

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JAMILE GIRARDI COSTENARO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA APOBEC3G HUMANA  
DE INDIVÍDUOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA O VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

Porto Alegre  
DEZEMBRO/2014

JAMILE GIRARDI COSTENARO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DA APOBEC3G HUMANA  
DE INDIVÍDUOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA O VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Franco  
Co-orientadora: Me. Fernanda Luz de Castro

Porto Alegre  
DEZEMBRO/2014

*À Aurora Donadelo Girardi*

## AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à orientação que tive da professora Ana Cláudia Franco, durante os três anos e meio de Iniciação Científica no LabVir. Também merece destaque, aqui, todo o apoio, ensinamentos e discussões com a Panela das Galinhas: Marcus Braga Knak, Fer Castro e Josiane Slongo. Fer, sobretudo, pela grande responsabilidade na existência do presente TCC: sou muito grata pelo apoio quando tudo parecia perdido e pela idéia do novo projeto, pelo suporte – físico, mental e metodológico –, auxílio e tempo dedicado a mim e à APOBEC3G. Agradeço também à Rubia de Medeiros pelas amostras e pela ajuda na análise dos sequenciamentos. E obrigada pela colaboração, Rhayssa Marca Firpo, Cristina Santos e Lara Mees.

Não poderia deixar de agradecer, igualmente, à minha família, pai, mãe e mano, muito obrigada pelo apoio e incentivo durante toda minha vida.

Muito obrigada aos meus amigos Fer Castro (sim, aqui também), Ana Maria Obino Mastella, Wagner “Boo” Nunes, Eduardo Artur Troian, Bruno Eduardo Armani, Isabel Pitta Klein, Gilson Duarte, Marianne Farina, Tiago Cardoso, Will Thains, Felipe Zaltron e Leonardo Cenatti. Cada um, a seu modo, ajudou-me diversas vezes em cada dificuldade, bem como comemoraram cada passo dado rumo à diplomação: AMO/SOU VOCÊS!

Agradeço ao Rodrigo Luz Peixoto por toda tua calma e tranquilidade durante os dois meses estressantes da realização dos experimentos e da escrita desse TCC. Tua companhia foi fundamental para meu sucesso.

Marília Camponogara Torres e Raquel Zaccolo Magalhães, embora eu não saiba escrever tão bem quanto vocês duas, quero que saibam que sou muitíssimo grata pela amizade de duas e uma década, respectivamente. Obrigada por todos esses anos de apoio e amizade! E prometo ser mais clara quando tentar explicar o que eu faço da vida...

Por último, mas não menos importante, muito obrigada Thaís dos Santos Hain pela paciência, calma e noites a fio revisando meu TCC. Repito: a Biomedicina UFRGS já teria valido a pena se apenas trouxesse tua amizade.

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	5
2. LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
3. INTRODUÇÃO.....	7
3.1. Vírus da Imunodeficiência Humana.....	7
3.1.1. Replicação.....	8
3.1.2. Genoma.....	9
3.1.3. Proteína Vif.....	10
3.2 Aspectos Clínicos.....	10
3.3 Fatores de Restrição.....	11
3.3.1 APOBEC.....	12
3.3.2 APOBEC3G.....	13
3.3.3 APOBEC3D.....	15
4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	16
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	25
BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO E CONCLUSÃO.....	26
ANEXO A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	29
ANEXO B: Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética.....	31

## 1. RESUMO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus capaz de infectar e se replicar em células que expressem as moléculas CD4 na superfície celular – entre elas, linfócitos T auxiliares, macrófagos, monócitos e células dendríticas. A doença sintomática, causada pelo HIV, pode ser classificada em infecção aguda e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Dentre os vários fatores de restrição capazes de antagonizar a replicação do HIV, as proteínas da família APOBEC3 chamam a atenção pela habilidade de causar hipermutações guanosina-para-adenosina durante a replicação viral. Em um dos membros dessa família, APOBEC3G, foi descrito o polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) -571, na região regulatória 5', que já foi correlacionado com baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em indivíduos brasileiros infectados por HIV. Nesse estudo, a região desse polimorfismo foi amplificada e sequenciada com o intuito de procurar uma correlação com a suscetibilidade ao HIV, mas encontramos um alelo T possivelmente depositado de maneira errônea no banco de dados de SNPs.

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (human immunodeficiency virus)

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (acquired immunodeficiency syndrome)

RNA – Ácido ribonucleico

A3G, APOBEC3G – Subunidade 3G da enzima editora do mRNA da apolipoproteína B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3G)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

mRNA – RNA mensageiro

ART – Terapia antirretroviral (antiretroviral therapy)

APOBEC – enzima editora do mRNA da apolipoproteína B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme)

SNP – polimorfismo de único nucleotídeo (single nucleotide polymorphism)

HAART – Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (Highly Active Antiretroviral Therapy)

A3D, APOBEC3D – Subunidade 3D da enzima editora do mRNA da apolipoproteína B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3D)

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1. Vírus da Imunodeficiência Humana

Os vírus da imunodeficiência humana (HIV) pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus* (ICTV, 2013). Existem duas cepas de HIV: HIV-1 e HIV-2. O vírus HIV-1 é o agente causador da AIDS (ou SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) na atual pandemia global (ROYLE, 2014) e está dividido em quatro subtipos, M – detectado em 95% dos isolados virais globais –, O, N (FIELDS, 2007) e P (PLANTIER, 2009). Já o HIV-2 é uma forma naturalmente atenuada de HIV, sendo menos transmissível e cujas taxas de transmissão estão declinando e se restringem ao oeste da África (ROYLE et al, 2014).

Os vírions do HIV-1 têm diâmetro aproximado de 100-120  $\mu\text{m}$  (Fig.1 A). Estruturalmente, possuem envelope formado por bicamada lipídica da célula hospedeira e as proteínas virais gp41 e gp120 ancoradas. Internamente, possuem matriz esférica e nucleocapsídeo de formato cônico (FIELDS, 2007; ROSSMANN & RAO, 2012). O genoma viral consiste em homodímero de RNA fita-simples linear, de polaridade positiva (Fig. 1 B) (FIELDS, 2007). Adicionalmente, algumas proteínas da célula hospedeira podem ser incorporadas ao vírion, interagindo diretamente com proteínas virais ou sendo importantes no ciclo de vida viral (LINDE, 2013). Uma dessas proteínas é a APOBEC3G, que será discutida adiante.

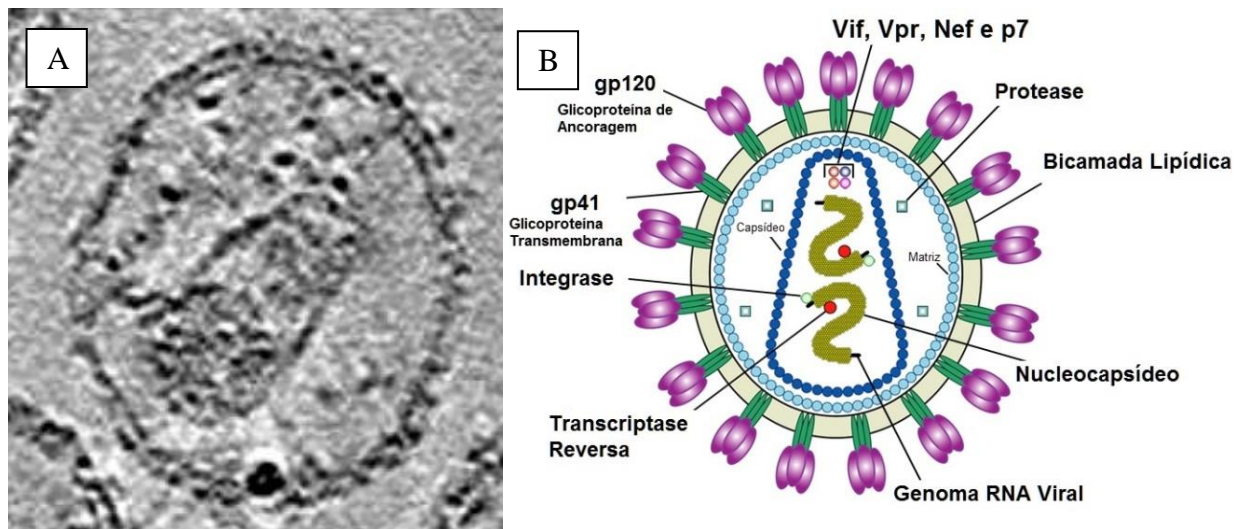


Fig. 1 Estrutura do vírus da imunodeficiência humana. A) Eletrotomografia de HIV-1. Escala: 100 nm (BENNETT et al, 2009). B) Desenho esquemático apresentando os componentes do vírion (adaptado de US National Institute of Health e Carl Henderson, 2004)



