
444	GO:0198738	cell–cell signaling by wnt	0.0002
580	GO:0060070	canonical Wnt signaling pathway	0.0010
Notch signaling 591			
	GO:0008593	regulation of Notch signaling pathway	0.001
688	GO:0007219	Notch signaling pathway	0.003
ERK/MAPK signaling 648			
	GO:0000165	MAPK cascade	0.002
691	GO:0043406	positive regulation of MAP kinase activity	0.003
886	GO:0070371	ERK1 and ERK2 cascade	0.031

#### 4. Discussion

Immunological mechanisms play a crucial role in the HIV-1 infection process and the immunogenetic aspects in its modulation remain to be investigated [27]. In this context, we observed differential expression of genes at various points of the viral pathogenic process, such as activation of anti- and pro-viral mechanisms and induction of changes in cell structure.

In the initial stages of viral invasion of lymphoid tissues, the innate immune system is responsible for inducing the first antiviral response. Pathogen-associated molecular patterns receptors (PRRs) [24,25,28], such as *TLR7*, which were up-regulated in our analyses (GO:0045087 “innate immune response”), are responsible for identifying the pathogen initially [29]. They induce signaling pathways that regulate immune system-related genes, such as *TRIM* gene family [30,31]. This activation leads to transcription of important pro-inflammatory cytokines mRNA, such as IFN- $\gamma$  [32], TNF- $\alpha$  [33] and other related genes such as *IFNB1* (GO:0045321 “leukocyte activation”) and *TNFSF4* (GO:0006954 “inflammatory response”), some of which were also up-regulated according to our meta-analysis. The induced pro-inflammatory milieu attracts other immune cell populations to the infection site. CCL7, CCL2, CCL3 and others are overexpressed during HIV

infection, contributing to the secretion of more pro-inflammatory cytokines, leading to chronicity of the infectious process observed in HIV-positive individuals [34–36].

Moreover, our GO analysis confirmed the role of some important pathways involved in HIV-1 infection: ERK/MAPK and Wnt. The ERK/MAPK pathway (extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein kinases) is an important regulator of IL-2, IL-10, and TNF- $\alpha$  cytokines expression [37]. Indeed, there is evidence showing that inhibition of this pathway suppresses viral replication and cytopathic effects in lymphocytes, probably via reverse transcription and viral integration impairment [38]. The Wnt/ $\beta$ catenin pathway represses both basal and Tat-mediated HIV-1 transcription [39], perhaps by sequestering Tat in the cytoplasm [40,41]. We observed the up-regulation of *FZD4*, the gene of a frizzled class receptor as well as *WNT11* (GO:0016055 “Wnt signaling pathway”). Notch and Wnt pathways are interconnected in some cellular processes, with Notch being associated with T cell survival and quiescence [42]. Therefore, the activation of these pathways in the early infection may signify the establishment of an HIV-1 reservoir.

The expression of attachment proteins that facilitate migration through the endothelium and vasodilation are necessary for these cells to reach the infection site, as evidenced by, for example, *APOD*, *SDC2*, *CXCK11* and *VCAM1* in our analyses (GO:0050900 “leukocyte migration”). During cell migration, the interaction with adhesion molecules causes several changes in cell structure, so these cells can reach tissues [43,44]. Moreover, initial and final stages of retroviral cycle require changes in cell morphology [45,46], justifying the up-regulated genes observed in maintenance regulatory proteins in the cytoskeleton, such as *MAP1B*, *WNT11* and others (GO:0007010 “cytoskeleton organization”).

The establishment of infection also leads to other immunogenetic regulation process. An important aspect of this process concerns the immunological synapses that occur between neighboring cells. We identified the upregulation of Notch pathway-related genes *ROBO1*, *DLL4*, *DLL1*, *GATA2*, *JAG1* and *MDK* (GO:0007219 “Notch signaling pathway”), which act as co-activators in the stimulation of the NF- $\kappa$ B pathway, which induces IL-2 production, responsible for proliferation and activation of CD4+ T lymphocytes and is associated with latency suppression mechanisms and initiation of viral transcription [42,47]. The NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) pathway is exploited by HIV-1 to activate its transcription, by having NF- $\kappa$ B binding sites in its long terminal repeats (LTRs) [48].

We observed that 64 genes among our maDEGs already had annotated roles in HIV-1, since they were curated in the specialized HIV-1 Human Interaction Database [19–21] (Table S2). All of them participated in various biological process pathways (roughly the same as displayed in Table 3) as revealed by our GO analysis. Additionally, we detected three long non-coding RNA curated by RNAcentral [22] among our maDEGs: *WAKMAR2*, *MIR3945HG* and *WDR86-AS1*. Apparently, none of them have been associated with HIV-1 pathogenesis yet, although some MIR non-coding RNA genes have been involved in HIV-1 latency establishment [49,50].

