

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Influência dos genes HLA classe I na progressão para a Aids em indivíduos HIV positivos

Maria Cristina Cotta Matte

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr José Artur Bogo Chies

Porto Alegre, março de 2012

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Agências financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Fundo de Incentivo à pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA)
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Instituições

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT)
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS)

Laboratório de Imunogenética
Departamento de Genética
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Serviço de Imunologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Serviço de Infectologia
Hospital Nossa Senhora da Conceição

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais por acreditarem e apoiarem de forma incondicional todos os meus sonhos e vibrarem com as minhas conquistas;

Agradeço às minhas amigas de longa data (Barbara, Carol Ardrizzo, Carol Lopes, Clarissa, Débora e Paula) pela amizade, companheirismo e pela força na reta final do mestrado.

Agradeço ao Felipe pelo carinho, amor e incentivo durante esse último ano.

Agradeço a todos meus colegas do CDCT pelo companheirismo e apoio no dia-a-dia de trabalho, especialmente a Regina, a Racka, a Lu Nunes e o Serginho.

Agradeço aos colegas do melhor grupo de pesquisa em HIV do mundo, Leo, Tales, e Tiago pelos momentos de descontração e estudo.

Agradeço especialmente ao Dennis por todos os ensinamentos e por ser incansável na hora de ajudar.

Agradeço a Rúbia por dividir comigo todas as alegrias e tristezas do mestrado nos últimos dois anos. Este trabalho certamente não seria possível sem a tua ajuda.

Agradeço a minha chefíssima Sabrina por acreditar no meu potencial ainda na iniciação científica e me dar a oportunidade de trabalhar na pesquisa com HIV.

Agradeço ao meu orientador, Prof. José Artur por acreditar neste trabalho e torná-lo possível.

Agradeço a ajuda de toda equipe do Serviço de Infectologia do Hospital Conceição e a equipe do Serviço de Imunologia do HCPA.

Por fim, meu sincero agradecimento a todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo.

Sumário

Abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	7
Capítulo 1: Introdução	8
1. Vírus da Imunodeficiência Humana.....	8
2. Epidemiologia HIV/Aids	9
3. Curso Clínico da Infecção pelo HIV	10
4. Diferentes tipos de progressão para a Aids.....	13
5. Fatores Envolvidos na progressão para a Aids	16
5.1 Fatores Virais	16
5.2 Fatores do Hospedeiro	18
5.2.1 Fatores de Restrição Viral.....	18
5.2.2 O Sistema Imunológico	19
6. Genes do sistema imunológico associados à progressão para Aids	21
6.1 A influência dos alelos HLA-B na progressão para a Aids	26
6.2 A influência dos alelos HLA-A na progressão para a Aids	30
6.3 A influência do HLA-G na progressão para a Aids	31
7. A influência dos alelos HLA classe II na progressão para a Aids	34
8. Novos polimorfismos identificados em GWAS e sua influência na susceptibilidade e progressão da infecção pelo HIV-1	35
Capítulo 2: Objetivos	37
Capítulo 3: Manuscrito.....	38
Abstract	39
Introduction	40
Materials and Methods	42
Results	44
Discussion	47
References	52
Tables	57
Figure 1.	63
Capítulo 4: Dados Complementares	65
Capítulo 5: Discussão.....	69
Referências	74
Anexos.....	84

Abreviaturas

- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- APOBEC – Complexo de Edição Apolipoproteína B (*Apolipoprotein B Editing Complex*)
- CE – Controlador de elite (*Elite controller*)
- CRF – Formas Recombinantes Circulantes (*Circulating Recombinant Forms*)
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- HAART – Terapia Antirretroviral Potente (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)
- HCP5 – Complexo HLA P5 (*HLA Complex P5*)
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
- HLA – Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)
- IP – Inibidor da Protease
- ITRN – Inibidor Transcriptase Reversa Nucleosídeo
- ITRNN - Inibidor Transcriptase Reversa Não-Nucleosídeo
- KIR – Receptor do tipo imunoglobulina da célula NK (*Killer Ig-like Receptor*)
- LTNP – Não progressores de longo termo (*Long-term nonprogressor*)
- MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Complex of Histocompatibility*)
- NK – Células Exterminadoras Naturais (*Natural Killer*)
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- RNA- Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)
- SNP – Polimorfismo de base única (*Single Nucleotide Polymorphism*)
- SSO – Sequência de Oligonucleotídeos Específicos (*Sequence Specific Oligonucleotide*)
- SSP – Sequência de Primers Específicos (*Sequence Specific Primers*)
- TCR – Receptor de célula T (*T cell receptor*)
- TR – Transcriptase Reversa
- URF –Formas Recombinantes Únicas (*Unique Recombinant Forms*)

Resumo

A epidemia da aids é caracterizada por uma alta heterogeneidade no curso clínico da infecção pelo HIV-1. Enquanto alguns indivíduos progridem para aids em até três anos após a soroconversão, uma pequena parcela, chamada de progressores lentos, permanece assintomática e mantém seus níveis de T-CD4+ estáveis por mais de 10 anos. O papel das moléculas de HLA classe I, tais como HLA-A e HLA-B tem sido investigado para tentar explicar as diferenças observadas na progressão da infecção pelo HIV-1. Estudos recentes têm chamado a atenção para o papel dos genes de classe I não clássicos, como *HLA-G*, visto que esta molécula está envolvida na supressão da resposta do sistema imunológico durante as infecções virais. No presente estudo, noventa e oito pacientes com critérios bem definidos de progressão à aids foram selecionados, dos quais 48 foram classificados como progressores crônicos, 29 como progressores lentos e 21 como progressores rápidos. Nossos resultados suportam o papel do genótipo homozigoto para HLA na rápida progressão para a aids, assim como a o efeito protetor do alelo HLA-A*3 no tempo de progressão da infecção. Além disso, este é o primeiro trabalho que investiga a influência dos polimorfismos 14pb inserção/deleção e +3142 G/C do gene *HLA-G* na progressão para a aids e os resultados obtidos apontam para um importante papel desta molécula na progressão da doença. A ausência de marcadores genéticos classicamente envolvidos com a progressão rápida e lenta para a aids, neste grupo de pacientes HIV positivos, enfatiza a importância de estudos genéticos em diferentes populações.

Abstract

The AIDS epidemic is characterized by an extreme heterogeneity in the clinical course of HIV-1 infection. Whereas some individuals progress to AIDS within three years after seroconversion, a small percentage, called long-term nonprogressors, remain asymptomatic and maintain stable T-CD4⁺ cell counts for more than 10 years. The role of HLA class I molecules, such as HLA-A and HLA-B, have been investigated to explain the differences observed on progression to AIDS. Recent studies have focused on the potential effect of non-classical HLA I genes, as *HLA-G*, since this molecule is involved in the suppression of immune responses against viral infections. In the present study, ninety-eight patients with well defined criteria of clinical progression to AIDS were selected, of which 48 subjects were classified as chronic progressors, 29 as long-term nonprogressors and 21 as rapid progressors. Our results support the role of HLA homozygous genotypes on rapid progression to AIDS as well as the protective effect of the HLA-A*3 allele in the progression of the infection. Furthermore, this is the first study that assessed the influence of the *HLA-G* polymorphisms 14bp insertion/deletion and +3142 G/C on AIDS progression and the results obtained indicate an important role of this molecule on AIDS progression. The absence of classical genetic markers related to rapid and long-term nonprogression to AIDS in this group of HIV-infected patients emphasizes the importance of study genetic diversity among different populations.

Capítulo 1: Introdução

1. Vírus da Imunodeficiência Humana

O Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês HIV - *Human Immunodeficiency Virus*) é um retrovírus da família *Lentiviridae*, o qual possui o genoma composto por duas fitas de RNA idênticas não-complementares, que encontram-se associadas à enzima Transcriptase Reversa (TR) (PRESTON *et al.*, 1988; SCHWARTZ e NAIR, 1999). O genoma deste vírus é formado por aproximadamente 10.000 nucleotídeos, organizados em nove regiões gênicas, que codificam 19 proteínas distintas (MUESING *et al.*, 1985). Estas proteínas podem ser divididas em três classes de acordo com a sua funcionalidade: (i) as proteínas estruturais Gag, Pol e Env que são responsáveis pela maquinaria de replicação e pela estrutura dos vírions; (ii) as proteínas regulatórias Tat e Rev que são responsáveis pela transcrição e tradução dos genes virais; e (iii) as proteínas acessórias Nef, Vif, Vpr e Vpu/Vpx, as quais são responsáveis por diversas funções, incluindo o escape do sistema imunológico (COSTIN, 2007).

Análises filogenéticas permitem a separação do HIV em dois tipos (HIV-1 e 2), sendo o tipo 1 responsável pela pandemia atual. O HIV-1 ainda pode ser dividido em quatro grupos distintos (M, N, O e P), além de subtipos (Grupo M: A-D, F-H, J e K) e formas recombinantes (CRFs e URFs) (ROBERTSON *et al.*, 2000; GERETTI, 2006; PLANTIER *et al.*, 2009). A alta variabilidade genética encontrada nesse vírus é atribuída principalmente à infidelidade da enzima TR na incorporação de nucleotídeos no processo de transcrição reversa durante a replicação viral (PRESTON *et al.*, 1988; RAMBAUT *et al.*, 2004). Esta elevada diversidade implica em importantes desafios para a compreensão da patogênese viral e o desenvolvimento de vacinas (GERETTI, 2006; HEMELAAR *et al.*, 2006).

O HIV é transmitido principalmente por contato sexual, sanguíneo e transmissão vertical (durante o parto ou aleitamento materno) (SINGH *et al.*, 2008). Este vírus é capaz de infectar diferentes tipos celulares, dos quais se destacam os linfócitos T-CD4+ (DALGLEISH *et al.*, 1984). A entrada do HIV na célula hospedeira é dependente da interação inicial entre as proteínas do envelope viral com o receptor CD4 da membrana celular, seguida da ligação do vírus aos co-receptores CXCR4 ou CCR5, dois membros da superfamília de receptores acoplados a proteína-G, os quais funcionam como receptores para as alfa e beta-quimiocinas respectivamente (FREED, 2001; RAMBAUT

et al., 2004; BRUMME *et al.*, 2005). As partículas virais que utilizam o co-receptor CCR5, conhecidas por R5, são predominantemente encontradas no curso inicial da infecção e, provavelmente, são as variantes transmitidas de um indivíduo a outro. Por outro lado, as partículas que utilizam o co-receptor CXCR4, chamadas de X4, são frequentemente encontradas nos estágios mais avançados da infecção, precedendo o desenvolvimento da aids (BRUMME *et al.*, 2005; MOYLE *et al.*, 2005).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o capsídeo é desintegrado, expondo o material genético viral no citoplasma da célula, local onde o RNA viral será convertido a cDNA no processo denominado Transcrição Reversa e posteriormente, integrado ao genoma da célula hospedeira. Os transcritos gerados a partir do DNA darão origem a novas fitas de RNA viral e a diferentes proteínas virais necessárias para formação de novos vírions, os quais sairão da célula hospedeira por um processo denominado brotamento (SCHWARTZ e NAIR, 1999; FANALES-BELASIO *et al.*, 2010).

2. Epidemiologia HIV/Aids

Desde sua identificação, em 1983, como agente causador da aids (do inglês - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), o HIV tornou-se um grave problema de saúde pública mundial (BARRÉ-SINOUSSE *et al.*, 1983). Apesar da redução de 19% no número de novos casos no período entre 1999 e 2009, 33,3 milhões (31,4 milhões–35,3 milhões) de pessoas ainda encontram-se infectadas por esse vírus em todo o mundo (UNAIDS, 2011).

A África subsaariana continua a liderar as estatísticas, apresentando os piores índices em relação ao número de pessoas vivendo com HIV (22,5 milhões) (UNAIDS, 2011). Na América do Sul, a epidemia sofreu uma estabilização entre 1990-2009 em relação ao número de novos casos (Figura 1). Por outro lado, o número total de infectados aumentou de 1,1 milhão (1,0 milhão–1,3 milhões) em 2001 para 1,4 milhões (1,2 milhões–1,6 milhões) em 2009. O acréscimo no número de indivíduos HIV positivos em conjunto com a estabilização do número de casos novos é resultado decorrente principalmente das políticas públicas de prevenção e do acesso à medicação antirretroviral, que proporcionou o aumento da expectativa de vida do paciente HIV positivo (UNAIDS, 2011).