### 3.1.1. Replicação

O ciclo de replicação do HIV-1, apresentado de maneira simplificada na figura 2, inicia-se com a adsorção, essencial para a infectividade do HIV-1, das partículas virais com as moléculas CD4 – envolvidas no reconhecimento imune – na superfície de células susceptíveis (linfócitos T auxiliares, macrófagos, monócitos e células dendríticas) (FIELDS, 2012). A interação subsequente com um correceptor, com sete domínios transmembrana, podendo ser CCR5 (um receptor de  $\beta$ -quimiocinas) ou CXCR4 (um receptor de  $\alpha$ -quimiocinas) permite a fusão das membranas plasmática e viral (ALBERTS, 2010), seguida por desnudamento no citoplasma e o início da transcrição reversa dos genomas RNA virais (FIELDS, 2012).

A fita de DNA transcrita é transportada para o interior do núcleo, onde a proteína viral Integrase faz a integração do DNA viral ao DNA cromossomal da célula infectada. O DNA do HIV-1 serve como molde para a RNA polimerase II para a síntese do RNAm viral. Os transcritos, que podem ter sofrido splicing, são exportados para o citoplasma pela associação com a proteína viral Rev. A tradução do precursor Env gp160 ocorre no retículo endoplasmático, já as proteínas Gag e Gag-Pol são sintetizadas em ribossomos citoplasmáticos livres. As três proteínas são transportadas à membrana plasmática, sofrem clivagem e, após a liberação das partículas virais, geram a forma cônica do capsídeo, característica de vírions maduros. Além das três proteínas de replicação, o HIV-1 codifica outras seis proteínas, não ligadas diretamente à replicação, mas que afetam a infectividade viral em algumas centenas de vezes (FIELDS, 2012).

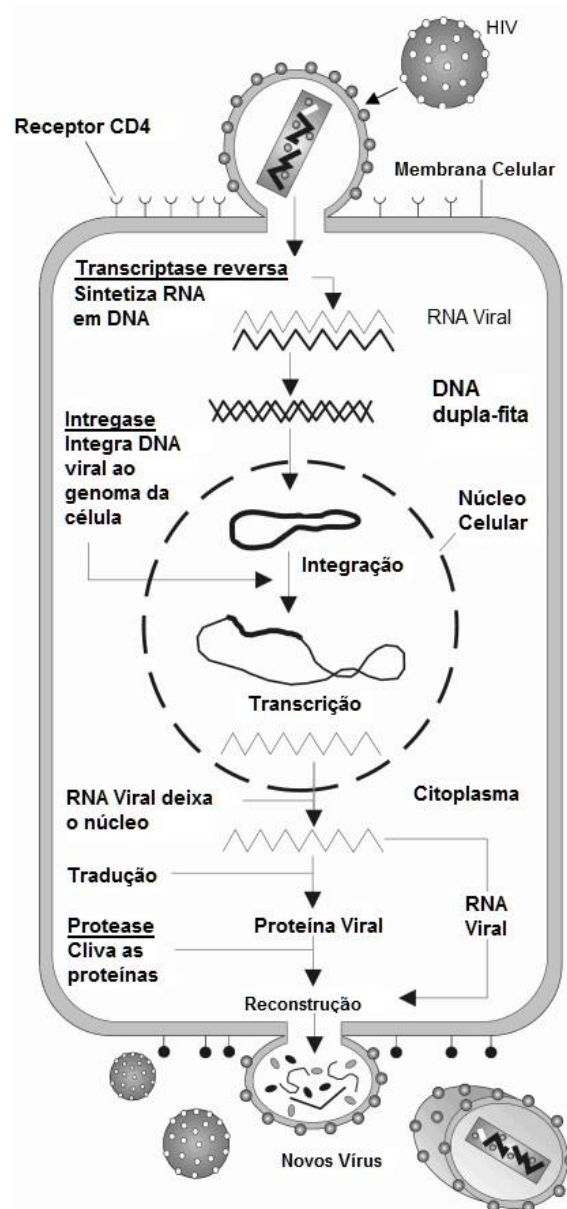


Fig. 2 Ciclo de replicação do HIV (Adaptado de Boundless, 2006)

### 3.1.2. Genoma

O HIV-1 possui um genoma de aproximadamente 9 mil nucleotídeos, e contém nove genes, representados na Fig. 2. Três deles são comuns a todos os vírus: *Gag* – codifica proteínas do capsídeo –, *Env* – codifica proteínas do envelope –, *Pol* – codifica a transcriptase reversa e as proteínas integrase e protease. Adicionalmente a esses genes, há os genes acessórios *Tat* e *Rev* – produzidos através de splicing de RNA e relacionados com a regulação da expressão gênica viral –, *Vpu* e *Nef* – responsáveis por alterar o tráfego de proteínas da célula hospedeira –, *Vpr* – cuja proteína altera a progressão do ciclo celular – e *Vif* – o qual codifica uma proteína acessória para replicação viral (ALBERTS, 2010; WANG, 2014).

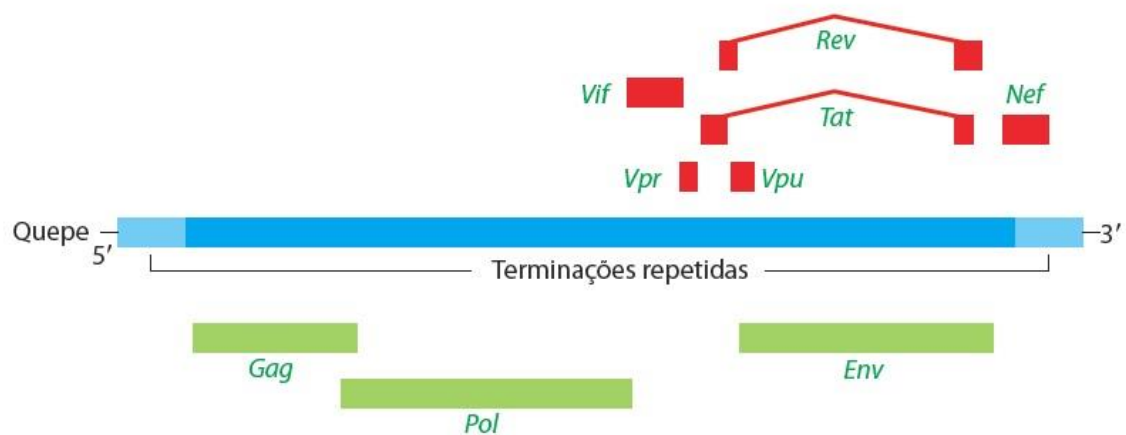


Fig 3 Genoma viral do HIV, apresentando os genes codificadores das 9 proteínas virais: *Gag*, *Pol*, *Env*, *Tat*, *Ver*, *Vpu*, *Nef*, *Vpr* e *Vif*. (Alberts, 2010)

### 3.1.3. Proteína Vif

A proteína Vif (do inglês, Virus infecting fator) do HIV-1 possui 23 kDa e tem um papel fundamental na infectividade viral do HIV-1 (WANG, 2014). A função principal da Vif é destruir a APOBEC3G (A3G), através da via ubiquitina-proteossoma (FIELDS, 2007), além disso, previne o empacotamento da A3G no momento do brotamento do vírion (WANG, 2014).