We recognize some limitations in our study, which are similar to the ones evidenced in our previous review [51]: first, the data come from studies using cell lines or infected cells, which could bias gene expression profiles. Second, the process of HIV-1 infection establishment is a highly stochastic phenomenon. It is possible that the virus only infects a fraction of the cells which could also introduce bias into RNA expression profiles [52,53]. Besides that, HIV-1 transcriptional initiation tends to be lower in unstimulated CD4+ T cells or PBMCs and higher in activated CD4+ T cells [54]. Third, there were differences in the study design such as the clonality of virus used to experimentally infect cells (genetic variants in the virus genome may affect its capacity to activate viral transcription [55]) and differences of timepoints of RNA extraction and sequencing, for example. Fourth, and we share this limitation with every study of gene expression, modulation of transcription does not perfectly correlate with protein abundance, due to the cellular post-transcriptional and translational/post-translational regulatory processes [53]. Therefore, we tried to not become too speculative about the results. Thus, we selected pathways to present in the discussion that already have recognized roles in HIV replication and life cycle, to be as close to biological significance as possible. We believe that our cross-referencing helped gauge the relative contribution of some important pathways for HIV-1 early pathogenesis.

## 5. Conclusions

The methodology of RNA-Seq contributed to the discovery of mechanisms of cellular processes. In our study, we performed a reappraisal of transcriptomic libraries, identified a subset of genes consistently upregulated during HIV-1 infection and reviewed major genes and pathways involved in key steps of the pathogenic as well as immune response processes. Our approach allowed us to detect three long non-coding RNA, namely *WAKMAR2*, *MIR3945HG* and *WDR86-AS*, never associated before with HIV-1 pathogenesis. Therefore, we believe that our analyses contribute to provide insights, confirmatory and novel, useful for better understanding of HIV-1 infection dynamics.

**Supplementary Materials:** Supplementary Materials can be found at <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/2/244/s1>, Table S1: Detailed sample list of the studies included in the meta-analysis of gene expression profiles of CD4+ T cells infected with HIV-1 in vitro, Table S2: Results of the meta-analysis of differential gene expression analysis. Average, per-gene log<sub>2</sub>(fold-change) values (sorted by pooled *p*-value) are displayed alongside cross-referencing with other studies involving HIV replication and life cycle, alongside HIV Human Interaction Database and RNAcentral, a database of non-coding RNA., Table S3: Gene ontology (GO) analysis results sorted by FDR-adjusted *p*-value. The 211 DEGs identified by the meta-analysis were used as the input, Script S1: code for simulation of gene lists and binomial test for intersection between gene lists.

**Author Contributions:** Conceptualization and methodology, A.V.C.C. and L.A.C.B.; formal analysis, A.V.C.C., J.P.B.d.M. and J.L.A.-S.; writing—original draft preparation, J.P.B.d.M. and J.L.A.-S.; writing—review and editing, S.C., R.G. and P.M.T.; supervision, R.L.G. and L.A.C.B.; funding acquisition, R.G., P.M.T. and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the following research programs: ISE-EMH (Italian-Slovenian Ecosystem for Electronic and Mobile Health) from European Community (grant number: 07/2019); BioHub—A High-throughput Platform for OMICs Data Analysis and Integration from the Italian Ministry of Health (grant number: RC03/20); Brazilian National Research Council (CNPq), grant number APQ 405825-2018-8.

**Data Availability Statement:** Data sharing not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. World Health Organization. Summary of the Global HIV Epidemic. 2019. Available online: <https://www.who.int/hiv/data/en/> (accessed on 10 September 2020).
2. Le Clerc, S.; Limou, S.; Zagury, J.F. Large-Scale “OMICS” Studies to Explore the Physiopathology of HIV-1 Infection. *Front. Genet.* 2019, *10*, 799. [[CrossRef](#)]
3. Saraiva-Agostinho, N.; Barbosa-Morais, N.L. Psychomics: Graphical application for alternative splicing quantification and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019, *47*, e7. [[CrossRef](#)]
4. Leinonen, R.; Sugawara, H.; Shumway, M. The sequence read archive. *Nucleic Acids Res.* 2011, *39*, D19–D21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2018, *46*, D8–D13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)]
8. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 2019, *47*, e47. [[CrossRef](#)]
9. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on 3 July 2019).
10. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
11. Lee, S.Y.; Park, Y.K.; Yoon, C.H.; Kim, K.; Kim, K.C. Meta-analysis of gene expression profiles in long-term non-progressors infected with HIV-1. *BMC Med. Genom.* 2019, *12*, 3. [[CrossRef](#)]
12. Gentleman, R. *Annotate: Annotation for Microarrays*; R Package Version 1.62.0; Bioconductor: Seattle, WA, USA, 2019.
13. Carlson, M. *Org.Hs.eg.db: Genome Wide Annotation for Human*; R Package Version 3.8.2; Bioconductor: Seattle, WA, USA, 2019.
14. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015, *43*, e47. [[CrossRef](#)]
15. Brass, A.L.; Dykxhoorn, D.M.; Benita, Y.; Yan, N.; Engelman, A.; Xavier, R.J.; Lieberman, J.; Elledge, S.J. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 2008, *319*, 921–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. König, R.; Zhou, Y.; Elleder, D.; Diamond, T.L.; Bonamy, G.M.; Irelan, J.T.; Chiang, C.Y.; Tu, B.P.; De Jesus, P.D.; Lilley, C.E.; et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 2008, *135*, 49–60. [[CrossRef](#)]
17. Zhou, H.; Xu, M.; Huang, Q.; Gates, A.T.; Zhang, X.D.; Castle, J.C.; Stec, E.; Ferrer, M.; Strulovici, B.; Hazuda, D.J.; et al. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 2008, *4*, 495–504. [[CrossRef](#)]