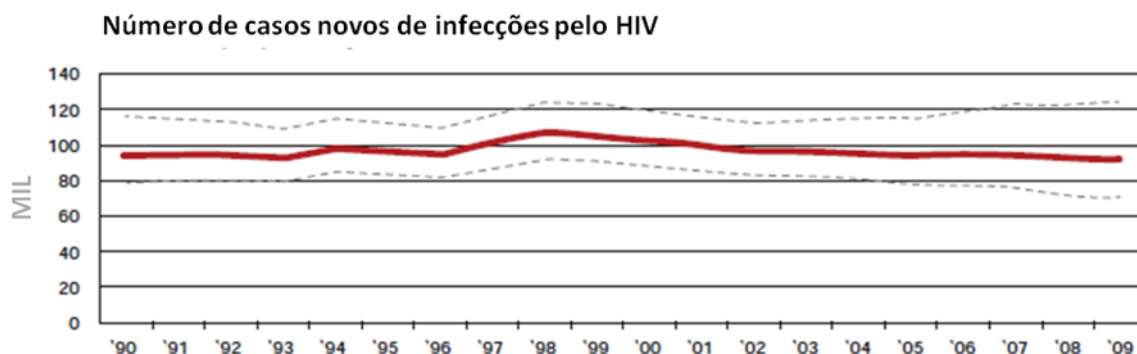


Figura 1: Número de novos casos de infecções por HIV na América Central e América do Sul entre 1990-2009. A linha vermelha indica a média do número de casos novos ao longo dos anos, enquanto que as linhas pontilhadas indicam o desvio padrão. (Adaptado de: Global Report – UNAIDS, 2011)

Cerca de 1/3 da população HIV positiva da América Central e Sul, reside no Brasil. Segundo estimativas do Ministério da Saúde, até 2011, 608.230 pessoas, com idades entre 15-49 anos, foram infectadas no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apesar do crescimento no número de casos de aids entre as mulheres nos últimos anos, o estudo realizado por Barbosa *et al.*, 2009 demonstrou que homens que praticam sexo com homens (HSH) e usuários de drogas injetáveis (UDI) masculinos continuam a apresentar maiores riscos de infecção comparados a população em geral.

O estado do Rio Grande do Sul ocupa o primeiro lugar no ranking brasileiro com relação à incidência da infecção, apresentando uma taxa de 37,6. Da mesma forma, Porto Alegre, capital do estado, representa a cidade com a maior taxa de incidência do país, apresentando 99,8 casos/100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Apesar dos números alarmantes, o Brasil registrou uma leve queda no número de casos novos de aids - de 35,9 mil (2009) para 34,2 mil em 2011 - assim como nas taxas de mortalidade. De forma semelhante ao declínio mundial, esse fato reflete os benefícios da medicação antirretroviral na qualidade de vida dos pacientes HIV positivos e os resultados satisfatórios das campanhas de prevenção da transmissão do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

3. Curso Clínico da Infecção pelo HIV

O curso clínico clássico da infecção pelo HIV-1 até o desenvolvimento da aids pode ser dividido em três etapas distintas: fase aguda, fase crônica e aids, conforme representado na figura 2. Após a entrada do vírus no corpo humano podemos observar um período de incubação que pode variar de 3 a 6 semanas, o qual reflete o tempo entre

a exposição do indivíduo ao vírus até o surgimento dos primeiros sinais e sintomas da infecção. Após esta fase, o vírus inicia sua disseminação pelo organismo principalmente através dos tecidos linfáticos (MINDEL e TENANT-FLOWERS, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A primeira etapa da infecção (fase aguda) caracteriza-se pela rápida expansão da replicação viral, a qual é parcialmente controlada por uma resposta imunológica efetiva (FAUCI *et al.*, 1996). Essa fase pode apresentar-se ao hospedeiro de forma assintomática ou com sintomas inespecíficos - Síndrome Retroviral Aguda - com duração de 1 a 4 semanas, o que pode dificultar o diagnóstico precoce da infecção. A rápida resposta do sistema imunológico neste período permite, em parte, a estabilização da replicação viral (*set point* viral), além da restauração dos níveis de linfócitos T-CD4+ e o aumento do número absoluto de linfócitos T-CD8+ circulantes (FAUCI *et al.*, 1996; FANALES-BELASIO *et al.*, 2010). Algumas evidências indicam que a imunidade celular, caracterizada pela resposta mediada por linfócitos T-CD4+/T-CD8+, desempenha um papel fundamental no controle da viremia durante os estágios iniciais da infecção (CHAKRABARTI e SIMON, 2010).

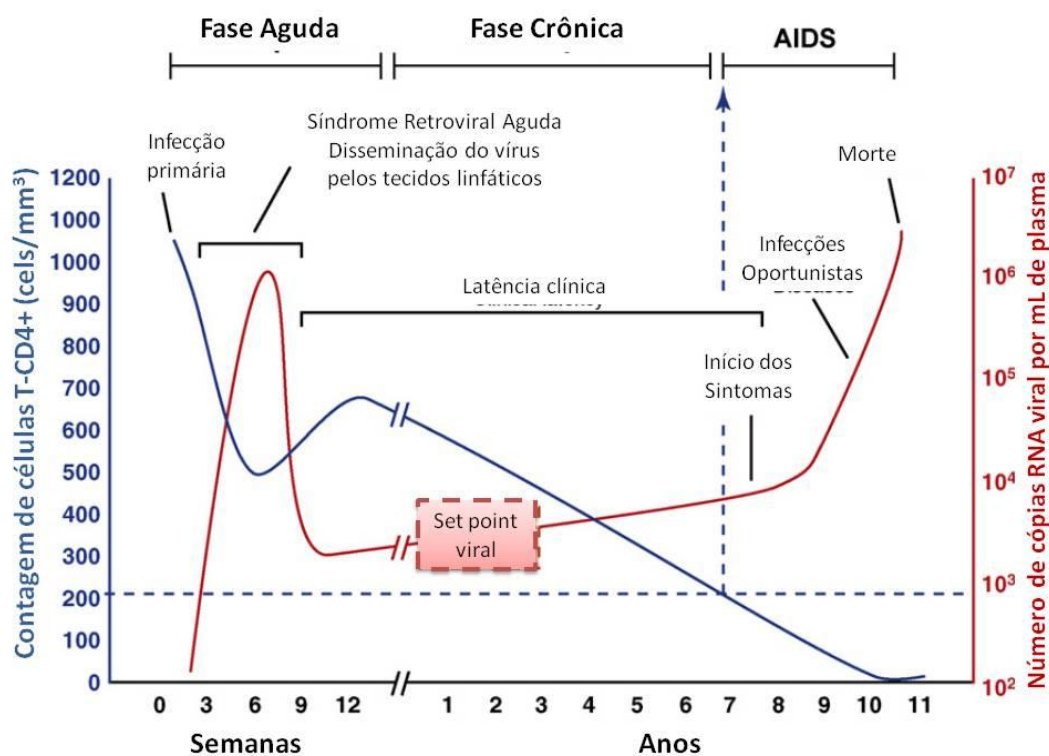


Figura 2: Curso clínico natural da Infecção pelo HIV-1. A fase aguda caracteriza-se pela rápida expansão da replicação viral e queda inicial da contagem de linfócitos T-CD4+. Esta fase é parcialmente controlada por uma rápida resposta do sistema imunológico que permite, em parte, a estabilização da

replicação viral (*set point* viral) e a restauração parcial dos níveis de linfócitos T-CD4+, dando início a fase crônica da infecção. A fase crônica se caracteriza por um longo período assintomático onde a replicação viral se mantém estabilizada, enquanto os níveis de T-CD4+ diminuem lentamente. Quando os níveis de linfócitos T-CD4+ diminuem drasticamente identifica-se a fase de aids, na qual se o paciente não for tratado, pode ir a óbito (Adaptado de: An e Winkler, 2010).

A fase crônica se caracteriza por um longo período assintomático onde a replicação viral se mantém estabilizada, enquanto os níveis de T-CD4+ diminuem lentamente (BACCHETTI e MOSS, 1989). Esta fase pode ter uma duração de 4 a 10 anos, sendo o tempo de progressão diretamente relacionado à velocidade da replicação viral e conseqüentemente à queda dos níveis de T-CD4+. Quando os níveis de linfócitos T-CD4+ diminuem drasticamente (< 200 células/mm³), o sistema imunológico se torna ineficaz no combate a agentes externos e o hospedeiro permanece vulnerável ao aparecimento de infecções oportunistas. Neste estágio final, identifica-se a fase de aids (PEDERSEN *et al.*, 1989), na qual se o paciente não for tratado, pode ir a óbito.

O tratamento antirretroviral, conhecido por TARV ou HAART (do inglês, HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*) se baseia na administração de três ou mais fármacos de diferentes classes. O principal objetivo da terapia é suprimir a replicação viral, restaurando parcialmente os níveis de linfócitos T-CD4+ do paciente, aumentando a sobrevida do indivíduo HIV positivo (CRESSEY e LALLEMANT, 2007; COHEN *et al.*, 2008).

Atualmente, estão disponíveis para o tratamento seis classes distintas de medicamentos, as quais são divididas de acordo com o seu mecanismo de ação: Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos (ITRN); Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Nucleosídeos (ITRNN); Inibidores da Protease (IP); Inibidores de Fusão, Inibidores da Integrase e Antagonistas de CCR5 (CRESSEY e LALLEMANT, 2007). Os principais alvos dessas medicações incluem as enzimas essenciais do ciclo replicativo viral - Transcriptase Reversa, Protease e Integrase - ou ainda a inibição da entrada do vírus na célula, através do bloqueio de glicoproteínas de superfície virais ou dos co-receptores da célula hospedeira.

Na década de 90, o Brasil foi pioneiro ao promover a distribuição gratuita dos medicamentos antirretrovirais para pacientes HIV positivos, se tornando uma referência internacional no tratamento da aids. Atualmente, aproximadamente 197.000 indivíduos recebem a medicação gratuitamente pela rede pública de saúde, o que representa cerca

de 95% dos pacientes diagnosticados com HIV e elegíveis para o tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008a).

Segundo o Ministério da Saúde (2008), o início do tratamento antirretroviral é recomendado para pacientes assintomáticos que apresentam contagem de linfócitos TCD4+ entre 200 e 350 células/mm³ ou carga viral elevada persistente. Quanto mais próximo de 200 células/mm³, maior é o risco de progressão da infecção para o estágio de aids, especialmente se associada à viremia elevada. Na presença de co-infecções (como HCV, HBV) e doenças crônicas o tratamento é iniciado independentemente da situação imunológica do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008a). É importante ressaltar que o tratamento é crônico, e uma vez iniciado, deve ser mantido pelo resto da vida.

No caso de gestação, a terapia deve ser administrada a todas as mulheres infectadas pelo HIV, independentemente da sua situação virológica, clínica ou imunológica. O objetivo do tratamento profilático é evitar a transmissão vertical, que pode chegar a 30% caso não haja intervenção. Esta é a única situação onde o uso da medicação antirretroviral pode ser interrompido, caso a gestante não apresente indicações clínicas, como contagem de T-CD4+ <350 células/mm³ após o parto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b).

Apesar das facilidades e conquistas obtidas até o momento, o tratamento é crônico e complexo, apresentando muitos efeitos adversos, o que torna a aderência do paciente ao tratamento um desafio (CARR e COOPER, 2000). Além disso, mutações de resistência associadas ao mau uso da medicação (SANTOS e SOARES, 2010) e até em pacientes virgens de tratamento (*naive*) (MEDEIROS *et al.*, 2011) dificultam o manejo terapêutico e sua completa eficiência.

4. Diferentes tipos de progressão para a Aids

Durante os últimos anos, a heterogeneidade frente à progressão para a aids vem chamando a atenção de especialistas. A susceptibilidade à infecção pelo HIV e o curso clínico da aids resultam da combinação de fatores virais como *fitness* viral, *set point* viral e a presença de mutações de escape de células T citotóxicas (T-CD8+); e de fatores do hospedeiro, como taxa de declínio de linfócitos T-CD4+ e ativação de uma resposta imunológica efetiva (SINGH *et al.*, 2008; KAUR e MEHRA, 2009a; AN e WINKLER, 2010).

Diversas definições já foram propostas para distinguir pacientes que progridem de uma forma rápida daqueles que evoluem lentamente para a aids (KLEIN e MIEDEMA, 1995; PEREYRA *et al.*, 2008; GRABAR *et al.*, 2009 OKULICZ *et al.*, 2009). A definição mais atual acerca dessas categorias foi proposta por Casado *et al.*, 2010 e está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos diferentes tipos de progressão para aids

Classes de progressão para a aids	Características
Progressores lentos	Controladores de elite (CE) -Infecção assintomática acima de 10 anos após soroconversão; -RNA viral plasmático, sem terapia antirretroviral, abaixo dos níveis de detecção (<50 cópias/mL); -Episódios isolados de viremia acima de 1000 cópias/mL, desde que não consecutivas e que representem a minoria das determinações disponíveis; -Representam menos de 1% dos pacientes soropositivos.
	Controladores da viremia -Infecção assintomática acima de 10 anos após soroconversão; -RNA viral plasmático, sem terapia antirretroviral, igual ou inferior a 2000 cópias/mL; -Episódios isolados de viremia acima de 2000 cópias/mL, desde que estes representem a minoria das determinações disponíveis; -Representam menos de 3% dos pacientes soropositivos.
	Não-Controladores da viremia -Infecção assintomática acima de 10 anos após soroconversão; -RNA viral plasmático, sem terapia antirretroviral, acima de 2000 cópias/mL, em mais de 50% das amostras; -Frequência desconhecida na população HIV positiva.
Progressores típicos	-Infecção sintomática ou início de TARV até 10 anos após a soroconversão; -No mínimo 3 determinações de RNA viral plasmático, na ausência de terapia antirretroviral, acima de 2000 cópias/mL.
Progressores rápidos	-Duas ou mais medidas de T-CD4+ abaixo que 350 cels/mm ³ até 3 anos após a soroconversão; -Início de terapia antirretroviral até 3 anos após soroconversão; -Desfecho aids ou morte decorrente de aids até 3 anos após soroconversão.