## 3.2 Aspectos Clínicos

Segundo estimativas da WHO e da UNAIDS, globalmente, haviam 35 milhões de pessoas vivendo com HIV ao final de 2013. Destes, 24,7 são africanos subsaarianos. Nesse mesmo ano, 2,1 milhões de pessoas se infectaram e 1,5 milhão foram a óbito por causas relacionadas à AIDS (WHO, 2014). No Brasil, estima-se que existam 718 mil indivíduos soropositivos. Entre as capitais brasileiras, Porto Alegre lidera a classificação por taxa de detecção de casos de AIDS desde 2006; em 2012, a taxa foi de 93,7 novos casos para cada 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O vírus HIV é transmitido através da troca de fluidos corporais com infectados, entre eles sangue, leite materno, sêmen e secreções vaginais. O vírus tem por alvo as células do sistema imune, o que acaba por reduzir as defesas contra infecções e desenvolvimento de alguns cânceres. A prevenção tem por meta reduzir os fatores de risco, através do uso de

preservativos, utilização de seringas descartáveis e atenção médica a grávidas e a lactentes filhos de mães soropositivas (WHO, 2014).

Gradualmente seus portadores tornam-se imunodeficientes. Os sintomas da infecção por HIV variam de acordo com o estágio da infecção. Nas primeiras semanas após a infecção inicial, podem ser semelhantes à infecção pelo vírus influenza, incluindo febre, dor de cabeça, exantema cutâneo ou dor de garganta. Conforme a doença progride, inchaço dos nódulos linfáticos, perda de peso, febre, diarreia e tosse podem se manifestar. O estágio mais avançado é conhecido por AIDS e pode levar de dois a quinze anos para se desenvolver, dependendo do indivíduo. Sem tratamento, no estágio de AIDS, os pacientes podem desenvolver doenças severas como tuberculose, meningite criptocócica, e cânceres como o sarcoma de Kaposi (WHO, 2014).

O diagnóstico de HIV é feito por detecção de anticorpos anti-HIV (ELISA) ou ácidos nucleicos (PCR). A janela imunológica nos testes ELISA pode ser de até seis semanas, enquanto por PCR é de quinze dias. Esse é o período com a maior taxa de infectividade, embora a transmissão ocorra em todos os estágios da infecção (WHO, 2014).

Infelizmente, não há cura para a infecção por HIV. Entretanto, terapia antirretroviral (ART) efetiva proporciona uma melhor qualidade de vida para seus portadores. A ART consiste da combinação de uso de três ou mais antirretrovirais (WHO, 2014) e existem mais de 30 formulações aprovadas pela FDA que bloqueiam a replicação do HIV e previnem que indivíduos infectados pelo HIV-1 progridam para AIDS (LUBAN, 2012). Em 2013, 12,9 milhões de pessoas no mundo recebiam a ART, sendo 11,7 em países com rendimentos baixos a médios (o que representa 36% dos infectados nesses países). Em relação aos portadores pediátricos, a cobertura do tratamento é mais defasada: apenas 1 a cada 4 crianças vivendo com HIV tem acesso aos medicamentos, em comparação a 1 entre 3 adultos (WHO, 2014).

### 3.3 Fatores de Restrição

Fatores de restrição do hospedeiro são proteínas bloqueadoras da replicação viral, potentes e amplamente expressas intracelularmente, sendo importantes componentes da resposta imune inata às infecções virais. Por outro lado, os vírus evoluíram mecanismos que antagonizam esses fatores. Essa pressão evolutiva, também conhecida como “corrida

armamentista”, a favor da sobrevivência do hospedeiro e da replicação viral acaba por impulsionar rodadas contínuas de seleção de mutações benéficas em genes codificantes de fatores de restrição e de seus antagonistas virais (DUGGAL, 2012).

Em relação ao HIV-1, os fatores de restrição mais estudados são TRIM5 $\alpha$ , SAMHD1, Teterina e APOBEC3. Nesse trabalho, o foco é um dos membros da superfamília APOBEC, a proteína APOBEC3G.

### 3.3.1 APOBEC

A superfamília de genes das citidinas deaminases é composta por APOBEC1, APOBEC2 e APOBEC3 (JARMUZ, 2002; DANG, 2006). Outros membros foram recentemente propostos, como AID, APOBEC4 e APOBEC5. Dentre esses, destaco a APOBEC3, também denominada A3, que está localizada no cromossomo 22 (locus 22q12–q13) e seus sete genes –*A3A*, *A3B*, *A3C*, *A3D*, *A3F*, *A3G* e *A3H*–, arrançados em tandem (JARMUZ, 2002; DANG, 2006). Quatro desses resultantes da fusão de dois domínios A3 (fig 4) (MÜNK, 2012).

Todos os membros da A3 têm uma ampla atividade antiviral contra retrovírus, podendo inibir retrotransposons LTR e não LTR, parvovírus, hepadnavírus, flavivírus e paramyxovírus, e reprimir o vírus torque teno, papilomavírus e herpesvírus. Essa família codifica um característico motivo catalítico coordenado por zinco (Z) e as proteínas A3 podem ser classificadas de acordo com a presença de um motivo A3Z1, A3Z2 ou A3Z3 (Münk, 2012). Todas as A3, que são incorporadas às partículas virais, agem nas células-alvo deaminando citidinas em uridinas, e são antagonizadas por proteínas virais (ex, Vif do HIV-1) (FIELDS, 2007; ALBERTS, 2010; MÜNK, 2012). Esse mecanismo de ação será descrito mais detalhadamente para a APOBEC3G. Nos mamíferos, o locus A3 sempre está flanqueado pelos genes CBX6 e CBX7, embora haja grande variação entre espécies (MÜNK, 2012).