18. Yeung, M.L.; Houzet, L.; Yedavalli, V.S.; Jeang, K.T. A genome-wide short hairpin RNA screening of jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.* 2009, *284*, 19463–19473. [[CrossRef](#)]
19. Ptak, R.G.; Fu, W.; Sanders-Beer, B.E.; Dickerson, J.E.; Pinney, J.W.; Robertson, D.L.; Rozanov, M.N.; Katz, K.S.; Maglott, D.R.; Pruitt, K.D.; et al. Cataloguing the HIV type 1 human protein interaction network. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2008, *24*, 1497–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Fu, W.; Sanders-Beer, B.E.; Katz, K.S.; Maglott, D.R.; Pruitt, K.D.; Ptak, R.G. Human immunodeficiency virus type 1, human protein interaction database at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 2009, *37*, D417–D422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Pinney, J.W.; Dickerson, J.E.; Fu, W.; Sanders-Beer, B.E.; Ptak, R.G.; Robertson, D.L. HIV-host interactions: A map of viral perturbation of the host system. *AIDS* 2009, *23*, 549–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. The RNAcentral Consortium. RNAcentral: A hub of information for non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2019, *47*, D221–D229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. FitzJohn, R. *Ids: Generate Random Identifiers*; R Package Version 1.0.1; R Foundation for Statistical Computing: London, UK, 2017.
24. Langer, S.; Hammer, C.; Hopfensperger, K.; Klein, L.; Hotter, D.; De Jesus, P.D.; Herbert, K.M.; Pache, L.; Smith, N.; van der Merwe, J.A.; et al. HIV-1 Vpu is a potent transcriptional suppressor of NF-kappaB-elicited antiviral immune responses. *eLife* 2019, *8*. [[CrossRef](#)]
25. Shytaj, I.L.; Lucic, B.; Forcato, M.; Penzo, C.; Billingsley, J.; Laketa, V.; Bosinger, S.; Stanic, M.; Gregoret, F.; Antonelli, L.; et al. Alterations of redox and iron metabolism accompany the development of HIV latency. *EMBO J.* 2020, *39*, e102209. [[CrossRef](#)]
26. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. EdgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010, *26*, 139–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Veloso Carvalho-Silva, W.H.; Andrade-Santos, J.L.; Dos Santos Guedes, M.C.; Guimaraes, R.L. Genetics and immunological recovery with antiretroviral treatment for HIV. *Pharmacogenomics* 2020, *21*, 979–983. [[CrossRef](#)]

28. Sherrill-Mix, S.; Ocwieja, K.E.; Bushman, F.D. Gene activity in primary T cells infected with HIV89.6: Intron retention and induction of genomic repeats. *Retrovirology* 2015, 12, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Meas, H.Z.; Haug, M.; Beckwith, M.S.; Louet, C.; Ryan, L.; Hu, Z.; Landskron, J.; Nordbo, S.A.; Tasken, K.; Yin, H.; et al. Sensing of HIV-1 by TLR8 activates human T cells and reverses latency. *Nat. Commun.* 2020, 11, 147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Nisole, S.; Stoye, J.P.; Saib, A. TRIM family proteins: Retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3, 799–808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. van Gent, M.; Sparrer, K.M.J.; Gack, M.U. TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu. Rev. Virol.* 2018, 5, 385–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhang, S.Y.; Jouanguy, E.; Sancho-Shimizu, V.; von Bernuth, H.; Yang, K.; Abel, L.; Picard, C.; Puel, A.; Casanova, J.L. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol. Rev.* 2007, 220, 225–236. [[CrossRef](#)]
33. Schlaepfer, E.; Speck, R.F. TLR8 activates HIV from latently infected cells of myeloid-monocytic origin directly via the MAPK pathway and from latently infected CD4<sup>+</sup> T cells indirectly via TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 2011, 186, 4314–4324. [[CrossRef](#)]
34. Atluri, V.S.; Pilakka-Kanthikeel, S.; Garcia, G.; Jayant, R.D.; Sagar, V.; Samikkannu, T.; Yndart, A.; Nair, M. Effect of Cocaine on HIV Infection and Inflammasome Gene Expression Profile in HIV Infected Macrophages. *Sci. Rep.* 2016, 6, 27864. [[CrossRef](#)]
35. Carrol, E.D.; Mankhambo, L.A.; Balmer, P.; Nkhoma, S.; Banda, D.L.; Guiver, M.; Jeffers, G.; Makwana, N.; Molyneux, E.M.; Molyneux, M.E.; et al. Chemokine responses are increased in HIV-infected Malawian children with invasive pneumococcal disease. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2007, 44, 443–450. [[CrossRef](#)]
36. Chang, C.C.; Omarjee, S.; Lim, A.; Spelman, T.; Gosnell, B.I.; Carr, W.H.; Elliott, J.H.; Moosa, M.Y.; Ndung'u, T.; French, M.A.; et al. Chemokine levels and chemokine receptor expression in the blood and the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis and cryptococcosis-associated