Adaptado de Casado *et al.*, 2010

Uma pequena parcela da população HIV positiva apresenta a habilidade de controlar a replicação viral e manter seus níveis de linfócitos T-CD4+ elevados por um

período de tempo prolongado, desta forma, evoluindo lentamente para o estágio de aids, mesmo na ausência de terapia antirretroviral. Esses pacientes são conhecidos como progressores lentos ou LTNP (do inglês LTNP - *long-term nonprogressors*) e representam aproximadamente 5-15% da população total dos indivíduos HIV positivos (CAO *et al.*, 1995; GRABAR *et al.*, 2009; OKULICZ *et al.*, 2009).

Com o advento de técnicas moleculares, foi possível dividir o grupo de pacientes progressores lentos em 3 subcategorias de acordo com a sua viremia plasmática durante a fase assintomática da doença: controladores de elite, controladores da viremia e não-controladores da viremia (PEREYRA *et al.*, 2008; OKULICZ *et al.*, 2009). Os pacientes conhecidos como controladores de elite (CE) representam menos que 1% dos indivíduos infectados pelo HIV-1. Este grupo é considerado um modelo de controle da replicação viral, pois sua principal característica é manter a carga viral abaixo do limite de detecção do teste (<50 cópias/mL) por longos períodos após a soroconversão (GRABAR *et al.*, 2009; O'CONNELL *et al.*, 2009). Os indivíduos controladores da viremia também apresentam a capacidade de controlar a replicação viral (<2000 cópias/mL), contudo, em um menor grau quando comparado aos controladores de elite. O controle da carga viral parece ocorrer nos estágios iniciais da infecção na maioria dos indivíduos, com um tempo médio de um ano após a soroconversão (OKULICZ *et al.*, 2009). De forma oposta, pacientes intitulados não-controladores da viremia não apresentam a habilidade de manter a viremia plasmática abaixo de 2000 cópias/mL, todavia são considerados progressores lentos por apresentarem infecção assintomática, sem medicação antirretroviral, por um período superior a 10 anos após a soroconversão (HAYNES, *et al.*, 1996; CASADO *et al.*, 2010).

Ao contrário dos progressores lentos, aproximadamente 10% da população HIV positiva progride para aids em um período de tempo muito curto. Os pacientes progressores rápidos têm como principais características: altas taxas de replicação viral, queda brusca de linfócitos T-CD4+ e evolução para aids em um período de até três anos após a soroconversão (DALMAU *et al.*, 2009; CASADO *et al.*, 2010).

Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos nos diferentes tipos de progressão, estudos recentes têm investigado o papel de fatores virais e do hospedeiro na evolução na doença. Como resultado, tem-se demonstrado uma grande influência de fatores imunológicos na habilidade de controlar a replicação viral (TRACHTENBERG e ERLICH, 2001; SINGH *et al.*, 2008; SALGADO *et al.*, 2011). A identificação de genes que modulam o curso clínico da infecção torna possível o desenvolvimento de

novas estratégias terapêuticas, as quais podem ser utilizadas na rotina clínica e tratamento do paciente HIV positivo. Esta estratégia é particularmente importante para os pacientes que progridem mais rapidamente à aids, visto que prever um rápido avanço da infecção pode contribuir para o aumento da sobrevivência destes indivíduos.

5. Fatores Envolvidos na progressão para a Aids

5.1 Fatores Virais

Inicialmente acreditava-se que os diferentes padrões de progressão para a aids estavam condicionados a presença de alterações no genoma ou proteínas virais. Os primeiros trabalhos realizados demonstraram que os pacientes assintomáticos por longos períodos encontravam-se infectados por partículas virais replicativamente deficientes, sendo as mutações no gene *nef* desses vírus identificadas como as principais causas para o baixo *fitness* viral nesses pacientes (KLEIN e MIEDEMA, 1995). A proteína Nef é a primeira a ser detectada após a infecção em uma célula e sua expressão parece ter diversas consequências, incluindo a modulação da presença da molécula de CD4 na superfície celular e a facilitação da infecção pelo HIV (COSTIN, 2007). Desta forma, a ausência de uma enzima plenamente ativa, seria certamente prejudicial ao vírus e estaria diretamente relacionada à evolução lenta da doença.

Deacon *et al.*, 1995 descreveu seis pacientes infectados a partir de um mesmo doador de sangue, os quais não apresentaram evolução para o quadro de aids, em um período de 10 a 14 anos. Análises moleculares do genoma viral identificaram distintas mutações no gene *nef*, confirmado, desta forma, a influência de fatores virais da evolução para a aids. Contudo, trabalhos posteriores relataram um grupo de controladores de elite infectados com partículas virais replicativamente competentes e sem qualquer alteração no seu genoma viral. Sendo assim, atualmente, acredita-se que as mutações presentes tanto no gene *nef*, quanto em outros locais do genoma do vírus, não sejam a resposta chave para a progressão lenta na maior parte dos indivíduos que apresentam essa característica (HUANG *et al.*, 1995; KLEIN e MIEDEMA, 1995).

A formação de sincício e a persistência da antigenemia durante a infecção pelo HIV-1 foram outros dois importantes marcadores prognósticos previamente investigados. A indução da formação de sincício, caracterizada pela fusão de várias células uninucleadas infectadas em uma única célula multinucleada, está relacionada à

presença de linhagens virais, conhecidas por X4, que utilizam predominantemente o co-receptor CXCR4 para entrada na célula hospedeira (COAKLEY *et al.*, 2005).

O surgimento das variantes X4 ocorre principalmente nos estágios tardios da infecção, geralmente precedendo o desenvolvimento da aids. Esta variante é considerada mais patogênica quando comparada com a R5, pois está associada a um aumento da carga viral, progressão acelerada da doença, além de uma alta eficiência na infecção contínua de linfócitos T-CD4⁺ (SCHWARTZ e NAIR, 1999; COAKLEY *et al.*, 2005). Por outro lado, as linhagens descritas como não-indutoras de sincício, infectam monócitos, macrófagos e células T primárias utilizando co-receptores do tipo CCR5 e são frequentemente encontradas nos estágios iniciais da infecção (TOULOUMI e HATZAKIS, 2000; COAKLEY *et al.*, 2005; MOYLE *et al.*, 2005).

A persistência de antigenemia se caracteriza pela presença contínua do antígeno p24 na circulação sanguínea. A proteína p24 é codificada pelo gene *gag* e tem como função formar a estrutura do capsídeo viral, que circunda o material genético do vírus. Essa proteína é o primeiro marcador detectado sericamente após a infecção pelo HIV, desaparecendo naturalmente ao longo do tempo. A persistência de níveis elevados desse antígeno na circulação é resultado da baixa produção de anticorpos pelo hospedeiro, em conjunto com uma replicação viral ativa e por isso, pode estar relacionada à rápida progressão para aids (RINALDO *et al.*, 1989).

Apesar da investigação do papel dos três marcadores descritos acima no prognóstico da infecção pelo HIV-1, atualmente a característica viral mais utilizada para prever a evolução clínica do paciente é o *set point* viral (FELLAY *et al.*, 2007). O período assintomático da infecção é caracterizado por uma grande heterogeneidade na viremia plasmática, a qual pode variar de 1000 a 1 milhão de cópias/mL entre os indivíduos. Pacientes que apresentam carga viral elevada no início da fase crônica são mais propensos a atingirem níveis críticos de linfócitos T-CD4⁺ (<200 células/mm³) rapidamente, desta forma progredindo em menos tempo para aids, quando comparado a indivíduos com baixa viremia plasmática (FRASER *et al.*, 2007). Apesar das medidas de RNA viral serem importante fator prognóstico em momentos iniciais da infecção, tem sido demonstrado que, nos estágios tardios, a predição da aids através da contagem de células T-CD4⁺, é considerada mais relevante do que as medidas de carga viral.

5.2 Fatores do Hospedeiro

5.2.1 Fatores de Restrição Viral

Uma das primeiras barreiras impostas pelo hospedeiro para tentar frear a infecção pelo HIV é exercida pelo conjunto de fatores de restrição viral APOBEC3G, Teterina e Trim5. Esses fatores representam um mecanismo de defesa intrínseca, o qual é ativado imediatamente após a entrada do vírus no corpo humano (KAUR e MEHRA, 2009a; CHAKRABARTI e SIMON, 2010).

A APOBEC3 (do inglês - *Apolipoprotein B Editing Complex*) foi a primeira família de fatores antivirais identificada. Ela apresenta a função de citidina desaminase, que consiste em remover o grupamento amina das citidinas, convertendo-as em uridinas no DNA viral, resultando na instabilidade do novo transcrito viral. Por outro lado, a ação da APOBEC3 pode ser inibida pela presença da proteína Vif, a qual é responsável por auxiliar na infecciosidade da nova partícula viral (KAUR e MEHRA, 2009a; CHAKRABARTI e SIMON, 2010).

A Trim5 α é capaz de se ligar às proteínas do capsídeo viral, induzindo seu desmantelamento precoce, afetando diretamente o ciclo replicativo do vírus. Este bloqueio parece ocorrer logo após a entrada do vírus na célula hospedeira, contudo os mecanismos exatos pelos quais esse fator consegue inibir a replicação viral ainda não estão completamente esclarecidos (KAUR e MEHRA, 2009a; NEIL e BIENIASZ, 2009). Por último, a proteína Teterina apresenta ação central contra a proteína viral Vpu, desta forma impedindo a liberação da nova partícula viral e sua disseminação pelo organismo (NEIL e BIENIASZ, 2009; CHAKRABARTI e SIMON, 2010).

Apesar de eficientes, os fatores de restrição virais são extremamente polimórficos na população, o que contribui de certa forma, para a variabilidade do hospedeiro na susceptibilidade e progressão da infecção (CHAKRABARTI e SIMON, 2010). Como é o caso de todas as doenças infecciosas, a susceptibilidade dos indivíduos expostos ao HIV é uma função dependente da variabilidade genética do patógeno, do ambiente e do hospedeiro (CARRINGTON e O'BRIEN, 2003). Além dos fatores de restrição viral, uma lista crescente de genes do sistema imunológico humano que afetam de alguma maneira a resposta ao HIV vem surgindo nos últimos anos (AN e WINKLER, 2010).

5.2.2 O Sistema Imunológico

O sistema imunológico é uma organização de células e moléculas com funções especializadas para defender o organismo contra infecções por agentes externos (DELVES e ROITT, 2000a). Este sistema é classicamente composto por duas frentes de defesa: a imunidade inata e a adaptativa, sendo a cooperação dessas duas, necessária para a elaboração de uma resposta imunológica efetiva (TAKEUCHI e AKIRA, 2009). A imunidade inata representa a primeira linha de combate contra a invasão por microorganismos e é mediada principalmente pelas células fagocíticas (macrófagos, monócitos, neutrófilos), pelas células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos), além das células dendríticas e *Natural Killer* (NK) (DELVES e ROITT, 2000a; MEDZHITOV, 2007). As células e moléculas que constituem esse sistema são responsáveis pela criação de uma resposta inflamatória, além de emitir uma sinalização específica para ativação da resposta imune adaptativa (MEDZHITOV, 2007).

Diferentemente da imunidade inata, a resposta adaptativa é altamente específica, de longa duração e se caracteriza pelo aparecimento da memória imunológica, mas somente está plenamente ativa em fases avançadas das infecções (O'CONNELL *et al.*, 2009). As células que compõem a imunidade adaptativa são responsáveis pela criação de dois tipos de resposta, celular e humoral, as quais se distinguem quanto à forma de combate ao patógeno. Enquanto a resposta celular é mediada pelas células T-CD4+ e T-CD8+, a resposta humoral é comandada pelos linfócitos B, os quais se diferenciam em plasmócitos para a produção de anticorpos específicos.

Os linfócitos do tipo T-CD4+ têm como funções principais a secreção de citocinas para sinalização celular, a ativação dos linfócitos B e a manutenção da resposta mediada pelos linfócitos T-CD8+ (DELVES e ROITT, 2000b). Os linfócitos T-CD8+, por sua vez, são descritas como células citotóxicas, visto que através da liberação de seus grânulos líticos, levam a célula infectada a apoptose (DELVES e ROITT, 2000b; TRACHTENBERG e ERLICH, 2001).