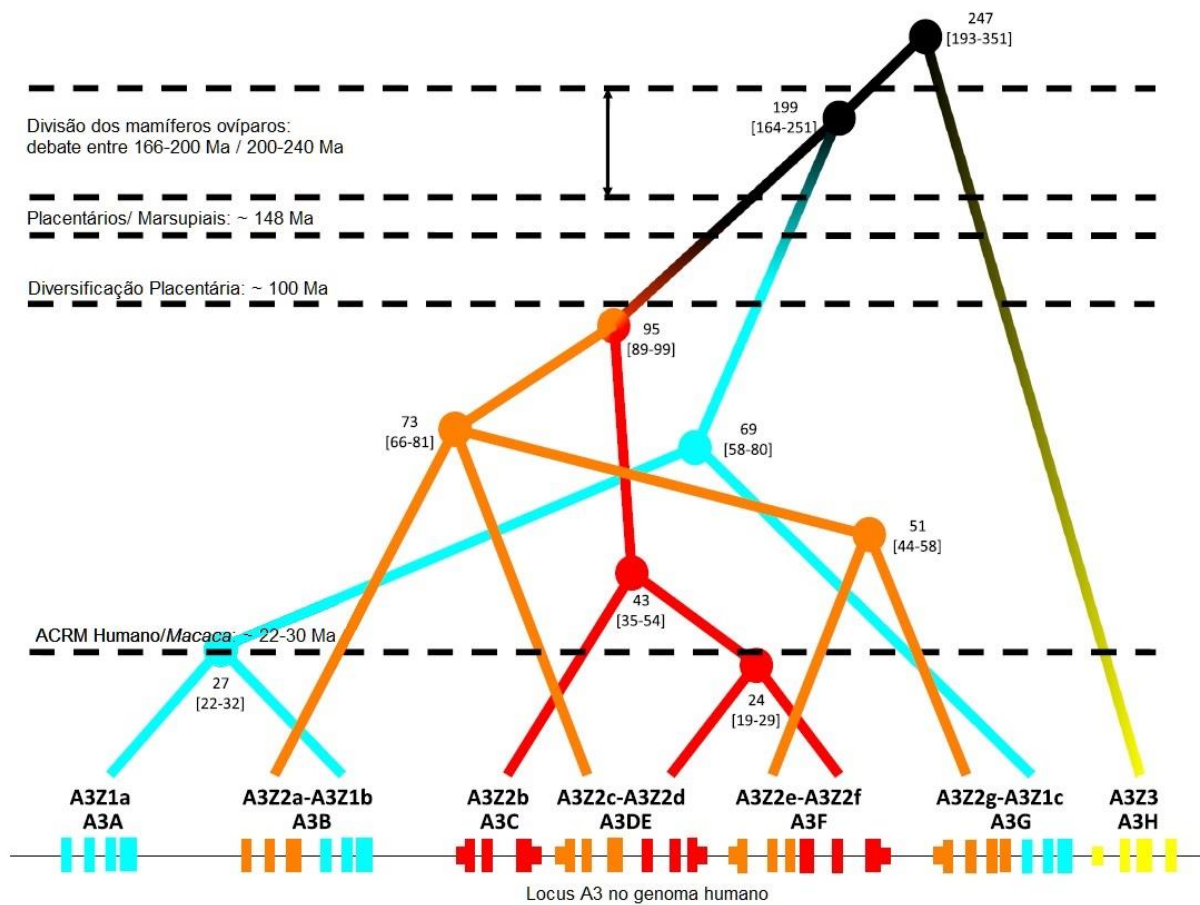


Fig 4. Projeção das relações filogenéticas do locus A3 no genoma humano. Está apresentada tanto a composição dos éxons quanto o arranjo dos genes. Próximos aos círculos estão indicados a idade média, em milhões de anos (Ma), enquanto as linhas tracejadas apontam diversos marcos da evolução dos mamíferos. Observe as relações entre A3DE e A3G. (modificado de Münk, 2012)

### 3.3.2 APOBEC3G

A subunidade 3G da enzima editora do mRNA da apolipoproteína B, também conhecida por APOBEC3G, ou A3G, é uma proteína da superfamília das citidinas deaminases, as quais estão envolvidas com a edição de mRNA e a diversificação do gene da imunoglobulina (FIELDS, 2007). Essa proteína foi identificada em 2002 e, à época, recebeu o nome de CEM15, sendo também descrita sua capacidade de inibir da replicação do HIV-1 e a supressão de sua atividade causada pela Vif (SHEEHY, 2002). A maior parte dos primatas codificam sete genes parálogos da APOBEC3, que variam em suas atividades antivirais e em alvos retrotransposons, sugerindo que estão adaptados a diferentes vírus (DUGGALL, 2012).

A APOBEC3G é uma proteína constitutivamente expressa em muitos tipos celulares, incluindo células T e células germinativas (DUGGALL, 2012). Esta enzima, que é empacotada com o vírion nascente na ausência da proteína Vif, desamina citidinas na fita de DNA complementar (cDNA) viral nascente, durante a transcrição reversa, convertendo-as em uridinas (FIELDS, 2007; ALBERTS, 2010), conforme a figura 5. Isso leva a hipermutações G-para-A no genoma viral, o que leva eventualmente ao término precoce da replicação viral (ALBERTS, 2010). Por sua vez, o HIV codifica a proteína Vif que medeia a ubiquitinação e a degradação mediada pelo proteossomo do complexo proteico APOBEC (ALBERTS, 2010; DUGGALL, 2012).

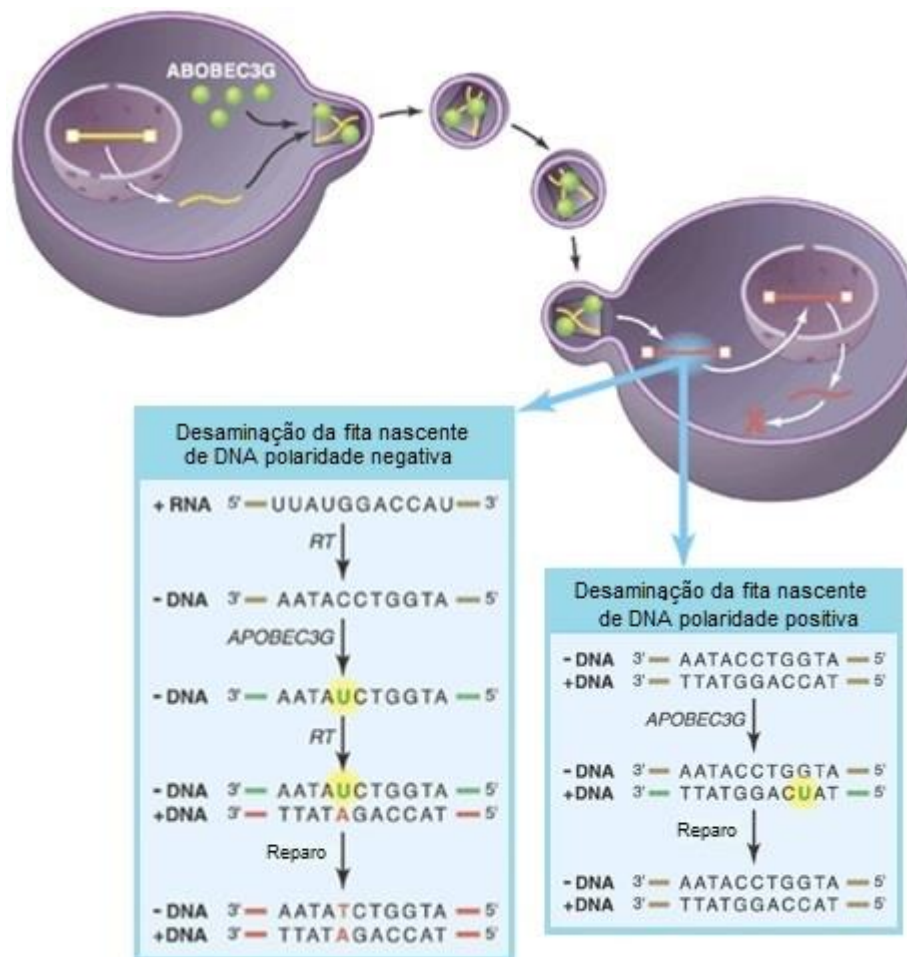


Fig 5. Mecanismo de ação da proteína APOBEC3G. A desaminação da fita nascente de cDNA, ou polaridade negativa, gera hipermutações G → A na fita de DNA polaridade positiva. Esse mesmo efeito não é observado na desaminação da fita nascente de DNA polaridade positiva (modificado de Katharine Sutliff, 2003)

Dada a importância da APOBEC3G como mecanismo bloqueador do HIV-1, seu gene é estudado, tanto nas regiões regulatórias como nas codificantes, a procura de mutações que possam alterar a transcrição ou a sequência de aminoácidos da proteína. Alguns desses estudos são feitos com base nos SNPs (polimorfismos de único nucleotídeo, em inglês) e seus polimorfismos, correlacionando-os com sua influência na progressão dos pacientes soropositivos. An et al, em 2004, descreveram sete desses SNPs, sendo três na região regulatória 5' (-571G/C/T, -199G/A, -90C/G), um no éxon 3 (F119F), outro no éxon 4 (H186R) e dois dentro de íntrons (197193T/C, 199376G/C). Destes, o polimorfismo H186R é o mais estudado, e o genótipo 186R/R já foi associado a uma queda mais rápida dos níveis sanguíneos de células T CD4<sup>+</sup> em relação aos outros dois genótipos (186H/H e 186H/R), mesmo após o aumento da disponibilidade das terapias HAART (AN, 2004).

Em relação ao polimorfismo estudado neste trabalho, -571C/G/T, um estudo brasileiro, realizado com pacientes que não estavam fazendo uso da terapia ART, mas registrados no programa da AIDS do Ministério da Saúde do Brasil, encontrou relação na queda mais acentuada dos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos cujo genótipos são C/G e G/G em comparação com os indivíduos C/C (BIZINOTO, 2011). A importância das regiões promotoras, que regulam o início da transcrição gênica, está no fato de que seus SNPs podem estar envolvidos em alterações do nível de expressão dessa proteína (HOOGENDOORN, 2003). Assim, dada sua importância clínica, o presente trabalho tem por objetivo analisar a frequência desse polimorfismo em pacientes HIV soropositivos e em indivíduos soronegativos.