- immune reconstitution inflammatory syndrome. *J. Infect. Dis.* 2013, *208*, 1604–1612. [[CrossRef](#)]
37. Furler, R.L.; Uittenbogaart, C.H. Signaling through the P38 and ERK pathways: A common link between HIV replication and the immune response. *Immunol. Res.* 2010, *48*, 99–109. [[CrossRef](#)]
  38. Medders, K.E.; Kaul, M. Mitogen-activated protein kinase p38 in HIV infection and associated brain injury. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2011, *6*, 202–215. [[CrossRef](#)]
  39. Kumar, A.; Zloza, A.; Moon, R.T.; Watts, J.; Tenorio, A.R.; Al-Harhi, L. Active beta-catenin signaling is an inhibitory pathway for human immunodeficiency virus replication in peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 2008, *82*, 2813–2820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  40. Rossi, A.; Mukerjee, R.; Ferrante, P.; Khalili, K.; Amini, S.; Sawaya, B.E. Human immunodeficiency virus type 1 Tat prevents dephosphorylation of Sp1 by TCF-4 in astrocytes. *J. Gen. Virol.* 2006, *87*, 1613–1623. [[CrossRef](#)]
  41. Henderson, L.J.; Al-Harhi, L. Role of beta-catenin/TCF-4 signaling in HIV replication and pathogenesis: Insights to informing novel anti-HIV molecular therapeutics. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2011, *6*, 247–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  42. Kulpa, D.A.; Brehm, J.H.; Fromentin, R.; Cooper, A.; Cooper, C.; Ahlers, J.; Chomont, N.; Sekaly, R.P. The immunological synapse: The gateway to the HIV reservoir. *Immunol. Rev.* 2013, *254*, 305–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  43. Salgado, M.; Lopez-Romero, P.; Callejas, S.; Lopez, M.; Labarga, P.; Dopazo, A.; Soriano, V.; Rodes, B. Characterization of host genetic expression patterns in HIV-infected individuals with divergent disease progression. *Virology* 2011, *411*, 103–112. [[CrossRef](#)]
  44. Seetharaman, S.; Etienne-Manneville, S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends Cell Biol.* 2020, *30*, 720–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  45. Ospina Stella, A.; Turville, S. All-Round Manipulation of the Actin Cytoskeleton by HIV. *Viruses* 2018, *10*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  46. Lopez-Huertas, M.R.; Callejas, S.; Abia, D.; Mateos, E.; Dopazo, A.; Alcami, J.; Coiras, M. Modifications in host cell cytoskeleton structure and function mediated



- by intracellular HIV-1 Tat protein are greatly dependent on the second coding exon. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 3287–3307. [[CrossRef](#)]
47. Puri, R.V.; Yerrathota, S.; Home, T.; Idowu, J.Y.; Chakravarthi, V.P.; Ward, C.J.; Singhal, P.C.; Vanden Heuvel, G.B.; Fields, T.A.; Sharma, M. Notch4 activation aggravates NF-kappaB-mediated inflammation in HIV-1-associated nephropathy. *Dis. Models Mech.* 2019, 12. [[CrossRef](#)]
  48. Stroud, J.C.; Oltman, A.; Han, A.; Bates, D.L.; Chen, L. Structural basis of HIV-1 activation by NF-kappaB—A higher-order complex of p50:RelA bound to the HIV-1 LTR. *J. Mol. Biol.* 2009, 393, 98–112. [[CrossRef](#)]
  49. Huang, J.; Wang, F.; Argyris, E.; Chen, K.; Liang, Z.; Tian, H.; Huang, W.; Squires, K.; Verlinghieri, G.; Zhang, H. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* 2007, 13, 1241–1247. [[CrossRef](#)]
  50. Khoury, G.; Darcis, G.; Lee, M.Y.; Bouchat, S.; Van Driessche, B.; Purcell, D.F.J.; Van Lint, C. The Molecular Biology of HIV Latency. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018, 1075, 187–212.
  51. Campos Coelho, A.V.; Moura, R.R.; Crovella, S. Reanalysis of Gene Expression Profiles of CD4+ T Cells Treated with HIV-1 Latency Reversal Agents. *Microorganisms* 2020, 8, 1505. [[CrossRef](#)]
  52. Hataye, J.M.; Casazza, J.P.; Best, K.; Liang, C.J.; Immonen, T.T.; Ambrozak, D.R.; Darko, S.; Henry, A.R.; Laboune, F.; Maldarelli, F.; et al. Principles Governing Establishment versus Collapse of HIV-1 Cellular Spread. *Cell Host Microbe* 2019, 26, 748–763.e20. [[CrossRef](#)]
  53. Vogel, C.; Marcotte, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13, 227–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  54. Telwatte, S.; Moron-Lopez, S.; Aran, D.; Kim, P.; Hsieh, C.; Joshi, S.; Montano, M.; Greene, W.C.; Butte, A.J.; Wong, J.K.; et al.  
Heterogeneity in HIV and cellular transcription profiles in cell line models of latent and productive infection: Implications for HIV latency. *Retrovirology* 2019, 16, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Spector, C.; Mele, A.R.; Wigdahl, B.; Nonnemacher, M.R. Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein. *Med. Microbiol. Immunol.* 2019, *208*, 131–169.  
[[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## 6 ANEXOS

### ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO IMIP


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



#### DECLARAÇÃO

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

Recife, 18 de novembro de 2013

  
**Dr. José Eulálio Cabral Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa em Seres Humanos do  
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei 9851 de 08/11/67  
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei 5013 de 14/05/64  
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 86238 de 30/07/81  
INSCRIÇÃO MUNICIPAL - 05.897-1  
INSCRIÇÃO ESTADUAL - Isento  
CNPJ: 10.988.361/0001-29

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

## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

**Pesquisador responsável**

Antonio Victor Campos Coelho

Local de trabalho: Laboratório de

Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade

Universitária, Recife, PE. CEP: 50670-

901. Telefone: 2101-2542

antonio.victor@ufpe.br

Médico supervisor da pesquisa

Luiz Cláudio Arraes de Alencar (IMIP)

lularraes@hotmail.com

**Comitê de Ética em Pesquisa**

Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista,

Recife, PE.

Diretoria de Pesquisa, Prédio Orlando

Onofre, 1º Andar.

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

Telefone: 2122-4756

comitedeetica@imip.org.br

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

Com sua autorização, gostaríamos de realizarmos entre uma e cinco coletas de pequenas quantidades do seu sangue (no máximo 8 mL por coleta), colhidas durante os exames de rotina de acompanhamento da infecção pelo HIV. Caso sejam necessárias mais de uma coleta, elas serão feitas a cada três ou quatro meses, de acordo com a rotina de suas consultas. Solicitamos também a sua autorização para

utilizar dados do prontuário, como idade que iniciou o acompanhamento médico e os resultados dos seus últimos exames de rotina para avaliar o controle do HIV. Como a Genética está em constante evolução, é possível que novas pesquisas além desta sejam realizadas com suas informações e material biológico armazenados. Caso isso ocorra, os pesquisadores entrarão em contato com o comitê de ética e com você para solicitar nova autorização.

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

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

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

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

Eu, \_\_\_\_\_

**(nome completo)** compreendi as informações repassadas e autorizo que seja realizada a avaliação genética da amostra de sangue coletada, e concordo que os dados obtidos sejam utilizados para pesquisa. Declaro que fui informado (a) pela

equipe do pesquisador Sergio Crovella sobre os objetivos da pesquisa e estou consciente de que:

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

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

## ANEXO C – QUESTIONÁRIOS E FORMULÁRIOS DE ACOMPANHAMENTO

### FORMULÁRIO A – RECRUTAMENTO: COLETA DE DADOS CLÍNICOS

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

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

#### 2. Informações clínicas e epidemiológicas

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

Doença cardiovascular	SIM ( )	NÃO ( )	IGNORADO ( )
Diabetes	SIM ( )	NÃO ( )	IGNORADO ( )
Doença renal	SIM ( )	NÃO ( )	IGNORADO ( )
Doença de fígado	SIM ( )	NÃO ( )	IGNORADO ( )
Osteoporose	SIM ( )	NÃO ( )	IGNORADO ( )
Se SIM, houve fratura?	SIM ( )	NÃO ( )	IGNORADO ( )
Local da fratura:			

### 3. Infecção pelo HIV

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



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

#### 4. Perspectivas do paciente acerca do acompanhamento médico

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

SIM ( )	NÃO ( )
---------	---------

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

				Datas
Sorologia para Hepatite B?	POS ( )	NEG ( )	IGN ( )	
Sorologia para Hepatite C?	POS ( )	NEG ( )	IGN ( )	
Se SIM, tratamento para Hepatite C?	SIM ( )	NÃO ( )	IGN ( )	
Qual esquema?				
				Datas
Tuberculose?	POS ( )	NEG ( )	IGN ( )	
Se SIM, estado da infecção:	ATIVA ( )	LATENTE ( )	IGN ( )	
Está em tratamento?	SIM ( )	NÃO ( )	IGN ( )	
Qual esquema?				
Doenças definidora de AIDS?				
( ) Candidíase oral		( ) Candidíase do esôfago		
( ) Febre ou diarreia por 1 mês ou mais		( ) Demência pela AIDS		
( ) Herpes simples por 1 mês ou mais		( ) Herpes zoster		
( ) Infecção pelo CMV		( ) Perda de peso acentuada		
( ) Pneumonia		( ) Toxoplasmose		