Através dos receptores de superfície TCR, as células T-CD4+ e T-CD8+ são capazes de reconhecer antígenos exógenos e endógenos à célula apresentadora, os quais são apresentados no contexto de MHC classe II ou MHC I (do inglês MHC - *Major Complex of Histocompatibility*) respectivamente (DELVES e ROITT, 2000a). As células T-CD8+ apresentam um importante papel no processo de infecção viral, visto

que a maior parte dos antígenos virais apresentados ao sistema imune deriva de uma proteólise intracelular e é transportada até a superfície da célula infectada complexada a moléculas de MHC classe I (BASHIROVA *et al.*, 2011).

Com relação à eficiência da resposta imunológica nos diferentes tipos de progressão à aids, a resposta celular parece exercer um papel infinitamente maior do que a resposta humoral no controle da infecção pelo HIV-1. Sabe-se que as células T-CD8+ estão presentes durante todo o período de latência do vírus e que estas são responsáveis pela proteção durante a progressão lenta da doença. Indivíduos progressores lentos e controladores de elite parecem apresentar células T-CD8+ específicas com capacidade proliferativa aumentada, principalmente nos estágios iniciais da infecção, quando comparado com progressores típicos (DYER *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* demonstram que as células T-CD8+ desses pacientes possuem a capacidade de inibir a replicação viral, mesmo na ausência de um sinal para sua ativação, o que sugere a presença de um repertório celular específico, o qual é capaz de exercer rapidamente as suas funções antivirais (SÁEZ-CIRIÓN *et al.*, 2007; TRACHTENBERG e ERLICH, 2001; EMU *et al.*, 2008; CHAKRABARTI e SIMON, 2010).

A resposta citotóxica das células T-CD8+ é principalmente direcionada a peptídeos derivados de regiões virais altamente conservadas, como a proteína p24 da Gag, o que confere uma alta eficiência nessa resposta em suprimir a replicação viral e desta forma modular o tempo de progressão para aids. No estudo realizado por Dyer *et al.*, 2008 os pacientes com carga viral elevada não demonstraram uma resposta proliferativa específica para o antígeno p24, diferentemente do observado nos pacientes progressores lentos com supressão da carga viral. Apesar dos achados promissores, o mecanismo da eficiência das células T-CD8+ em controladores de elite e LTNP ainda não está totalmente elucidado.

Assim como os linfócitos T-CD8+, as células T-CD4+ desses pacientes parecem ter sua capacidade replicativa e habilidade de secreção de citocinas aumentada. Essas duas características podem explicar, em parte, a manutenção dos níveis de linfócitos T-CD4+ durante a infecção, nos paciente com progressão lenta. Ainda não está claro o papel isolado das células T-CD4+ no bloqueio da infecção pelo HIV, contudo sabe-se que essas são necessárias para ativação e manutenção de resposta citotóxica mediada pelas células T-CD8+ durante a infecção crônica (CHAKRABARTI e SIMON, 2010; BASHIROVA *et al.*, 2011).

6. Genes do sistema imunológico associados à progressão para Aids

A resposta imune contra a infecção pelo HIV-1 é mediada por diversos fatores do hospedeiro, os quais estão relacionados, direta ou indiretamente, no reconhecimento do vírus, sinalização e amplificação da resposta imunológica. Algumas variantes genéticas que atuam favorecendo a infecção ou modulando a resposta imune já foram claramente identificadas como marcadores de susceptibilidade e progressão para a aids (AN; WINKLER, 2010).

Uma variante do gene CCR5, descrita em 1996, foi o primeiro marcador identificado capaz de interferir na susceptibilidade ao HIV. A deleção de 32 pares de base (conhecida por alelo $\Delta 32$) no gene deste co-receptor de entrada viral leva à formação de uma proteína truncada, a qual não consegue ser transportada e expressa na superfície celular. A ausência do receptor confere resistência à entrada de variantes virais do tipo R5 na célula hospedeira. Indivíduos homozigotos para a mutação são menos suscetíveis a infecção pelo HIV, mas podem ser infectados caso adquiram uma variante viral do tipo X4 (LIU *et al.*, 1996; MOYLE *et al.*, 2005). Já a presença de somente uma única cópia do alelo mutado foi associada à progressão lenta para aids (DEAN *et al.*, 1996; O'BRIEN e NELSON, 2004). Análises populacionais estimam que a frequência do alelo $\Delta 32$ apresenta uma variação de 4-16% em europeus e descendentes europeus, enquanto que na população africana essa mutação não é encontrada (MARTINSON *et al.*, 1997). Na população brasileira, a frequência também apresenta variações (4,2 a 6,4%), sendo que na população Afro-descendente as frequências observadas são inferiores àquela da população euro-descendente (0,7 a 2.6%) (VARGAS *et al.*, 2006).

A substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 64 (V64I) da região transmembrana do quimiorreceptor CCR2 também foi associada à progressão lenta para aids. O mecanismo protetor da variante 64I ainda não é completamente compreendido, pois este polimorfismo encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos da região promotora do gene CCR5, as quais também exercem importante papel na regulação da expressão do gene e conseqüentemente na modulação da infecção. Além disso, a mutação V64I não provoca diferenças na produção do receptor, nem na habilidade de seus produtos se ligarem ao HIV. Porém, uma das hipóteses apresentadas para o seu efeito protetor está relacionada com a habilidade

desse polimorfismo em limitar a transição de variantes R5 para variantes mais patogênicas do tipo X4, desta forma retardando o desenvolvimento da aids (O'BRIEN e NELSON, 2004; SINGH *et al.*, 2008).

O segundo fator genético de maior importância na susceptibilidade ao HIV e progressão para aids, após a mutação $\Delta 32$ do gene CCR5, é o complexo MHC, o qual nos humanos é denominado HLA (do inglês HLA – *Human Antigen Leukocyte*). O complexo HLA reside no cromossomo 6p21.31 sendo o conjunto gênico mais polimórfico do genoma de mamíferos, contemplando 128 genes. Esse *loci* pode ser dividido em três regiões distintas, as quais são responsáveis por codificar as proteínas de classe I, II e III respectivamente (Figura 4) (TRACHTENBERG e ERLICH, 2001; LI e RAGHAVAN, 2010).

A região do HLA classe I engloba os genes *HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L*, sendo os genes *HLA-A, B, C* responsáveis pela produção das glicoproteínas clássicas encontradas em todas as células nucleadas do organismo, enquanto os demais são considerados HLAs não clássicos. Na região do HLA classe II são encontrados os genes: *HLA-DRA; DRB1-9; DQA1,2; DQB1,3; DOA, DOB, DMA; DMB; DPA1,1; DPB1,2; TAP1,2; LMP2,7; e MICA-E*, porém somente os genes *HLA-DP, DQ, DR* são consideradas moléculas de histocompatibilidade clássicas, as quais são encontradas somente nas células profissionais apresentadoras de antígenos (DONADI, 2000a). O HLA classe III contém diversos genes que de alguma forma participam da modulação da resposta imunológica. Dentre elas, destacam-se as proteínas de choque térmico, fator de necrose tumoral e proteínas do complemento (TRACHTENBERG e ERLICH, 2001).

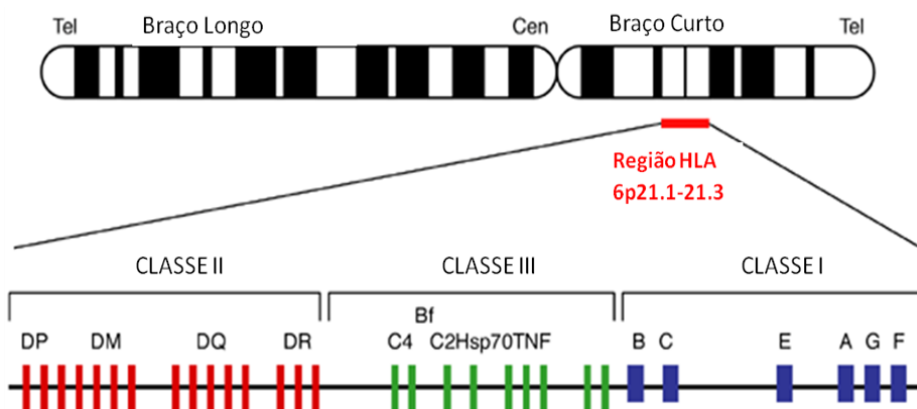


Figura 3. Mapa da região do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) no cromossomo 6. Essa região pode ser dividida em três classes: I, II e III. Nesta figura estão representados os principais genes das diferentes classes do sistema HLA. Adaptado de: Mehra and Kaur, 2003. Expert Reviews in Molecular Medicine Vol. 5; 24: <http://www.expertreviews.org/>

Diversos estudos já evidenciaram que, dentre os fatores genéticos envolvidos na resposta imune contra o HIV, o HLA parece exercer uma forte influência no controle da replicação viral e progressão da doença (TRACHTENBERG *et al.*, 2003; ALTFELD *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2009). Este papel está principalmente associado à extensa variabilidade genética dessas moléculas, o que contribui amplamente para o reconhecimento de uma larga variedade de antígenos e indução de uma resposta imunológica efetiva pelos linfócitos T-CD4⁺ e T-CD8⁺ (TRACHTENBERG e ERLICH, 2001; LI e RAGHAVAN, 2010).

Três modelos evolutivos têm sido propostos para explicar a manutenção da alta diversidade deste sistema ao longo do tempo: seleção balanceadora, seleção dependente de frequência e por último, vantagem do heterozigoto. A seleção balanceadora atua de forma que os mesmos alelos que tornam um indivíduo susceptível a alguma infecção, conferem proteção contra outra patologia, modulando desta forma a frequência desses alelos na população. Já a seleção dependente de frequência propõe que o patógeno evolui como forma de escapar de uma resposta imune efetiva, a qual é mediada por alelos comuns na população, mas se mantém susceptível a respostas mediadas por alelos raros (CARRINGTON e O'BRIEN, 2003).

Finalmente, a hipótese da “vantagem do heterozigoto” é uma das mais aceitas atualmente, e propõe que indivíduos heterozigotos para qualquer *loci* HLA apresentam uma maior diversidade na apresentação de peptídeos antigênicos para as células T quando comparados a indivíduos homozigotos. A variabilidade no repertório de antígenos reconhecidos está diretamente relacionada a efetividade da resposta imunológica gerada contra o patógeno. No caso do HIV, o tempo de progressão para aids é inversamente proporcional ao número de *loci* homozigotos no paciente (CARRINGTON, *et al.*, 1999; TANG *et al.*, 1999; CARRINGTON e O'BRIEN, 2003). Desta forma, indivíduos que possuem moléculas raras de HLA são mais propensos a serem heterozigotos para aquele *locus* e conseqüentemente progredirem de forma mais lenta para aids quando comparados a indivíduos homozigotos (CARRINGTON, *et al.*, 1999; BASHIROVA *et al.*, 2011).

Um dos principais desafios na investigação do papel dos genes HLA na patogênese das infecções virais está justamente relacionado à alta variabilidade desse sistema, visto que a frequência dos seus alelos pode variar entre grupos étnicos distintos. Desta forma, o conhecimento e a caracterização dos polimorfismos dos genes HLA em populações específicas são de grande interesse. Na população brasileira os

alelos HLA-A*2, HLA-B*35, HLA-B*44, HLA-B*51, HLA-B*7 são os mais frequentemente encontrados na população em geral (BRAUN-PRADO *et al.*, 2000; DONADI *et al.*, 2000b; DALALIO *et al.*, 2002), contudo estudos específicos em pacientes HIV positivos ainda são escassos.

Apesar da habilidade do sistema imune em reconhecer diversos agentes externos, na corrida evolutiva entre hospedeiro e patógeno, a regulação negativa da expressão das moléculas de HLA-A e HLA-B na superfície celular, mediada pela proteína viral Nef, foi um dos mecanismos evolutivamente selecionados que evitam o reconhecimento do HIV pelo sistema imunológico (SCHWARTZ *et al.*, 1996). Em contrapartida, o sistema imune, através das células NK, é capaz de identificar essas alterações na expressão celular de HLA classe I, e através da liberação de grânulos líticos provocar a destruição da célula infectada (IANNELLO *et al.*, 2008).