### 3.3.3 APOBEC3D

Outro membro da superfamília das citidinas deaminases, de nome APOBEC3D, subunidade 3D da enzima editora do mRNA da apolipoproteína B, também conhecido por A3D ou, ainda, APOBEC3DE (A3DE). Isso se deve ao fato de que os genes APOBEC3D e APOBEC3E foram nomeados como genes diferentes, mas estudos posteriores mostraram que A3D e A3E são duas regiões da mesma molécula (DANG, 2006). O mecanismo de ação da A3D contra o HIV-1 é o mesmo do já citado mecanismo da A3G, tanto no que se refere à indução de hipermutações no genoma próviral quanto à encapsulação junto ao vírus nascente e a neutralização pela proteína Vif do HIV-1 (DANG, 2006; CHAIPAN, 2012). Porém, sua atividade antiviral é mais fraca que a de outros componentes da família A3, incluindo A3G (DANG, 2006).



#### 4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo escrito conforme as normas de revista *Infection, Genetics and Evolution*, publicada pela Elsevier (ISSN: 1567-1348).

#### SEQUENCING ANALYSIS OF A SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORFISM IN THE REGULATORY REGION OF APOBEC3G GENE IN HIV + PACIENTS

Jamile Girardi Costenaro<sup>1§</sup>, Fernanda Luz de Castro<sup>1</sup>, Dennis Maletich Junqueira<sup>2,3</sup>, Rúbia Marília de Medeiros<sup>2</sup>, Marcus Braga Knak<sup>1</sup>, Sabrina Esteves de Matos Almeida<sup>2</sup>, Paulo Michel Roehé<sup>1,4</sup>, Ana Cláudia Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Virology Laboratory, Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90150-070

<sup>2</sup>Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Centro de desenvolvimento científico e tecnológico (CDCT), Av. Ipiranga, 5400, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 91530-000

<sup>3</sup>Uniritter Laureate International Universities, Rua Orfanotrófio, 555, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 91849-440

<sup>4</sup>Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada Municipal do Conde, 6000, Eldorado do Sul, RS, Brazil, CEP 92990-000

#### **Proofs should be sent to:**

<sup>§</sup> Jamile Girardi Costenaro

e-mail: jamile\_girardi@yahoo.com.br

Telephone: + 55 51 3308 3655

Fax: + 55 51 3308 3663

Adress: Sarmiento Leite, 500, Cidade Baixa. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

#### **Abstract**

The human immunodeficiency virus (HIV) is a retrovirus able to infect and replicate in CD4-expressing cells and lead to a progressive immunosuppression of infected subjects. One restriction factor with proved importance against HIV is APOBEC3G, which is able to execute guanosine-to-adenosine hypermutations during reverse transcription, introducing mutations in the nascent viral cDNA which may lead to an early interruption of virus replication. The single nucleotide polymorphism -571, in the 5' regulatory region of APOBEC3G was already correlated with lower CD4<sup>+</sup> T cell counts in Brazilian individuals. In this paper, we amplified and sequenced the region of this polymorphism in an attempt to establish a correlation with susceptibility, but found a probable T allele mistaken deposited at SNP

database. To investigate this possibility, new primers will be drawn and used in further sequencings of this genomic region.

Keywords: HIV, polymorphisms, APOBEC3G, A3G, APOBEC3D, A3D

## 1. Introduction

The human immunodeficiency virus (HIV) is a *Lentivirus* from the *Retroviridae* family, which comprises two known types, HIV-1 and HIV-2 (ICTV, 2013). Both viruses are able to infect and replicate in CD4-expressing cells (Royle, 2014), mainly in macrophages and CD4+ T lymphocytes (Iordanskiy, 2013). Nevertheless, HIV-1 and HIV-2 virus are actually different when evolutionary origin and disease progression rate are analyzed: HIV-1 originally derived from the SIV that infects chimpanzees and is the responsible agent of AIDS in the current global pandemic, while HIV-2 originated from SIV infection of sooty mangabeys and is a naturally attenuated form of HIV (Royle, 2014).

The symptomatic disease caused by HIV-1 can be separated in two phases: the highly destructive acute infection in which the virus massively depletes the CD4+ memory T cell compartment; and the chronic phase (AIDS) in which a likely crippled immune system slowly dies. In between these two phases, there is a long period in which HIV maintains stable replication levels (Picker & Watkins, 2005).

Restriction factors are proteins which may be constitutively expressed by different cell types and are able to inhibit the replication of viruses in host cells. One example is the family of cytidine deaminases, known as APOBEC3 (A3), which can be found in many cells types, as T cells and germ cells (Dugall, 2012). One of the member of this family is called APOBEC3G (A3G), whose anti-HIV-1 function has been extensively characterized: its ability to catalyze cytidine deamination of HIV-1 cDNA on the newly synthesized minus strand, which results in guanosine-to-adenosine hypermutations, during reverse transcription (Sheehy & Erthal, 2012; Wang, 2014).

A3G executes its role in the newly infected target cell, consequently it needs to be encapsulated at viral budding. HIV-1, on the other hand, counteracts A3G function through the

expression of the accessory protein Vif. Vif orchestrates proteasomal degradation of A3G, thus preventing its packaging into the budding virion (Wang, 2014).

An *et al.* identified seven polymorphisms in A3G, three belonging to the putative 5' regulatory region (-571C/G, -199C/A and -90C/G), F119F in exon 3, H186R in exon 4 and two within introns (197193T/C and 199376G/C). It is known that regulatory regions of genes, mainly promoters, are involved in the regulation of gene expression, and polymorphisms in these sections might lead to relevant differences at the level of protein function (HOOGENDOORN, 2003). Recently, Bizinoto *et al.* correlated the SNP -571 (rs5757463) with lower CD4<sup>+</sup> T cell counts in heterozygous (CG) and homozygous (GG) individuals when compared to homozygous (CC) individuals. These patients were 400 HIV-seropositive drug-naive patients enrolled in the AIDS program of the Brazilian Ministry of Health, sampled in São Paulo City.

## **2. Theory**

Given the importance of APOBEC3G against HIV-1 infection and the already found correlation between the SNP -571 (rs5757463) and CD4<sup>+</sup> T cell counts in Brazilian HIV seropositive patients, we aim to search for the relation between susceptibility to HIV infection and this SNP in a different group of infected individuals.

## **3. Materials and methods**

### **3.1 DNA samples**

DNA samples were extracted from peripheral blood collected from HIV-1 seropositive patients from Porto Alegre, RS, Brazil. The samples were obtained directly from DNA samples stocked at the Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) of the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). All patients which had their genetic material stored at this repository have signed a term of Free, Prior and Informed Consent (FPIC) and agreed to donate blood samples to DNA extraction. We genotyped, by Sanger sequencing, 64 DNA samples, obtained from HIV positive individuals. To compare the polymorphisms frequency investigated in this population, 59

DNA samples obtained from HIV seronegative subjects were submitted to amplification and sequencing. These samples were obtained at the Hemocentro in Porto Alegre and stored at CDCT as well. Both groups have determined ethnicity.

### **3.2 Determination of polymorphisms of -571 of APOBEC3G**

All of the DNA samples were used as templates to amplify the putative 5' regulatory region of the A3G gene. The primers used in this study were APOBEC3G PR 5' GCATCCCTTGTGTAATTTGTAGG 3' and APOBEC3G PF 5' GAACTTTTGCCCTCTCTTGTC 3' and the amplicon comprises 153pb. The PCRs were optimized and performed in final volumes of 25µl, consisting of 18.3µL of sterile deionized water, 2.5µL 10X PCR Buffer, 1µL dNTP 10mM, 0.5µL MgCl<sub>2</sub> 50mM, 5pM of each primer, 0.5µL dimethyl sulfoxide (DMSO), 1.5U Taq DNA Polymerase and 1µL DNA template. The cycle consisted of a denaturation step at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 seconds (denaturation), 56 °C for 30 seconds (annealing), and 72 °C for 30 seconds (extension). An additional extension step at 72 °C for 3 minutes was applied.