**Anexo 3** (continuação)

## FORMULÁRIO B – ACOMPANHAMENTO: REVISÃO DE DADOS CLÍNICOS

NOME	CÓDIGO	PÁGINA

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

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

**1.2 Fumo e etilismo**

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

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

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

4			
---	--	--	--

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

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

## 2. Infecção pelo HIV

### 2.1 Parceiros sexuais

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

### 2.2 Gravidez e HIV

	Datas	Se a paciente for mulher, ela está atualmente grávida?			
1		SIM ( )      Mês de gestação: _____		NÃO ( )	
2		SIM ( )      Mês de gestação: _____		NÃO ( )	
3		SIM ( )      Mês de gestação: _____		NÃO ( )	
4		SIM ( )      Mês de gestação: _____		NÃO ( )	
Se alguma resposta for SIM durante o período de acompanhamento, qual o estado sorológico da(s) criança(s)?					Data de Nascimento
Filho 1	Sexo M ( ) F ( )	POSITIVO ( )	NEGATIVO ( )	IGNORADO ( )	
Filho 2	Sexo M ( ) F ( )	POSITIVO ( )	NEGATIVO ( )	IGNORADO ( )	
Filho 3	Sexo M ( ) F ( )	POSITIVO ( )	NEGATIVO ( )	IGNORADO ( )	
Filho 4	Sexo M ( ) F ( )	POSITIVO ( )	NEGATIVO ( )	IGNORADO ( )	

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

Esquema	Data de início
---------	----------------


**Anexo 3** (continuação)**FORMULÁRIO C – ACOMPANHAMENTO DE EXAMES**

NOME	CÓDIGO	PÁGINA

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

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

**4.2 Infecção por Tuberculose**

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

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

### 4.3 Doenças definidoras de AIDS

Se houver mudança de status, indicar a data

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

## 5. Acompanhamento de carga viral e contagem de linfócitos



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

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

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

12						
----	--	--	--	--	--	--

## 7. Controle de esquemas e trocas

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

## ANEXO D – OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS

DOI: 10.1002/JLB.4A0919-235R



## ARTICLE

## Immunological recovery failure in cART-treated HIV-positive patients is associated with reduced thymic output and RTE CD4+ T cell death by pyroptosis

Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>1</sup> | José Leandro Andrade-Santos<sup>1,2</sup> |  
 Fabrício Oliveira Souto<sup>1,3</sup> | Antonio Victor Campos Coelho<sup>1</sup> | Sergio Crovella<sup>1,2</sup> |  
 Rafael Lima Guimarães<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LUKA), Federal University of Pernambuco—UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup>Department of Genetics, Federal University of Pernambuco—UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>3</sup>Agreste Academic Center (CAA), Federal University of Pernambuco—UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

## Correspondence

Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LUKA), Federal University of Pernambuco—UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: wlissesveloso@gmail.com

## Abstract

Despite more than three decades of studies and advances in combination antiretroviral therapy (cART) against human immunodeficiency virus (HIV), the mechanisms that precisely determine immune reconstitution failure have not been completely elucidated yet. Thus, this study aimed to investigate the thymic function, immune activation, and cell death by pyroptosis and apoptosis in virologically suppressed HIV-positive patients receiving cART. Immunophenotyping analyses were performed in 57 cART-treated HIV-infected patients with undetectable plasma viral load, who were classified as immunological nonresponders (INR = 29) and immunologic responders (IR = 28). Sociodemographic and clinical data were also assessed from medical records. Twelve healthy volunteers were also included in this study. The INR showed lower pretreatment CD4+ T cell count that remained low even after 1 yr of treatment, lower CD4/CD8 ratio, lower percentage of recent thymic emigrant (RTE) CD4+ T cell (CD45RA+CD31+) and naïve CD4+ T cell (CD45RA+CD62L+), higher levels of effector memory CD4+ T cells (CD45RA-CD62L-), and higher pyroptosis levels of RTE CD4+ T cells (CD31+FLICA-Caspase1+) when compared with IR. Our findings indicate that reduced thymic function and RTE CD4+ T cell death by pyroptosis are the major mechanisms of immunological recovery failure in HIV-infected patients receiving cART.