As células *Natural Killer* (NK) pertencem à linhagem linfocítica e são uma das primeiras linhas de defesa contra células infectadas por vírus e células tumorais (CARRINGTON, *et al.*, 2008). Além da sua ação citotóxica, essa célula é capaz de secretar diferentes citocinas e quimiocinas que atuarão na sinalização da resposta imune celular (IANNELLO *et al.*, 2008). Essas atividades são diretamente reguladas pela ativação ou inibição dos seus receptores de superfície celular: os receptores com domínio lecitina (NKG2) e os receptores com domínio tipo imunoglobulina (do inglês, KIR - *Killer Ig-like Receptor*) (PARHAM, 2003; MORETTA e MORETTA, 2004). Os receptores KIR são glicoproteínas encontradas na superfície das células NK e de alguns linfócitos T e são codificados por uma família gênica formada por quinze genes e dois pseudogenes, localizada no cromossomo 19q13.4: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2DP1 e KIR3DP1. De forma semelhante às moléculas de HLA, os genes KIR são altamente polimórficos na população. Além disso, cada indivíduo pode possuir qualquer combinação de 9 a 16 dos genes descritos acima, gerando uma enorme diversidade haplotípica (PARHAM, 2003; MORETTA e MORETTA, 2004).

Esses receptores podem ser divididos em inibitórios ou ativadores e serão funcionalmente ativos conforme a sinalização enviada para a célula NK. A nomenclatura dos genes KIR é baseada na sua estrutura protéica como o número de domínios extracelulares (2D ou 3D) utilizados para interação com as moléculas de HLA e o tamanho da cauda citoplasmática. Os receptores que apresentam atividade inibitória

são constituídos por uma cauda citoplasmática longa, e por isso são representados com a letra L (do inglês, *long*). De forma oposta, os receptores que apresentam cauda citoplasmática curta, são denominados com a letra S (do inglês, *short*) e têm como função a ativação das células NK (WILLIAMS *et al.*, 2005).

A ação lítica da célula NK depende diretamente da presença de determinadas moléculas HLA na superfície da célula-alvo. A especificidade de ligação entre as glicoproteínas KIR e HLA já está claramente definida em alguns casos, como representado na Tabela 2 (PARHAM, 2003; IANNELLO *et al.*, 2008). Dentre os ligantes de KIR encontram-se o HLA-A, HLA-B, HLA-C e o HLA-G. Com relação ao HLA-A, somente os alelos HLA-A*3 e HLA-A*11 foram identificados como ligantes do KIR3DL2 até o momento (HANSASUTA *et al.*, 2004).

Os dois alotipos de HLA-Cw, conhecidos por C1 e C2 são ligantes de KIR2DL2/KIR2DL3 e KIR2DL1/KIR2DS1 respectivamente. Esses grupos são definidos pelo dimorfismo presente nas posições 77 e 80 na sequência de aminoácidos dos alelos HLA-C, sendo o primeiro grupo composto por uma asparagina na posição 80 e o segundo por uma lisina (WILLIAMS *et al.*, 2005).

Tabela 2. Especificidade de ligação entre receptores KIR e ligantes HLA classe I

KIR	HLA I	Observações
Inibitórios		
KIR2DL1	HLA-C2	Aminoácido Lisina posição 80 da cadeia pesada
KIR2DL2	HLA-C1	Aminoácido Asparagina posição 80 cadeia pesada
KIR2DL3	HLA-C1	Aminoácido Asparagina posição 80 cadeia pesada
KIR2DL4	HLA-G	<i>In vitro</i>
KIR2DL5A/B	-	sem associação
KIR3DL1	HLA-Bw4	
KIR3DL2	HLA-A3/HLA-A11	
KIR3DL3	-	sem associação
Ativadores		
KIR2DS1	HLA-C2	Aminoácido Lisina posição 80 da cadeia pesada
KIR2DS2	-	sem associação
KIR2DS3	-	sem associação
KIR2DS4	-	sem associação
KIR2DS5	-	sem associação
KIR3DS1	HLA-Bw4	

Já o motivo Bw4, presente em diferentes alelos do *HLA-B*, atua como ligante de KIR3DL1 e KIR3DS1. Esse grupo diferencia-se de seu motivo alternativo Bw6, com base na variabilidade de seus aminoácidos entre as posições 77-83 da hélice $\alpha 1$. Até o

momento não foi descrita nenhuma interação entre o motivo Bw6 e os receptores KIR (BARBOUR *et al.*, 2007; KAUR e MEHRA, 2009b).

Além dessas interações, os receptores KIR2DL4 reconhecem a presença do HLA-G na superfície da célula-alvo *in vitro*. Entretanto, o papel fisiológico por trás desta associação ainda não está esclarecido (LE MAOULT *et al.*, 2005).

O receptor inibitório KIR3DL1 é o mais polimórfico de todos e pode apresentar diferenças na sua expressão celular, o que acarreta alterações na sua funcionalidade. Juntamente com o *KIR3DL1*, o receptor ativador KIR3DS1, é um dos mais estudados até o momento. Por se tratarem de alelos do mesmo *locus* e compartilharem forte semelhança estrutural, ambos reconhecem as moléculas portadoras do motivo Bw4 como ligantes (BARBOUR *et al.*, 2007; MORVAN *et al.*, 2009; BOULET *et al.*, 2010; ELLER *et al.*, 2011). A proteção conferida pelo sinergismo desses dois receptores com o motivo Bw4 é a associação mais clara descrita para os genes KIR com relação à progressão da aids. Além disso, essa interação já foi associada à baixa carga viral e prevenção no aparecimento de infecções oportunistas (MARTIN, *et al.*, 2002; ELLER *et al.*, 2011).

6.1 A influência dos alelos HLA-B na progressão para a Aids

Dentre os diversos genes do sistema HLA estudados até o momento, o *HLA-B* parece exercer o efeito mais forte e consistente na modulação da progressão da infecção pelo HIV. Além do seu importante papel na seleção de respostas citotóxicas contra o vírus, a maior diversidade genética desse *locus* quando comparada com outros genes da mesma classe, como *HLA-A* e *HLA-C* (KAUR e MEHRA, 2009b), é um dos principais fatores para essa evidência. Até o momento, foram descritos mais de 2.300 alelos para esse gene, os quais podem codificar 1795 proteínas distintas (ROBINSON *et al.*, 2011).

Apesar da variabilidade do *HLA-B*, repetidos estudos em coortes independentes tem identificado claramente o envolvimento de, no mínimo, três alelos específicos na susceptibilidade e progressão para aids. A presença dos alelos HLA-B*27 e HLA-B*57 está diretamente associada à progressão lenta para aids, controle da viremia, altos níveis de T-CD4+ além de ausência de sintomas durante a infecção aguda, enquanto que o HLA-B*35 parece influenciar na progressão rápida da doença (CAO *et al.*, 1995; CARRINGTON *et al.*, 1999; MAGIEROWSKA *et al.*, 1999; MIGUELES *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2010).

O alelo HLA-B*57 supera todos os outros alelos em relação ao seu efeito sobre a infecção do HIV, sendo um dos mais estudado até o momento em diferentes populações (CAO *et al.*, 1995; MAGIEROWSKA *et al.*, 1999; MIGUELES *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2010). Vários fatores parecem contribuir para o mecanismo protetor deste alelo. Algumas evidências indicam que sua influência pode ser observada já nos momentos iniciais da infecção, pois a presença dessa molécula é responsável por exercer uma forte pressão seletiva no vírus, o que favorece a rápida seleção de mutações de escape. O alelo HLA-B*57, assim como suas variantes HLA-B*5701 na população caucasóide e HLA-B*5703 na população Africana, são responsáveis pela apresentação de epítomos derivados de regiões altamente conservadas da Gag (GILLESPIE *et al.*, 2002; BORGHANS *et al.*, 2007). A Gag pode ser apresentada pelas células infectadas logo nos momentos iniciais da infecção celular, mesmo antes da integração viral e síntese protéica. A ligação do alelo HLA-B*57 aos antígenos virais dessa proteína, favorece a seleção de mutações de escape, as quais implicam severas consequências ao *fitness* viral, resultando na eliminação dessas variantes pelas células T citotóxicas (GILLESPIE *et al.*, 2002; KAUR e MEHRA, 2009b). Além disso, a indução de uma resposta pelos linfócitos T-CD8+ na fase aguda da infecção, provocada pelo HLA-B*57, parece ser muito maior e efetiva quando comparada com outros alelos (ALTFELD *et al.*, 2006; BIHL *et al.*, 2006).

O HLA-B*27 também apresenta efeitos protetores sob o controle da replicação viral e progressão para aids, porém sua influência parece ser mais substancial nos estágios tardios da infecção (SCHNEIDEWIND *et al.*, 2007). De forma semelhante ao HLA-B*57, o mecanismo protetor envolve a indução de resposta T-CD8+ imunodominante contra peptídeos derivados da proteína p24 da Gag (BORGHANS *et al.*, 2007). Contudo, a restrição do alelo HLA-B*27 é principalmente direcionada a um epítomo, enquanto que o HLA-B*57 reconhece um repertório mais abrangente. Além disso, a pressão imposta pela presença do HLA-B*27 também resulta no surgimento de variantes virais com capacidades replicativa diminuída (SCHNEIDEWIND *et al.*, 2007). As mutações de escape geradas na presença do alelo HLA-B*27 são passíveis de serem transmitidas para indivíduos não portadores desse alelo, ao contrário do que é observado com as mutações de escape viral ao alelo HLA-B*57, as quais frequentemente reverterem ao estado ancestral em indivíduos HLA-B*57 negativos (BASHIROVA *et al.*, 2011; SCHNEIDEWIND *et al.*, 2009).

Os alelos HLA-B*27 e HLA-B*57 também são encontrados em uma frequência aumentada nos pacientes controladores de elite, os quais apresentam a capacidade de suprimir a viremia plasmática à níveis indetectáveis, corroborando as evidências que demonstram o importante papel das células T-CD8+ no controle da replicação viral e modulação da infecção (SAJADI, 2006; EMU *et al.*, 2008; PEREYRA *et al.*, 2008; O'CONNELL *et al.*, 2009). Adicionalmente ao efeito protetor no tempo de progressão para aids e no controle da viremia, os indivíduos portadores de HLA-B*57 ou HLA-B*27 parecem responder melhor aos testes com vacinas contra HIV quando comparado a outros alelos HLA (KASLOW *et al.*, 2001). Mais recentemente, a investigação clínica da presença dos alelos HLA-B*27 e HLA-B*57 vem sendo sugerida devido à associação destes com o desenvolvimento da doença espondilite anquilosante e a hipersensibilidade severa ao medicamento antirretroviral Abacavir, respectivamente (OLAJOS e SURÁNYI, 1996; CROVELLA *et al.*, 2011, GALVÁN *et al.*, 2011).

O HLA-B*35 já foi associado à progressão rápida para aids em diferentes estudos e ao contrário dos alelos protetores, raramente reconhece epítomos da Gag durante a infecção primária (BORGHANS *et al.*, 2007). Os alelos HLA-B*35 podem ser divididos em dois grandes grupos, baseados na sua especificidade de ligação aos peptídeos virais. O grupo HLA-B*35 Py é composto pelos alelos que se ligam a epítomos compostos por aminoácidos do tipo prolina e tirosina nas posições 2 e 9 respectivamente, enquanto que o grupo Px é composto por alelos mais reativos que se ligam a peptídeos que apresentam prolina na posição 2, mas, não necessariamente tirosina na posição 9. Essa variação implica não somente na preferência de ligação aos peptídeos, mas também na facilitação da interação entre as moléculas de HLA classe I e a maquinaria de ancoragem do peptídeo no retículo endoplasmático (SINGH *et al.*, 2008).

A progressão rápida para aids tem sido atribuída principalmente aos alelos que pertencem ao grupo Px (GAO *et al.*, 2001), contudo o efeito por trás dessa associação ainda não está completamente esclarecido. Jin *et al.*, 2002 demonstraram uma diferença fraca, porém significativa na indução de respostas T-CD8+ específicas contra peptídeos da Gag entre os dois grupos. Uma das hipóteses mais aceita na literatura sugere que os epítomos do HIV reconhecidos pelo HLA-B*35Px atuam como um “chamariz imunológico” monopolizando a resposta T-CD8+ citotóxica já nas fases iniciais da infecção, contudo essa resposta não consegue ser efetiva na destruição das células infectadas (SINGH *et al.*, 2008).

O efeito deletério do HLA-B*35 pode apresentar divergências de acordo com a população estudada. Diferentemente da população caucasóide, nenhuma influência significativa do HLA-B*35 na progressão da doença foi observada na população Afro-Americana (CARRINGTON, *et al.*, 1999). As diferenças observadas podem ser atribuídas à alta frequência do alelo HLA-B*3503, o qual pertence ao grupo Py, na população Africana, enquanto que o alelo frequentemente encontrado na população caucasóide, HLA-B*3501, pertence ao grupo Px (KAUR e MEHRA, 2009b).