The amplicons obtained were subsequently sequenced, and the sequences were aligned using BioEdit and ClustalW. The allele frequencies were determined by the gene counting method (meaning that the samples' genotypes were determined manually).

## **4. Results**

APOBEC3G is one protein from cytidine deaminases superfamily whose mechanism of action consists in G-to-A hypermutations in the newly transcript cDNA strand of retroviruses, including HIV. The polymorphism -571 (rs5757463) at 5' regulatory region can be involved in different levels of expression of this proteins and alleles are found in different frequencies depending on ethnic of the analyzed subjects (Bizinoto *et al.*, 2011).

At the control group, from a total of 59 samples, in 56 we found the genotype CT. Curiously, in three samples, we found three nucleotides in the same point, all of them CGT, as can be seen in Figure 1 (A and B). These frequencies were calculated: CT 0,949; TCG 0,051.

In relation to the HIV-seropositive patients, from 64 DNA samples, we found 57 samples with the genotype CT and three GT. In the others four samples, the same unusual CGT genotype appears, as seen on Figure 1 (C, D and E). These frequencies were calculated: CT 0,8906; CGT 0,062; GT 0,047.

As a point mutation is uncommon to have three nucleotides, we stopped here the statistical analysis to verify what was occurring.

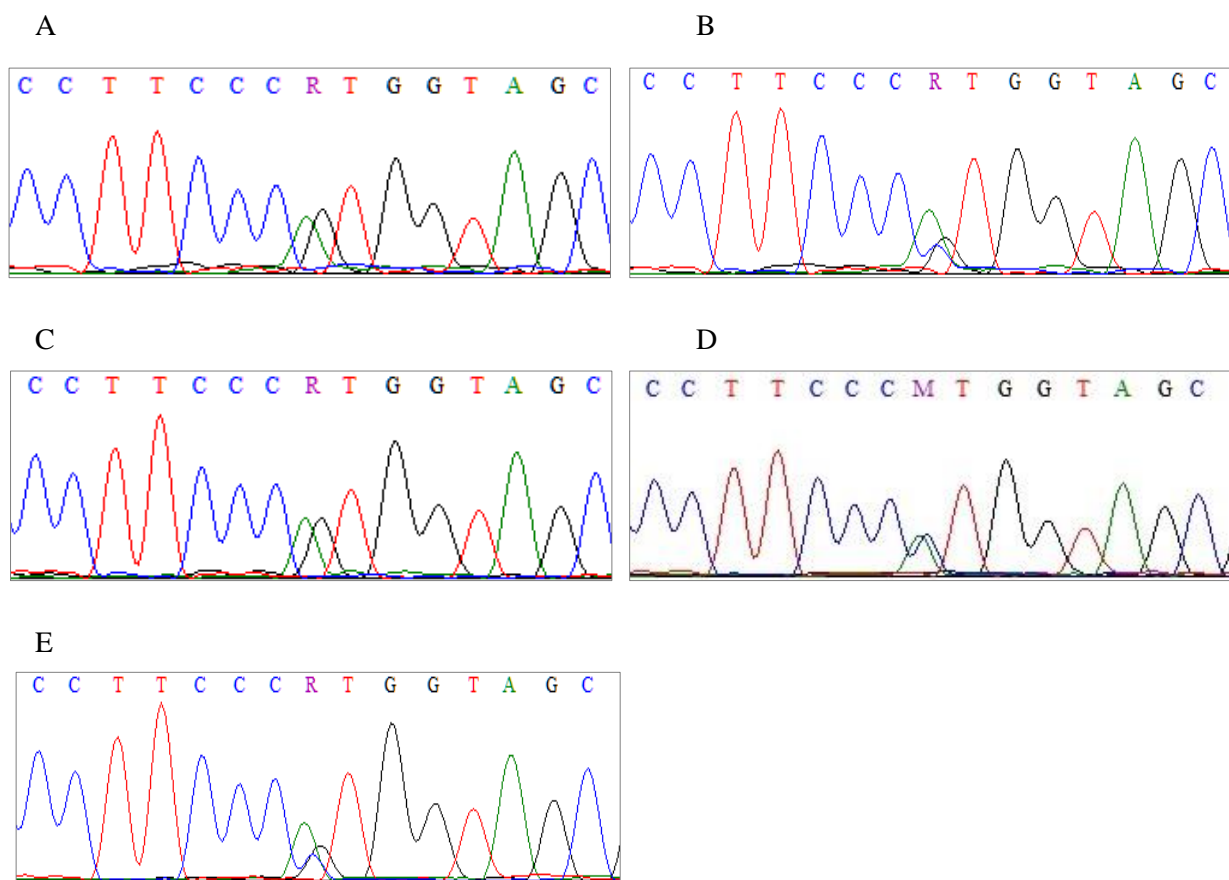


Fig. 1 Sequencing of PCR for SNP -571 of APOBEC3G gene, all the five of them in reverse strands. A) African subject, HIV-seronegative, genotype CT. B) African subject, HIV-seronegative, genotype CGT. C) HIV-seropositive patient, genotype CT. D) HIV-seropositive patient, genotype GT. E) HIV-seropositive patient, genotype CGT.

## 5. Discussion

According to NCBI *SNP database* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=5757463](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5757463)), the polymorphism -571

(rs5757463) has as ancestral allele the nucleotide C (frequency at least 0.8594, data from NCBI *1000 Genomes Browser* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>) and the latter SNP nucleotide G (higher frequency 0.1406, from the same NCBI *1000 Genomes Browser*). An unpublished research driven by GRIFFITHS, M; HUNT, S. and MULLIKIN, J.C. (2003) and another, also unpublished, from NING, Z.; COX, A.J. and MULLIKIN, J.C. (2001) claim to have found the genotype CT. Both groups deposited this genotype at NCBI *SNP database*.

As we can observe, C is the ancestral allele, nucleotide G is the classical mutation and nucleotide T the most recent, given deposited data. Then we would expect to find, in a random population, from the higher to the lowest genotype frequency: CC, CG, GG, CT, GT and TT. Supposing we didn't had a random population, we yet would expect some homozygotes subjects (TT, CC or GG), but none was found. Several research groups found the expected frequencies – for genotypes CC, CG and GG –, in distinct ethnics. The data from NCBI *1000 Genomes Browser* shows that the general allele frequency was 0.0725 for nucleotide G and 0.9275 for nucleotide C. The frequencies found by *1000 Genomes Project*, by ethnicity was: allele G = 0.0820, allele C = 0.9180 (Americans of African ancestry); allele G = 0.0529, allele C = 0.9471 (Utah Residents with Northern and Western European ancestry); allele G = 0.0773, allele C = 0.9227 (Han Chinese in Beijing, China); allele G = 0.1050, allele C = 0.8950 (Southern Han Chinese); allele G = 0.0083, allele C = 0.9917 (Colombians from Medellin, Colombia); allele G = 0.0699, allele C = 0.9301 (Finnish in Finland); allele G = 0.0843, allele C = 0.9157 (British in England and Scotland); allele G = 0.0357, allele C = 0.9643 (Iberian population in Spain); allele G = 0.0787, allele C = 0.9213 (Japanese in Tokyo, Japan); allele G = 0.1406, allele C = 0.8594 (Luhya in Webuye, Kenia); allele G = 0.0234, allele C = 0.9766 (Mexican ancestry from Los Angeles, USA); allele G = 0.0636, allele C = 0.9364 (Puerto Ricans from Puerto Rico); allele G = 0.0357, allele C = 0.9643 (Toscani in Italia); allele G = 0.0852, allele C = 0.9148 (Yoruba in Ibadan, Nigera).

Starting from the assumption the triple peak should not be found and had a higher frequency than genotype GT, we forced a search at NCBI *Blast Nucleotide* of a sequence with nucleotide T in this point, looking for some analogous region, where our primers could anneal. The result was two

sequences from regulatory region of two distinct APOBEC3 (G, as planned, and D), almost identical. At this point, we aligned these APOBEC3 genes and one of our samples and, as can be seen at Figure 2, only one nucleotide changes: C, the reference for A3G, and T, the reference for A3D.