## KEYWORDS

AIDS, antiretroviral therapy, HIV-1, poor CD4+ T cell reconstitution, thymic function

## 1 | INTRODUCTION

Combination antiretroviral therapy (cART) has revolutionized the treatment against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection by reducing plasma viral concentration to undetectable levels (<50 RNA copies/mL).<sup>1,2</sup> Therefore, cART has prevented further transmission, disease progression, and AIDS-related deaths.<sup>3,4</sup>

Currently, there are several available anti-HIV drugs used in combination to maximally suppress HIV replication.<sup>5</sup> As virus levels decrease during treatment, it is expected that CD4+ T cell count returns to quasi-normal values in peripheral blood. However, even though achieving suppressed plasma viral load, 15–30% of patients who start cART do not significantly increase their CD4+ T cell count.<sup>6–8</sup> This condition is defined as immunological recovery failure because

these patients are known as virological responders but immunological nonresponders (INR).<sup>9–11</sup>

Despite more than three decades of studies and advances in anti-HIV therapy, the mechanisms that precisely determine immune reconstitution failure have not been completely elucidated yet, consisting one of the main areas of research on HIV/AIDS.<sup>3,12,13</sup> To date, immunological recovery failure has been reported as a multifactorial condition, having several risk factors involved in this poor recovery of CD4+ T cells, such as male sex, older age at cART start, advanced HIV infection with lower pretreatment CD4+ T cell count, coinfections during therapy, and genetic background.<sup>6,8,10,11,14</sup>

Furthermore, dysregulation of CD4+ T cell homeostasis is a determining factor for immunological recovery in cART-treated patients, and it is regulated by a dynamic balance between CD4+

Received: 10 July 2019 | Revised: 17 September 2019 | Accepted: 10 May 2019

J Leukoc Biol. 2019;1–10.

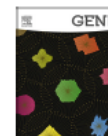
www.jleukbio.org

©2019 Society for Leukocyte Biology | 1

Artigo como co-primeiro autor

Periódico: Journal of Leukocyte Biology (ISSN 1938-3673)

Fator de Impacto: 4.962



## Short communication

# CCR5 genotype and pre-treatment CD4+ T-cell count influence immunological recovery of HIV-positive patients during antiretroviral therapy



Wlisses Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>a,\*</sup>, José Leandro Andrade-Santos<sup>a,b</sup>,  
Maria Carolina dos Santos Guedes<sup>a,b</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>, Rafael Lima Guimarães<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Department of Genetics, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

HIV-1  
ART  
Immune reconstitution failure  
CCR5Δ32  
SDF1-3'A  
Polymorphisms

## ABSTRACT

This study was performed to assess the association of CCR5Δ32 and SDF1-3'A polymorphisms with immunological recovery failure and to investigate the influence of sociodemographic and clinical data on immune reconstitution in human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients during antiretroviral therapy (ART). Two hundred and forty-eight HIV-positive patients under ART with undetectable plasma viral load (< 40 copies/mL) were enrolled in this study and classified into two groups according to their CD4+ T-cell count changes: immunological responders (CD4+ T-cell count gain  $\geq 200/\mu\text{L}$  or  $\geq 30\%$  compared with baseline) and immunological non-responders (CD4+ T-cell count gain < 200/ $\mu\text{L}$  or < 30% compared with baseline). DNA extraction was performed followed by CCR5Δ32 and SDF1-3'A genotyping. Sociodemographic and clinical data were evaluated from medical records. The logistic regression model showed that heterozygosity for CCR5Δ32 allele and lower pre-treatment CD4+ T-cell count (< 500 cells/ $\mu\text{L}$ ) were statistically associated with immunological recovery failure (OR = 5.873, 95%CI = 1.204–28.633,  $P = 0.028$  and OR = 10.00, 95%CI = 3.224–31.016,  $P = 0.028$ , respectively). No association of SDF1-3'A polymorphism with immune reconstitution failure was found. Additionally, we observed that there was a statistically significant difference between lower CD4+ T-cell count and INR status than the IR group ( $Z = 4.687$ ,  $P < 0.001$ ). Our results demonstrated, through a logistic regression model, that CCR5Δ32 polymorphism and pre-treatment CD4+ T-cell count have significant influence on immune reconstitution of HIV-positive patients during ART. These findings highlight some immunological factors associated with poor CD4+ T-lymphocytes recovery, which affect immune response level of ART-treated HIV-positive patients.

## 1. Introduction

Since the discovery of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), there was an intensive research effort from the worldwide scientific community to develop anti-HIV drugs (Barré-Sinoussi et al., 2013).

Currently, there are several available antiretrovirals used in combination, consisting in the antiretroviral therapy (ART) regimens, which can maximally suppress HIV replication in plasma thus preventing further transmission, disease progression and Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)-related deaths (Tseng et al., 2014; WHO, 2016).