Todas as moléculas de HLA-B podem ser separadas em dois grupos pela presença do epítipo molecular Bw4 ou Bw6, os quais diferenciam-se pela variabilidade de seus aminoácidos entre as posições 77-83 da hélice $\alpha 1$ conforme descrito previamente (BARBOUR *et al.*, 2007). Desta forma, indivíduos que apresentam alelos distintos de HLA-B podem ser homocigotos para o motivo Bw4 ou Bw6. Os alelos que possuem o motivo Bw4 correspondem a aproximadamente um terço de todos os alelos HLA-B (BARBOUR *et al.*, 2007; O'BRIEN e NELSON, 2004), sendo os alelos classicamente associados com a progressão lenta da aids (HLA-B*27 e HLA-B*57) pertencentes a este grupo. Por outro lado, os alelos HLA-B*35 e HLA-B*08, associados com progressão rápida da doença, apresentam o motivo Bw6 (<http://hla.alleles.org>).

Ainda podemos dividir o grupo Bw4 em alelos *Bw4Ile80* e *Bw4Tre80*, os quais diferem quanto ao aminoácido (Isoleucina ou Treonina respectivamente) presente na posição 80 da hélice $\alpha 1$ (BARBOUR *et al.*, 2007). Sabe-se que a interação deste motivo com os receptores KIR pode afetar diretamente a ativação das células NK, como descrito anteriormente (WILLIAMS *et al.*, 2005). O alelo *Bw4Ile80* parece ter uma maior afinidade ao KIR quanto comparado ao alelo *Bw4Tre80* (BARBOUR *et al.*, 2007). Apesar do importante papel do motivo na regulação da atividade NK, Flores-Villanueva *et al.*, 2001 descreveram um efeito independente da homocigosidade do HLA-Bw4 com a progressão lenta para a aids, o qual pode ser parcialmente explicado pelas diferenças na estimulação da resposta T-CD8+ entre os motivos Bw4 e Bw6 (ARNETT *et al.*, 1998).

Além das moléculas clássicas descritas acima, outros diversos alelos, como HLA-B*51, HLA-B*44 e HLA-B*08 já foram associados, em menor escala, à susceptibilidade e progressão para aids (BRETTLE *et al.*, 1996; KASLOW *et al.*, 1996; FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 2001; CARRINGTON e O'BRIEN, 2003). Entretanto, o alto grau da variabilidade genética entre as populações e as diferentes metodologias

utilizadas na identificação dos alelos HLA dificultam a reprodutibilidade e a comparação dos dados obtidos até o momento.

Embora a influência de cada gene na progressão à aids pareça ser fraca, seus efeitos cumulativos parecem bastante substanciais. O cálculo do risco atribuído é utilizado para expressar de uma forma mais clara a contribuição de cada gene na progressão da doença. No estudo realizado por O'Brien e Nelson, 2004, quando todos os genes envolvidos na progressão lenta (*CCR5Δ32*, *CCR2I64*, *CXCL12 3'A*, *HLA-B*27*, *HLA-B*57*, *KIR3DS1-HLA-Bw4*) foram considerados conjuntamente e de forma equivalente, o risco calculado para o grupo de progressores lentos foi de 21,1%. Isso significa que, 21,1% dos indivíduos que apresentam progressão lenta para aids, são portadores de, ao menos, um dos genes/alelos protetores. Para indivíduos que progrediam para aids em até cinco anos, o efeito estimado para os genes envolvidos na progressão rápida (*CCR5 P1*, *IL10*, Homozigosidade HLA, *HLA-B*35Px*, *CCL5*, *KIR3DS1*) foi de 40,9%. Observando esses resultados, podemos concluir que a presença das moléculas HLA classicamente descritas na literatura como marcadores de prognóstico explica somente uma pequena parcela dos diferentes tipos de progressão para aids.

6.2 A influência dos alelos HLA-A na progressão para a Aids

A contribuição potencial dos alelos HLA-A no curso clínico da infecção pelo HIV-1 têm sido pouco estudada e compreendida quando comparado ao papel das moléculas HLA-B. Este gene é o segundo mais polimórfico comparado a todos os genes do complexo HLA, apresentando atualmente, 1757 alelos descritos, os quais codificam 1290 proteínas diferentes (ROBINSON *et al.*, 2011).

Alguns alelos deste *locus* já foram relacionados com progressão para aids, resistência ou susceptibilidade ao HIV: A*1, A*2, A*3, A*11, A*24, A*31, A*32, A*28, A*29, A*48, A*66 (AL JABRI, 2002). Mais recentemente, Catano *et al.*, 2008 relataram a influência do HLA-A*10 na progressão da doença, enquanto que Matthews *et al.*, 2011 demonstraram associação do HLA-A*7401 com controle da viremia plasmática independentemente da presença do alelo HLA-B*57.

Os alelos HLA-A*3 e HLA-A*11 pertencem a mesma superfamília sendo extremamente homogêneos quanto a sua estrutura protéica, diferindo apenas em relação a sete resíduos de aminoácidos presentes nas hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Ambos são ligantes de

KIR3DL2, demonstrando que esses dois alelos em particular, parecem exercer um importante papel na progressão para aids (LICHTERFELD *et al.*, 2006). Contudo, mais importante que sua associação com os receptores das células NK, a presença do HLA-A*3 e HLA-A*11 já foi associada de forma independente à progressão lenta para aids (AL JABRI, 2002; KAUR e MEHRA, 2009b).

Acredita-se que o efeito protetor dos alelos HLA-A esteja parcialmente relacionado com a sua efetividade de ativação da resposta T-CD8+ total durante a infecção pelo HIV-1 (LICHTERFELD *et al.*, 2006; RACAPE *et al.*, 2006), apesar dessa contribuição ser menos efetiva quando comparado aos alelos HLA-B. Altfield *et al.*, 2006 observaram que a presença do alelo HLA-A*3 parece contribuir em 25% na indução da resposta citotóxica específica na ausência dos alelos HLA-B*27 e HLA-B*57, porém essa influência diminui substancialmente na presença dos alelos protetores.

6.3 A influência do HLA-G na progressão para a Aids

O *HLA-G* está localizado a 300kb da região telomérica do HLA-A e é responsável por codificar uma proteína de classe Ib do tipo não clássica. A molécula HLA-G diferencia-se das glicoproteínas clássicas de classe I por cinco características biológicas bem estabelecidas: (i) presença de isoformas solúveis e ligadas a membrana celular, as quais são geradas a partir do *splicing* alternativo do transcrito primário; (ii) estrutura molecular diferenciada, apresentando cauda citoplasmática curta; (iii) capacidade de modulação da resposta imune; (iv) limitada distribuição tecidual e (v) baixa variabilidade protéica, a qual pode ser inferida pelo baixo número de alelos identificados (ROUAS-FREISS *et al.*, 2000; DONADI *et al.*, 2011). Até Janeiro de 2012, 47 alelos e 15 proteínas distintas haviam sido descritas para este gene (ROBINSON *et al.*, 2011).

A maioria dos alelos descritos até o momento, em teoria, é capaz de codificar as sete isoformas distintas (geradas a partir de *splicing* alternativo), as quais estão representadas na Figura 4. Destas, quatro são vistas complexadas à membrana plasmática (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) da célula e três são encontradas na forma solúvel (HLA-G5, -G6 e -G7) (DONADI *et al.*, 2011). A presença de um resíduo de cisteína na posição 42 do domínio $\alpha 1$ da isoforma solúvel de HLA-G (G5) permite a formação de dímeros através da interação de duas cisteínas de posições 42 distintas via pontes

dissulfeto. Essa conformação permite a interação entre um dímero de HLA-G com duas moléculas de T-CD8+ (DONADI *et al.*, 2011).

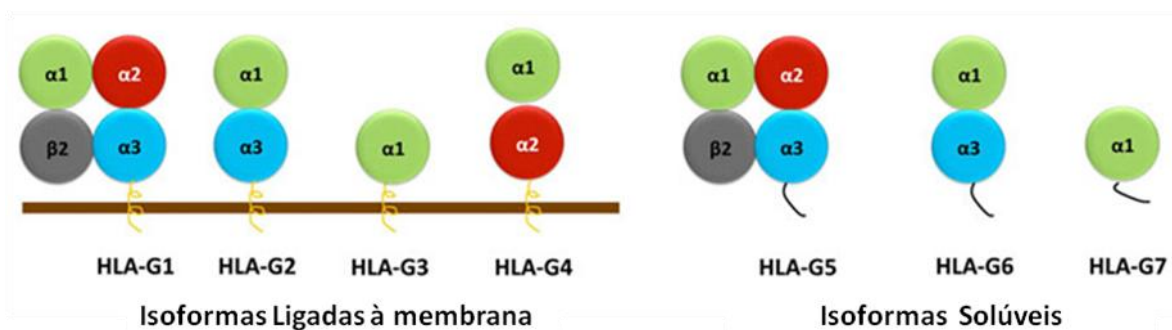


Figura 4. HLA-G - Isoformas solúveis e ligadas à membrana plasmática.
(Adaptado de Donadi *et al.*, 2011)

As primeiras evidências do papel do HLA-G na tolerância do sistema imunológico foram observadas durante período gestacional, pois acreditava-se que a expressão dessa molécula na interface materno-fetal prevenia a rejeição do feto pelo organismo materno (HUNT e ORR, 1992). Recentemente, pesquisadores identificaram uma subpopulação de linfócitos T-CD8+ imunotolerogênica que expressam o HLA-G, sugerindo uma forte influência dessa molécula no processo de supressão do sistema imunológico em geral, incluindo outras situações além da tolerância materno-fetal (ROUAS-FREISS *et al.*, 2000; FEGER *et al.*, 2007). Além disso, em diferentes condições, normais e patológicas, o HLA-G participa da inibição das células natural killer (NK) além da regulação dos linfócitos T-CD4+ e T-CD8+ (LE MAOULT *et al.*, 2005; LE ROND *et al.*, 2006).

Pelo seu poder imunossupressor, a expressão do HLA-G é importante em condições como infecções virais crônicas, câncer, transplantes e autoimunidade (DONADI *et al.*, 2011). Sabe-se que diversos fatores, como polimorfismos genéticos, podem afetar os níveis de HLA-G no organismo do hospedeiro, desta forma modulando a resposta imune às mais diversas situações.

Além das variações na região codificante, a variabilidade nucleotídica na região promotora e na região 3' não-traduzida parece influenciar a expressão do HLA-G através de modificações na afinidade de sequências-alvo do gene aos fatores transcricionais e pós-transcricionais (VEIT e CHIES, 2009). Dois polimorfismos, 14pb inserção/deleção e o +3142 C/G, os quais estão localizados na região 3'UTR do gene têm sido amplamente estudados em diferentes condições como aborto espontâneo

(VARGAS *et al.*, 2011), pré-eclampsia (VIANNA *et al.*, 2007), Lúpus Eritematoso Sistêmico (CONSIGLIO *et al.*, 2011), Hepatite C (CORDERO *et al.*, 2009) e infecção por HTLV-1 (HADDAD *et al.*, 2011).

O polimorfismo inserção/deleção de 14pb (rs1704) está relacionado com alterações na estabilidade do RNAm do gene *HLA-G*. Os transcritos primários que apresentam sua sequência nucleotídica completa, ou seja, com os 14 pares de base, geram um novo sítio de *splicing*, o qual promove a remoção de uma região que compreende 92 bases, gerando um RNAm mais estável do que os transcritos que possuem a sequência completa. Desta forma, seria esperado que indivíduos homozigotos para o alelo inserção (+14pb/+14pb) apresentassem níveis mais altos de *HLA-G*, tanto das isoformas solúveis quanto das formas ligadas à membrana plasmática, porém, em trofoblastos, demonstrou-se que o RNAm gerado nessa situação, não representava a maioria dos transcritos observados. Visto que o alelo inserção 14pb parece exercer mínimo efeito sobre os níveis de *HLA-G*, acredita-se que outros polimorfismos localizados na mesma região possam ser o fator chave na regulação da expressão dessa molécula (VEIT e CHIES, 2009).

A região 3'UTR é frequentemente composta por sequências nucleotídicas específicas as quais são alvo da regulação pós-transcricional mediada por microRNAs. Nesta região do gene *HLA-G* encontra-se um sítio de ligação a três microRNAs, miR148a, miR148b e miR152, o qual está localizado a 200pb do polimorfismo 14pb inserção/deleção. No interior dessa região, que compreende aproximadamente 20 nucleotídeos, foi descrito o polimorfismo +3142 C/G (rs1063320), onde o alelo G está relacionado a baixos níveis de *HLA-G*, pois favorece a ligação dos microRNAs e desta forma, aumenta a degradação dos transcritos previamente formados (VEIT e CHIES, 2009).

A susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 já foi previamente associada a altos níveis de *HLA-G* (MATTE *et al.*, 2004; LAJOIE *et al.*, 2006; LAJOIE *et al.* 2010; THIBODEAU *et al.*, 2011). Além disso, trabalho recente realizado por Lozano *et al.*, 2009 demonstrou uma frequência elevada de células T-CD8+ que expressam *HLA-G* em pacientes HIV positivos quando comparados a indivíduos saudáveis. Diferentes polimorfismos do *HLA-G* já foram investigados quanto à sua influência na transmissão vertical (FABRIS *et al.*, 2009) e heterossexual do HIV (MATTE *et al.*, 2004; LAJOIE *et al.*, 2006). Mesmo após a extensa revisão bibliográfica realizada para o presente

trabalho, não foi encontrado qualquer estudo relacionando os polimorfismos descritos acima com diferenças na progressão para aids.