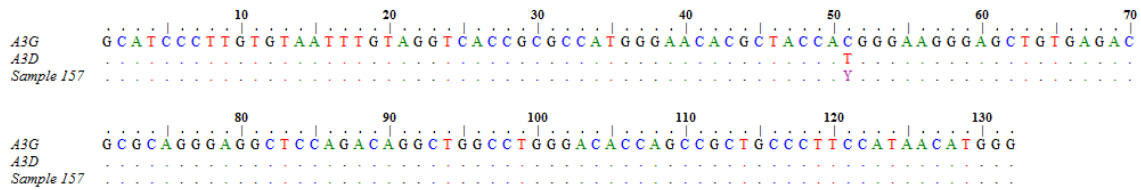


Fig. 2 Alignment of regulatory region of APOBEC3G, APOBEC3D and forward sequence of HIV-seropositive patient (the same sample used on Fig. 1 A), showing the unique nucleotide difference between them: C in A3G, T in A3D and Y (TC genotype) in 157.

Therefore, the observed T allele present into the TCG genotype is probably due to concomitant amplification of A3D and A3G genes. Hypothetically, if we had disconsidered the nucleotide T and made the frequency calculation for CC, CG and GG, they would be within the expected results, as deposited at NCBI *database*. Indeed, it cannot be done because it would decrease the verity of this research. Due to this information, one possible solution would be redesigning the pair of primers, considering the high similarity of APOBEC3D and APOBEC3G.

However, this analysis proved to be important because it raises the question about the real existence of allele T in the 5' putative regulatory region of ABOBEC3G. And, if it proves to be wrong, we suggest the rectification of this information at NCBI and others SNPs databases to avoid future similar mistakes.

## 6. Conclusions

This unexpected results found by sequencing culminated bringing out a possible inaccuracy in relation to a potential inexistent allele in the polymorphism. Such allele was submitted twice, by two research groups, over ten years ago to a reference database and, if we are right, they could misguided others studies about the polymorphism -571 (rs5757463). To prove our point of view, primers which differentiate A3G and A3D or only anneal at A3G must be drown, then PCRs must be redone and sequencing reanalyzed.

As known, this polymorphism belongs to a 5' regulatory region and possibly alter the gene expression of APOBEC3G, the most important antiretroviral protein from its family. To analyze its expression, phenotypic experiments should be driven.

Otherwise, would be interesting if the others six polymorphisms found by *An et al.* were sequenced and related to a more ethnically homogeneous population, like Brazilians. As well, phenotypic testes could be performed to investigate how these alleles modify expression or function of these APOBEC3G.

## References

- ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>>. Access in October 25, 2014.
- Royle, C.M., Graham, D. R., Sharma, S., Fuchs, D., Boasso, A, 2014. HIV-1 and HIV-2 Differentially Mature Plasmacytoid Dendritic Cells into IFN-Producing Cells or APCs. *J Immunol.* 193, 3538-3548.
- Iordanskiy, S., Santos, S., Bukrinsky, M., 2013. Nature, nurture and HIV: The effect of producer cell on viral physiology. *Virology.* 443, 208-213.
- Picker, L.J., Watkins, D. I., 2005. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol.* 6, 430-432.
- Duggal, N.K., Emerman, M, 2012. Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 687-695.
- Sheehy, A.M., Erthal, J, 2012. APOBEC3 versus Retroviruses, Immunity versus Invasion: Clash of the Titans. *Mol. Biol. Int.*, 2012, 1-11.
- Wang, Y., Kinlock, B.L., Shao, Q., Turner, T.M., Liu, B., 2014. HIV-1 Vif inhibits G to A hypermutations catalyzed by virus-encapsidated APOBEC3G to maintain HIV-1 infectivity. *Retrovirology.*, 11, 1-10.
- An, P., Bleiber, G., Duggal, P., Nelson, G., May, M., Mangeat, B., Alobwede, I., Trono, D., Vlahov, D., Donfield, S., Goedert, J.J., Phair, J., Buchbinder, S., O'Brien, S.J., Telenti, A, Winkler,



- C.A., 2004. APOBEC3G Genetic Variants and Their Influence on the Progression to AIDS. *J. Virol.*, 78, 11070-11076.
- Bizinoto, M.C., Leal, É., Diaz, R.S., Janini, L.M., 2011. Loci polymorphisms of the APOBEC3G gene in HIV Type 1-infected Brazilians. *AIDS res. hum. retrov.*, 27, 137-141.
- Hoogendoorn, B., Coleman, S.L., Guy, C.A., Smith, K., Bowen, T., Buckland, P.R., O'Donovan, M.C., 2003. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 2249-2254.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A presença de um pico triplo no mesmo ponto nos sequenciamentos, genótipo CGT, acabou por indicar o alinhamento dos nossos *primers* em duas regiões distintas do genoma. Para elevar o grau de confiança dessa afirmação, novos *primers*, que alinhem apenas na região 5' regulatória da APOBEC3G serão desenhados, e as PCRs e sequenciamentos refeitos. Com esses dados, uma relação com a suscetibilidade ao HIV será investigada. Contudo, recomenda-se uma nova análise nos dois SNPs submetidos ao banco de dados do NCBI em 2001 e 2003, pois é possível que esse mesmo erro tenha acontecido nestes trabalhos. Por se tratar de uma região regulatória, seria muito interessante a análise fenotípica da expressão da APOBEC3G nos diferentes genótipos -571 (CC, CG e GG).

Além disso, An *et al.* encontrou outros seis polimorfismos no gene da APOBEC3G. Igualmente serão desenhados pares de *primers* para análise desses genótipos e verificação de uma possível correlação entre eles e a infecção pelo HIV. Assim, ensaios fenotípicos podem ser feitos para analisar o efeito desses SNPs na expressão ou função dessa proteína.

## BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO E CONCLUSÃO

Alberts B, Johnson J, Lewis J, Raff M, Roberts, K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

An P, Bleiber G, Duggal P, Nelson G, May M, Mangeat B, Alobwede I, Trono D, Vlahov D, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, Buchbinder S, O'Brien SJ, Telenti A, Winkler CA. APOBEC3G Genetic Variants and Their Influence on the Progression to AIDS. *Journal of Virology* v.78 (20): 11070-11076, 2004.

Bizinoto, MC, Leal É, Diaz RS, Janini LM. Loci polymorphisms of the APOBEC3G gene in HIV Type 1-infected Brazilians. *AIDS Research and Human Retroviruses* v.27 (2): 137-141, 2011.

Chaipan, C, Smith JL, Hu W-S, Pathak VK. APOBEC3G Restricts HIV-1 to a Greater Extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in Human Primary CD4<sup>+</sup> T Cells and Macrophages. *Journal of Virology* v.87 (1): 444-453, 2012.

Dang, Y, Wang X, Esselman WJ, Zheng Y-H. Identification of APOBEC3DE as Another Antiretroviral Factor from the Human APOBEC Family. *Journal of Virology* v.80 (21): 10522-10533, 2006.

Duggal NK & Emerman M. Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nature Reviews - Immunology* v.12: 687-695, 2012.

Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, O'Donovan MC. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Human Molecular Genetics* v.12 (18): 2249–2254, 2003.

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>>. Acesso em: 25 de outubro de 2014.

Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, Navaratnam N. An Anthropoid-Specific Locus of Orphan C to U RNA – Editing Enzymes on Chromosome 22. *Genomics* v.79 (3): 285-296, 2002.

Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields' Virology*. 5<sup>ed</sup>. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

Linde ME, Colquhoun DR, Mohien CU, Kole T, Aquino V, Cotter R, Edwards N, Hildreth JEK, Graham DR. The Conserved Set of Host Proteins Incorporated into HIV-1 Virions Suggests a Common Egress Pathway in Multiple Cell Types. *Journal of Proteome Research* v.12 (5): 2045–2054, 2013.

Luban J. Innate Immune Sensing of HIV-1 by Dendritic Cells. *Cell Host & Microbe* v. 12, 2012.