**Abbreviations:** AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; ART, antiretroviral therapy; AZT, zidovudine; bp, base pair; CCR5, C-C chemokine receptor 5; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; CXCL10, C-X-C chemokine ligand 10; CXCR4, C-X-C chemokine receptor 4; DNA, deoxyribonucleic acid; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; HTLV-I, human T-cell lymphotropic virus types I; HTLV-II, human T-cell lymphotropic virus types II; INR, immunological non-responders; IP-10, induced protein 10; IQR, interquartile range; IR, immunological responders; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; OR, odds ratio; PCR, polymerase chain reaction; PI/r, ritonavir-“boosted” protease inhibitor; PVL, plasma viral load; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SDF-1, stromal-derived factor type 1; TDF, tenofovir; UTR, untranslated region; VDRL, venereal disease research laboratory; wt, wild type

\* Corresponding author at: Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail addresses: [wlisses.veloso@ufpe.br](mailto:wlisses.veloso@ufpe.br) (W.H.V. Carvalho-Silva), [jlandrades19@gmail.com](mailto:jlandrades19@gmail.com) (J.L. Andrade-Santos), [marcolina.guedes1@gmail.com](mailto:marcolina.guedes1@gmail.com) (M.C.d.S. Guedes), [croveller@gmail.com](mailto:croveller@gmail.com) (S. Crovella), [rafaelg@gmail.com](mailto:rafaelg@gmail.com) (R.L. Guimarães).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144568>

Received 13 December 2019; Received in revised form 16 January 2020; Accepted 8 March 2020

Available online 10 March 2020

0378-1119/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.


Artigo como coautor

Periódico: Gene (ISSN 0378-1119)

Fator de Impacto 2021: 3.688



## Genetics and immunological recovery with antiretroviral treatment for HIV

Willises Henrique Veloso Carvalho-Silva<sup>1</sup> , José Leandro Andrade-Santos<sup>1,2</sup>, Maria Carolina Dos Santos Guedes<sup>1,2</sup> & Rafael Lima Guimarães<sup>\*,1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

<sup>2</sup>Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

\*Author for correspondence: Tel.: +55 81 2126 8484; Fax: +55 81 2126 8485; [rafael.liguimaraes@ufpe.br](mailto:rafael.liguimaraes@ufpe.br)

“Several studies have demonstrated the heterogeneity of patient’s immunological recovery during ART, mostly focusing on immune factors that could be regulated by genetic variations.”

First draft submitted: 11 June 2020; Accepted for publication: 16 July 2020; Published online: 7 September 2020

**Keywords:** apoptosis • ART • CD4<sup>+</sup> T cells • immune reconstitution • INR • polymorphisms • pyroptosis • thymic function

Since the introduction of antiretroviral therapy (ART) HIV infection, treatment of the HIV-positive patient has improved considerably. ART consists of a combination of different antiretrovirals that can suppress plasma viral load to undetectable levels (<40 RNA copies/ml), preventing further transmission, disease progression and AIDS related deaths [1].

More than three decades of studies and advances in anti-HIV therapy have passed and several antiretrovirals have been developed since the first drug, zidovudine (ZDV or AZT), was introduced against HIV infection [2]. HIV viral load suppression always has been a priority for ART, and, consequently, the CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte counts can increase for a better treatment outcome and quality of life of HIV-infected individuals. However, even though achieving undetectable plasma viral concentration, 15–30% of ART-treated patients do not significantly restore their CD4<sup>+</sup> T-cell count. This condition is defined as immunological recovery failure (IRF), and these patients are known as virological responders but immunological nonresponders (INR) [3,4].

The mechanisms that precisely determine this poor immune reconstitution have not been completely elucidated yet, and it is one of the main areas of research on HIV treatment. Nevertheless, several studies have demonstrated that IRF during ART may be the result of two main processes: insufficient production and excessive destruction of CD4<sup>+</sup> T cells [4,5]. It is believed that dysregulation of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes homeostasis plays a major role for immune restoration in HIV-positive patients on ART, and it is regulated by a dynamic balance between CD4<sup>+</sup> T-cells destruction, production and trafficking to and from lymphoid organs and peripheral circulation [6,7]. Furthermore, to date, IRF has been described as a multifactorial condition, including male sex, older age at ART start, advanced HIV infection with low pretreatment CD4<sup>+</sup> T-cell count, coinfections during therapy, reduced thymic output, residual viral production and genetic background as some of the main factors involved in the poor CD4<sup>+</sup> T-cell restoration under ART [4,8].

### CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes production

T-lymphocytes originate from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (HPCs) in bone marrow, but their development occurs in the thymus, where T cells migrate for maturation, selection and subsequent export of naïve T-lymphocytes to the peripheral circulation [9]. It has been demonstrated that a proportion of CD34<sup>+</sup> HPCs can express CD4, CCR5 and CXCR4 receptors being potentially susceptible to HIV infection. Consequently, HIV can infect CD34<sup>+</sup> HPCs causing active infection and cell death, establishing latent reservoirs and influencing the inflow of progenitors for thymic function [4,6]. HIV can also infect and kill the developing CD4<sup>+</sup> thymocytes and

Future  
Medicine

Artigo como coautor

Periódico: Pharmacogenomics (ISSN 1462-2416)

Fator de Impacto 2021: 3.55