O único trabalho que relaciona o HLA-G com a progressão para aids foi realizado por Lajoie *et al.*, 2009. Neste estudo, o autor observou que os níveis da HLA-G solúvel encontravam-se elevados durante a fase inicial da infecção e que estes permaneceram elevados nos progressores rápidos, enquanto que nos progressores lentos e normais foram restabelecidos ao nível basal. Este estudo confirma o papel do HLA-G na supressão do sistema imunológico e associa altos níveis da molécula com a progressão rápida para aids.

7. A influência dos alelos HLA classe II na progressão para a Aids

As associações do HLA classe II com o curso da infecção pelo HIV são extremamente menos significativas quando comparadas com as de classe I, sugerindo que a resposta celular parece ser mais eficiente que a resposta humoral (HENDEL *et al.*, 1999; CARRINGTON e O'BRIEN, 2003; KAUR e MEHRA 2009b). O mecanismo exato da susceptibilidade ou proteção dos alelos HLA classe II ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que esses influenciem na apresentação de antígenos para células T-CD4+, as quais são extremamente importantes na manutenção de uma resposta citotóxica efetiva (SINGH *et al.*, 2008).

A maioria dos alelos que apresenta alguma relação com a susceptibilidade e progressão pertence aos *locus* DR e DQ, porém ainda não foram encontradas associações consistentes (AL JABRI, 2002). Os alelos DRB1*13, DRB1*07, DRB1*10, DRB1*11 já foram relacionados com progressão lenta, maior tempo sem manifestações de aids ou ausência de sintomatologia, enquanto que alelos HLA-DR2, DRB1*03, DRB1*13 foram relacionados com susceptibilidade, progressão rápida ou risco de desenvolver infecção sintomática (AL JABRI, 2002; CARRINGTON e O'BRIEN, 2003; SINGH *et al.*, 2008). Em estudo realizado na população da Índia, observou-se uma frequência significativamente aumentada dos alelos HLA DRB1*0902, DQB1*030103 e DQB1*050201, enquanto que foi relatada uma diminuição significativa na frequência dos alelos HLA DQB1*030101, DQB1*050301 e DQB1*060101 em indivíduos HIV positivos quando comparados a controles não infectados (SHANKARKUMAR *et al.*, 2010).

8. Novos polimorfismos identificados em GWAS e sua influência na susceptibilidade e progressão da infecção pelo HIV-1

De uma forma geral, os estudos conduzidos até o momento avaliam de maneira isolada a influência de genes candidatos, como CCR5, HLA e KIR, na progressão para aids. O primeiro estudo GWAS (do inglês, *Genome Wide Association Study*) realizado para identificar novos marcadores de progressão investigou mais de 500.000 polimorfismos de base única (SNPs) em 486 pacientes participantes da coorte EURO-CHAVI (*Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology*) (FELLAY *et al.*, 2007). Quase metade dos 50 SNPs identificados como relevantes pertencem à região do complexo HLA, demonstrando a importância do cromossomo 6 frente a infecção pelo HIV. Contudo, duas variantes parecem exercer uma ação independente sobre o controle da carga viral (FELLAY *et al.*, 2007).

O gene *HCP5* (*HLA complex P5*) está localizado a 100kb da região centromérica do HLA-B no cromossomo 6. Por este gene ser um elemento de retrovírus endógeno humano, o qual possui sequência homóloga a *Pol* do HIV-1, pode agir como RNA anti-senso interferindo na replicação de diversos retrovírus. O polimorfismo rs2395029 representa a troca de apenas um nucleotídeo (T>G), o qual implica na substituição de um aminoácido (Val112Gly) no polipeptídeo. Apesar da baixa frequência da mutação em diferentes populações, a presença de somente uma cópia desse alelo resulta em uma redução significativa da carga viral (FELLAY *et al.*, 2007).

O outro polimorfismo descrito neste mesmo estudo, o rs9264942 (-35 C/T) está localizado na região promotora do gene *HLA-C*. No estudo de Fellay *et al.*, (2007), a presença da mutação (HLA-C5'-C) foi identificada como a segunda associação com maior influência no controle da carga viral. Este efeito foi inicialmente atribuído às possíveis diferenças na expressão do gene, a qual seria modulada pela presença do polimorfismo na região promotora (THOMAS *et al.*, 2009). Contudo, recentemente, Kulkarni *et al.*, (2011) demonstraram que a região 3'UTR do gene *HLA-C*, a qual funciona como um sítio de regulação pós-transcricional mediada por microRNAs, parece exercer um papel superior no controle da expressão do *HLA-C* quando comparado ao polimorfismo da região promotora.

Os efeitos protetores dos alelos HCP5-G e HLA-C5'-C foram confirmados em estudos posteriores, contudo devido ao alto grau de desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-B*57 algumas dúvidas ainda permanecem quanto ao seu papel independente na

progressão para aids (CATANO *et al.*, 2008; LIMOU *et al.*, 2009; VAN MANEN *et al.*, 2009). Além disso, um estudo *in vitro* não identificou alterações na replicação viral entre os dois alelos do gene HCP5 (YOON *et al.*, 2010). Em um grupo de 19 controladores de elite, nove pacientes eram positivos para HLA-B*5703 e somente um para HLA-B*5702, contudo nenhum desses pacientes apresentou a mutação para o gene *HCP5* sugerindo que o desequilíbrio ocorra somente com o alelo HLA-B*5701 e não com o alelo HLA-B*5703 (HAN *et al.*, 2008). Por esse motivo, a identificação do polimorfismo do gene *HCP5* tem sido sugerida como uma ferramenta de triagem para hipersensibilidade ao antirretroviral Abacavir, nos locais onde a tipagem para HLA não está disponível. (COLOMBO *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ-NÓVOA *et al.*, 2010; GALVÁN *et al.*, 2011).

Capítulo 2: Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a influência de genes do sistema imunológico na progressão clínica para aids em indivíduos HIV positivos de Porto Alegre, RS, Brasil.

Objetivos específicos:

- Identificar pacientes HIV positivos pertencentes às diferentes categorias de progressão para a aids (progressores rápidos, progressores crônicos e progressores lentos), a partir da análise retrospectiva dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Infectologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição – Porto Alegre, RS, Brasil.
- Descrever a frequência dos alelos HLA *locus* B em um grupo de pacientes HIV positivos com progressão definida para a aids;
- Detectar os portadores dos alelos HLA-A*3 e HLA-A*11 em um grupo de pacientes HIV positivos com progressão definida para a aids;
- Descrever a frequência dos polimorfismos 14pb inserção/deleção (rs1704) e +3142C/G (rs1063320) do gene *HLA-G* em um grupo de pacientes HIV positivos com progressão definida para a aids;
- Avaliar a distribuição dos genótipos, alelos e haplótipos considerando todos os genes estudados nas diferentes categorias de progressão para aids e verificar sua influência no tempo de progressão a aids;
- Investigar a influência dos genótipos, alelos e haplótipos considerando todos os genes estudados na contagem de células T-CD4+ durante a progressão para aids.

Capítulo 3: Manuscrito

Manuscrito em preparação para submissão ao periódico *AIDS Research and Human Retroviruses*

Effect of HLA class I on AIDS progression of HIV-infected patients from the southernmost state of Brazil

Maria Cristina Cotta Matte^{1,2}, Rubia Marília de Medeiros^{1,2}, Breno Riegel Santos³, Mariana Jobim⁴, Luiz Fernando Job Jobim⁴, Sabrina Esteves de Matos Almeida², José Artur Bogo Chies¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

² Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, Brazil

³ Serviço de Infectologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, Brazil

⁴ Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Key words: HIV, HLA class I, AIDS progression

Running title: Effect of HLA class I genes on AIDS progression.

Corresponding author:

Dr. José Artur Bogo Chies. Email address: jabchies@terra.com.br.

Laboratory of Immunogenetics. Institute of Biosciences, Department of Genetics, UFRGS.

Av. Bento Gonçalves – 9500, Campus do Vale. 91501970

Porto Alegre, RS – BRAZIL. PO BOX 15053.

Phone: +55 51 3308 6740; Fax: +55 51 3308 7311

Abstract

Variations in immune response genes have been investigated to explain the heterogeneity observed in the clinical course of HIV-1 infection. The role of HLA class I molecules, such as HLA-A and HLA-B, and non-classical HLA I genes, as *HLA-G* seems to be one of the most important factors that modulate disease progression. From 3,300 medical records of HIV+ patients, 107 were classified according to AIDS progression. *HLA-B* alleles and HLA-A*3 and HLA-A*11 alleles were determined, as well as *HLA-G* polymorphisms 14bp insertion/deletion and +3142 G/C. To evaluate the influence of genotypes in the progression to AIDS, statistical tests as Survival Analysis, Cox regression were performed. Our results support the role of HLA homozygous genotypes on rapid progression to AIDS as well as the protective effect of the HLA-A*3 allele in the progression of the infection. Furthermore, this is the first study that assessed the influence of the *HLA-G* polymorphisms 14bp insertion/deletion and +3142 G/C on AIDS progression and the results obtained indicate an important role of this molecule on AIDS progression. The absence of classical genetic markers related to rapid and long-term nonprogression to AIDS in this group of HIV-infected patients emphasizes the importance of study genetic diversity among different populations.

Introduction

The AIDS epidemic is characterized by an extreme heterogeneity in the clinical course of HIV-1 infection. The vast majority of the HIV-infected individuals develop a chronic infection with AIDS progression within 10 years. However, approximately 5-15% of patients, known as LTNP (long-term nonprogressors) remain asymptomatic and maintains stable CD4+ T cell counts for more than 10 years. Moreover, less than 1% of these individuals, named elite controllers, are considered a model of HIV-1 control, due to its ability to maintain viral load under detected levels (<50 copies/mL) in the absence of antiretroviral treatment. In the opposite way, a small percentage of HIV patients progress to AIDS or start antiretroviral therapy until three years after seroconversion. These patients are known as rapid progressors.¹⁻³

This variability probably results from the combination of genetic variants-among HIV-1 strains and genetic differences of the host. The viral factors currently known to be related to AIDS progression include CXCR4 tropism, persistence of p24 and viral set point,⁴⁻⁷ whereas factors directly or indirectly involved in immune system response are related to the host.⁸ The first human genetic marker identified in HIV susceptibility was the CCR5Δ32 variant, which conferred a slow progression to AIDS in heterozygous patients and resistance to infection in homozygote individuals.⁹ However, the number of securely host factors involved in HIV disease identified so far remains small and explain only about 15-20% of the observed variability.⁸

Immunological characterization of the LTNP individuals have demonstrated the important function of the CD8+ T cytotoxic response to HIV-1 antigens, in very early stages of HIV- infection.¹⁰ The Human Leukocyte Antigen (HLA) class I molecules are responsible to present endogenous antigens (meaning antigen produced inside the cell) to CD8+ T cells and therefore, can potentially exhibit an impact on AIDS progression by offering a strong selective pressure in HIV strains to escape CD8+ T cell response.¹¹ Additionally, immunogenetic studies have focused the attention on the potential role of non-classical HLA I genes, as *HLA-G*, since this molecule is involved in the suppression of immune responses directed against viral infections.¹²

Considering HLA genes and molecules, HLA-B comprises the most studied antigens, probably due to its large variability compared to other class I molecules as HLA-A and HLA-C.¹³ In particular, both the HLA-B*57 and HLA-B*27 alleles have been consistently shown to be associated with slow disease progression and virologic

control. On the other hand, the rapid progression to AIDS is closely associated with the presence of HLA-B*35, HLA-B*53 alleles and HLA homozygous genotypes.¹⁴⁻¹⁷ The HLA-B molecules can be categorized by the presence of the Bw4 or Bw6 molecular epitope in the $\alpha 1$ helix, which are defined due to differences in the amino acid sequences at residues 79-83.¹⁸ Some of the several alleles associated with slow disease progression such as HLA-B*27 and HLA-B*57, present the Bw4 motif, whereas the alleles associated with rapid progression to AIDS have the Bw6 motif.¹⁸

The effect of the HLA-A on progression to AIDS is fairly less documented compared to HLA-B. However two alleles were described as having a potential role in HIV infection modulation since these molecules are directly involved in innate and adaptive immune response modulation. The HLA-A*3 and HLA-A*11 alleles are known to be KIR2DS4 ligands and therefore could influence NK activity. Additionally, these alleles are able to present a large panel of viral epitopes and to induce very dominant CD8+ T cell responses.^{19,20}

Differently of the classical HLA genes, *HLA-G* is characterized by low polymorphism, limited distribution and differential expression of soluble and membrane-bound isoforms. HLA-G has a crucial role in innate and adaptive immune regulation, by inhibiting CD8+ T cell activity and mediating apoptosis of NK cells. Moreover, this molecule can modulate CD4+ T cell proliferation and also induce tolerogenic dendritic and regulatory T cells.²¹⁻²³

The immunosuppressor effect observed for this molecule can be modulated by the presence of genetic variants in the 3' UTR of the gene. A 14bp insertion/deletion polymorphism (rs1704) was associated with different levels of HLA-G in plasma by promoting an alternative splicing of the mRNA. Another polymorphism located less than 200bp from the 14bp insertion/deletion, the +3142 C/G (rs1063320), was suggested to be related to post-transcriptional regulation mediated by micro-RNAs. Transcripts harboring the 14bp sequence insertion have been associated with lower levels of HLA-G, whereas the presence of G allele favors the targeting of microRNAs and therefore suppress the HLA-G expression.²⁴

The identification of genetic markers as well as the comprehension of the mechanism underlying HIV-1 pathogenesis could contribute to the identification of novel drug targets and vaccine development. However, it is noteworthy that the large genetic variability among different populations is still a complicating factor. Thus, the evaluation of the genetic background in different populations can be important to the

recognition of the immunological diversity as well as to the identification of novel genetic factors associated to HIV infection and AIDS progression. The aim of this study was to investigate the influence of HLA class I classical (HLA-B; HLA-A) and non classical genes (HLA-G) on time to AIDS progression in HIV-infected patients from Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil.