Ministério da Saúde, Brasil. *Boletim Epidemiológico HIV – AIDS*. Brasília, 2013. Disponível em <[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/\\_p\\_boletim\\_2013\\_internet\\_pdf\\_p\\_\\_51315.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/_p_boletim_2013_internet_pdf_p__51315.pdf)>.

Münk C, Willemsen A, Bravo IG. An ancient history of gene duplications, fusions and losses in the evolution of APOBEC3 mutators in mammals. *BMC Evolutionary Biology* v.12 (71): 1-15, 2012.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL, Simon F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine* v.15 (8): 871-872, 2009.

Rossmann MG & Rao VB (eds.), *Viral Molecular Machines, Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2012

Royle CM, Graham DR, Sharma S, Fuchs D, Boasso A. HIV-1 and HIV-2 Differentially Mature Plasmacytoid Dendritic Cells into IFN-Producing Cells or APCs. *The Journal of Immunology* v.193: 3538-3548, 2014.

Sheehy, A. M. et al. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* v.418: 646-650, 2002.

Wang Y, Kinlock BL, Shao Q, Turner TM, Liu B. HIV-1 Vif inhibits G to A hypermutations catalyzed by virus-encapsidated APOBEC3G to maintain HIV-1 infectivity. *Retrovirology* v.11 (89), 2014.

WHO: *World Health Organization*. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/en/>>. Acesso em 28 de outubro de 2014.

## ANEXO A

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto de Pesquisa: "Avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica de pacientes infectados com HIV-1"**

**Pesquisadora Principal:** Sabrina Esteves de Matos Almeida - telefone 3352-0336, email: sabrinamatos.almeida@gmail.com e endereço: Av. Ipiranga, 5400. 3º andar. Bairro Jardim Botânico – PoA.  
**Pesquisadores envolvidos:** Maria Cristina Cotta Matte<sup>1,2</sup>, Rúbia Marília de Medeiros<sup>1,2</sup>, Dennis Maletich Junqueira<sup>1,2</sup>, Leonardo Augusto Luvison Araújo<sup>1</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>2</sup>, Cynara Nunes Carvalho<sup>3</sup>, Marineide Gonçalves de Melo<sup>4</sup>, Breno Riegel Santos<sup>4</sup>, Luiz Fernando Job Jobim<sup>5</sup>, Maria Lucia Rossetti<sup>1</sup>.

- |  |                     |
|--|---------------------|
| 1. Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FEPPS              | Tel: (51) 3352-0336 |
| 2. Laboratório de Imunogenética – UFRGS                                    | Tel: (51) 3308-6737 |
| 3. Serviço de Atendimento Especializado da Vila dos Comerciantes - SMS/PoA | Tel: (51) 3289-4097 |
| 4. Serviço de Infectologia - Hospital Nossa Senhora da Conceição           | Tel: (51) 3357-2126 |
| 5. Serviço de Imunologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre            | Tel: (51) 3359-8020 |

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: "Avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica de pacientes infectados com HIV-1" que tem como objetivo principal avaliar fatores imunológicos que estão envolvidos na progressão da AIDS. O tema escolhido se justifica, pois pode propiciar um maior entendimento sobre os mecanismos envolvidos na infecção pelo HIV e auxiliar em um acompanhamento e tratamento adequado para todos os pacientes soropositivo. Além disso, pode propiciar novos estudos que tenham como objetivo o desenvolvimento de novos medicamentos ou vacinas. O trabalho está sendo realizado sob orientação da pesquisadora Sabrina Esteves de Matos Almeida. Para alcançar os objetivos do estudo será realizada uma entrevista individual, na qual você irá responder 22 perguntas pré-estabelecidas. Os dados de identificação serão confidenciais e os nomes reservados. Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pelo(a) pesquisador(a) principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96).

**Como são feitas as análises?** As análises do DNA dos genes do sistema imune serão realizadas a partir de coleta de sangue, como uma coleta normal para hemograma. Com o uso de agulhas e seringas descartáveis será coletada de você uma amostra de sangue (quantidade aproximada de uma colher de sopa). Esta coleta será feita por um indivíduo treinado. Após, o sangue será examinado para determinar variações genéticas referentes ao sistema imune. As amostras serão identificadas por números. Todos os dados que vinculem sua identidade com os dados obtidos a partir de sua amostra de sangue serão mantidos em um banco de dados sigiloso, ao qual só terão acesso os pesquisadores acima citados.

**Quais os riscos em participar?** Não há riscos em participar do projeto. Poderá, no entanto, haver formação de um hematoma no braço em função da coleta de sangue.

**O que o paciente ganha com este estudo?** Embora este trabalho não possa gerar nenhum benefício imediato aos participantes, este estudo poderá trazer vários benefícios em longo prazo (conhecimento das características genéticas presentes na nossa população) podendo assim, auxiliar em novas diretrizes do tratamento e acompanhamento futuro dos pacientes que vivem com HIV/AIDS. Este estudo não fornecerá nenhum auxílio financeiro aos participantes.


**Quais são os seus direitos?** Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo só poderão ser usados para fins científicos, e você não será identificado por nome. Sua participação no estudo é voluntária, caso você decida não participar, isto não afetará no tratamento normal que você tem direito. Além disso, você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, caso desejar. Você poderá procurar qualquer pesquisador envolvido para responder a qualquer pergunta ou obter esclarecimentos acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa. Caso você queira esclarecer alguma dúvida sobre as questões éticas deste projeto você poderá entrar em contato Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407.

EU \_\_\_\_\_, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informado:

\* Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.

Versão Aprovada em

30 NOV. 2010  
  
 Daniel Demétrio Faustino da Silva  
 Coordenador-geral do CEP-GHC

\* De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim.

\* Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.

\* Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora Sabrina Esteves de Matos Almeida no telefone 3352-0336, email: [sabrinamatos.almeida@gmail.com](mailto:sabrinamatos.almeida@gmail.com) e endereço: Av. Ipiranga, 5400. 3º andar. Bairro Jardim Botânico – Porto Alegre.

\* Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407.

\* Se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com qualquer um dos pesquisadores envolvidos.

Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Nome do entrevistado: \_\_\_\_\_ Assinatura do entrevistado \_\_\_\_\_

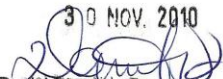
Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_ (nome do paciente) em  
 / / (data) pelo \_\_\_\_\_ (nome do pesquisador) enquanto eu  
 estava presente.

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_ Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

**Versão Aprovada em**

30 NOV. 2010

  
 Daniel Demétrio Faustino da Silva  
 Coordenador-geral do CEP-GHC

## ANEXO B

## Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.  
Av. Francisco Train, 596  
CEP 91380-200 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3357.2000  
CNPJ: 92.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO  
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa  
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.  
Rua Domingos Rubbo, 20  
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3357.4100  
CNPJ: 92.787.128/0001-78

HOSPITAL FEMINA S.A.  
Rua Mostarato, 17  
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3314.5200  
CNPJ: 92.893.134/0001-53



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em 30 de novembro de 2010, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

**Projeto:** 10-213

**Versão do Projeto:**

**Versão do TCLE:**

**Pesquisadores:**


JOSÉ ARTUR BOGO CHIES  
LUIZ FERNANDO JOBIM  
MARIA CRISTINA COTTA MATTE  
RÚBIA MARÍLIA MEDEIROS  
DENNIS MALETICH JUNQUEIRA  
LEONARDO AUGUSTO LUVISON ARAÚJO  
CYNARA CARVALHO NUNES  
MARINEIDE GONÇALVES DE MELO  
BRENO RIEGEL SANTOS  
MARIA LÚCIA ROSA ROSSETTI  
SABRINA ESTEVES DE MATOS ALMEIDA

**Título:** Avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica de pacientes infectados com HIV-1.

Documentação: Aprovados  
Aspectos Metodológicos: Aprovados  
Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC. Lembramos do compromisso de encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.

  
Daniel Demétrio Faustino da Silva  
Coordenador-geral do CEP/GHC

Porto Alegre, 30 de novembro de 2010.