Materials and Methods

Study design: About 3,300 medical charts were reviewed in Infectology Service – Conceição Hospital Group, Porto Alegre, RS, Brazil between January and July of 2011. The main objective was to identify HIV-infected patients with distinct clinical characteristics of AIDS progression. The inclusion criteria was defined as HIV-positive diagnosis, age >18 years old and the date of HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) notification. CD4+ T measures were collected when available.

The study endpoint (AIDS) was defined as HAART initiation or CD4+ T cell count below 350 cells/mm³. Accordingly to Brazilian Ministry of Healthy guidelines the antiretroviral treatment is recommended for HIV-1 asymptomatic patients with CD4+ T counts between 350 and 200 cells/mm³ or persistent high viral load, independently of CD4+ T levels. HCV or HBV coinfecting patients who started HAART with CD4+ T above 350cells/mm³ were also included in the present study.²⁵

The period of progression to AIDS was defined as the difference between the year of HAART notification or CD4+ T cell count below 350 cells/mm³ and HIV-1 infection diagnosis. Based on this characteristic the patients were classified into three categories: rapid progressors (RP), chronic progressors (CP) and long-term nonprogressors (LTNP). The rapid progressors patients were defined as having, at least, one HIV-negative/undetermined test before the first HIV-positive serological test, as long as the interval of both measures does not exceed 3 years. Additionally, these patients should have started antiretroviral treatment until 3 years after seroconversion (estimated as the mean point of the negative and positive serological tests). Chronic progressors were identified as the patients who started HAART between four to nine years after the HIV-1 diagnosis. HIV treatment-*naïve* patients after 10 years of diagnosis or those who started HAART after this period were classified as long-term nonprogressors. Considering the stringent criteria used for selection, from the initial 3,300 medical charts reviewed, 98 subjects were included in this study.

The present study was approved by the ethical committees of State Foundation of Production and Health Research (FEPPS-RS), Conceição Hospital Group and Clinical Hospital of Porto Alegre. After signing an informed consent form, the patients were interviewed about behavior and socio-demographics characteristics using a standard questionnaire and a blood sample was collected.

Molecular analysis: Genomic DNA was extracted from buffy-coat by a salting-out procedure.²⁶ *HLA-B* genotyping was performed by PCR-SSO technique using the commercial kit SSO LABType® - RSSO1B (ONE LAMBDA, Inc., Canoga Park, USA) according to manufacturer's protocol. After amplification, the PCR product was denatured and annealed to sequence-specific oligonucleotide probes. The fluorescent intensity of binding probes was identified in LABScanTM100 and the results interpreted with HLA Fusion 2.0 software (ONE LAMBDA, Inc., Canoga Park, USA). The *HLA-B* alleles were pooled as *HLA-Bw4* or *HLA-Bw6* according to the presence of each motif as described in <http://hla.alleles.org>.

Identification of HLA-A*3 and HLA-A*11 alleles was performed using PCR-SSP (Sequence Specific Primer PCR) technique as previously described by Bunce *et al.*²⁷ The presence or absence of each allele was observed in 1.5% agarose gel with ethidium bromide after electrophoresis.

The *HLA-G* polymorphisms were identified using primers and PCR conditions according to Cordero *et al.*²⁸ The 14bp insertion/deletion (rs1704) PCR product was submitted to electrophoresis and the fragments of 224bp and 210bp were directly visualized in 8% polyacrylamide gel with ethidium bromide. Considering the +3142 C/G polymorphism (rs1063320), the PCR amplification with specific primers was followed by *BaeGI* digestion that reveals a fragment of 406bp for allele C and 316bp plus 90bp for G allele. The genotypes were identified after electrophoresis in 1.5% agarose gel with ethidium bromide.

Statistical analysis: The observed gene and alleles frequencies were determined by direct counting. The Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated in Arlequin v.3.0²⁹ and haplotypes frequencies for *HLA-G* gene were estimated using Mlocus program.³⁰ Analysis of the genotypes and alleles frequencies among the AIDS progression categories was performed using the chi-square (χ^2) and Fisher's exact test when appropriate. Chi-square test with adjusted residuals was used to identify differences in categorical variables within the categories studied, while ANOVA was used to assess the differences in continuous variables.

The influence of genotypes, alleles and haplotypes on time to progression to AIDS (in years) was first assessed by using Kaplan-Meier curves and log-rank test and then evaluated using multivariate Cox Regression. All the variables that obtained p value <0.1 in univariate analysis were considered in multivariate model. Moreover, factors extensively described in the literature as genetic markers of HIV progression (CCR5 Δ 32, HLA-B*27, HLA-B*57, HLA-B*35, HLA-B*53) were also included in the model. The presence of CCR5 Δ 32 protective allele was only used as a correction factor.

For each subject, the CD4+ T slope value was calculated by linear regression on the square root of CD4+ T cell counts. All patients should have at least two measures, as long as it does not exceed 2 years of interval. This value indirectly reflects the rate of CD4+ T cell decline in the period before HAART - since diagnosis to the study endpoint (AIDS). All slope values were expressed as median (IQR). Non-parametric tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney were used to verify the influence of genotypes/haplotypes and alleles respectively on the TCD4+ slope value among RP, CP and LTNP. All statistical analysis was performed using SPSS v.17.0 (Chicago, IL, USA). A value of p <0.05 was considered significant.

Results

1. Characteristics of studied population

Ninety-eight patients with well defined criteria of clinical progression to AIDS were selected, of which 48 subjects were classified as chronic progressors (CP), 29 as long-term nonprogressors (LTNP) and 21 as rapid progressors (RP). The social, demographic and behavior characteristics of these HIV-1-infected patients are illustrated in Table 1. No significant difference for gender (p=0.514), age (p=0.690), HIV transmission (p=0.188), HCV or HBV coinfection (p=0.399; p=0.281) were observed among the three categories.

Ethnicity was the only variable that demonstrated a statistical difference within the progression groups (p=0.02). Analyses of adjusted residuals showed that the CP group presented a higher frequency of European-descendent subjects (p=0.014) whereas African-descendent individuals were frequently found in LTNP group (p=0.010).

The polymorphisms analyses were not stratified by ethnicity since no statistical differences in genotypic, allelic or haplotypic frequencies were observed between the

ethnic groups. Moreover ethnicity was determined based on patient self-declaration and it was always included as a covariate factor in regression analyses. The frequency of the twenty-five different alleles identified for HLA-B locus is represented in Table 2. HLA-B*44 (0.12) and HLA-B*15 (0.12) were the most frequent alleles found followed by HLA-B*35 (0.11) and HLA-B*07 (0.09). Only the HLA-B alleles that display a frequency higher than 0.05 and/or those described as genetic markers of AIDS progression in the literature were considered for statistical analyses. It was not possible to estimate the allele frequency for HLA-A*3 and HLA-A*11 since SSP-PCR technique just identify the presence or absence of each allele. So, homozygous and heterozygous genotypes could not be differentiated.

The observed frequencies for the *HLA-G* +3142 G/C and the 14bp insertion/deletion polymorphisms in addition to its haplotypes are also described in Table 2. Both polymorphisms had its frequencies compared to Hardy-Weinberg expectations and no significant difference was observed (data not shown).

2. Influence of genetic profile on AIDS progression

In order to evaluate the influence of genetic profile on AIDS progression we considered three analyses including: a comparison of genotype, alleles and haplotype frequencies within categories; CD4+ T cell decline, and also survival and Cox Regression analyses. Cox Regression univariate analyses revealed an influence of gender and ethnicity on time to AIDS progression ($p=0.029$ and $p=0.038$ respectively), so this variables were also included in the multivariate model.

Considering the three categories studied, a lower CD4+ T slope value (-0.473; -0.88 to -0.16) were seen in LTNP compared to RP (-0.988; -2.4 to -0.39) and CP (-1.026; -2.32 to -0.405) ($p=0.017$), as expected. However, none of the genotypes, alleles or haplotypes studied demonstrated an independent role on CD4+ T cell decline (Table 3).

The distribution of HLA-B alleles frequencies among RP, CP and LTNP are represented in Table 2. Considering all alleles, we found five patients carrying a homozygous genotype for this locus. Three of them belong to the rapid progressors group whereas no homozygous genotype was found among LTNP patients. Moreover, homozygous patients showed a significantly lower time survival (median of 3 years) compared to heterozygous individuals (median of 8 years) ($p=0.003$) as represented in

Figure 1a. The effect of homozygous genotype in accelerate AIDS progression was also confirmed in multivariate analysis ($p=0.012$) (Table 4). Even when detecting only three patients a significant p-value ($p=0.023$) was obtained for the homozygous genotype when it was evaluated among different categories (Table 2).

HLA-B*35 was one of the most frequent (0.11) HLA-B allele found in this study independently of the progression group (Table 2). However, the presence of this allele does not seem to have an effect on time to AIDS progression, since the number of RP patients that harbor this allele was very similar to LTNP. Also, no difference on time to AIDS progression was observed between HLA-B*35 carriers and non-carriers.

In the opposite way HLA-B*53 allele presented a low frequency in the studied population (0.03). No significant association was observed between the presence of this allele and the studied categories. However, individuals carrying HLA-B*53 allele had a median time of progression to AIDS of 2 years whereas non-carriers presented 7 years of progression. Although survival analyses suggest some influence of this allele in rapid progression to AIDS ($p=0.082$) this result is not maintained in multivariate analyses ($p=0.502$) (Figure 1b and Table 4). Three other alleles (-B*44, -B*51 and -B*08) were also analyzed and no correlation among categories or time to progression to AIDS was observed. A higher frequency of the HLA-B*42 allele was observed in LTNP group compared to CP and RP ($p=0.047$) but the influence of this allele in long-term nonprogression was not sustained in survival and multivariate analyses.

LTNP patients showed a higher frequency of Bw4 motif (0.43) when compared to RP (0.34) but no significant association was observed considering the Bw4 genotype or allele and these groups (Table 2). Additionally, no significant effect of Bw4 motif on time to progression to AIDS could be evidenced. Taking into account factors that could interfere on the analysis, the Bw4 alleles and genotypes were re-evaluated excluding HLA-B*53 positive patients due to its association to rapid progression and no statistical influence were found.

Three of the five individuals who carry the HLA-B*27 allele were classified as LTNP. Surprisingly we did not find any long-term nonprogressor patient harboring the HLA-B*57 allele. No association was observed when evaluated the influence of alleles HLA-B*27 and HLA-B*57 on the time of AIDS progression nor within the RP, CP, and LTNP groups (Table 2), even when they were analyzed together (-B*27/-B*57 carriers) (data not shown).

Considering HLA-A locus, the HLA-A*3 allele was significantly overrepresented in LTNP (09 carriers) when compared to RP (02 carriers) ($p=0.037$). Furthermore, a significant effect on time to AIDS progression was also observed in survival ($p=0.034$) and in multivariate analyses ($p=0.031$) (Figure 1c and Table 3). HLA-A*3 carriers showed a median time of progression of 11 years whereas non HLA-A*3 carriers showed a median time of 6 years. The presence of HLA-A*11 could not be associated to any category of AIDS progression, since only 4 patients harbor this allele.

No significant influence was observed for HLA-G polymorphisms 14bp insertion/deletion and +3142 G/C and the derived haplotypes among RP, CP and LTNP groups (Table 2), even when only RP and LTNP were compared (data not shown). Nevertheless, a lower median time of AIDS progression was described for CC genotype and del/del genotypes when compared to their respectively wild-types genotypes. Additionally, a lower median time of progression to AIDS was observed when patients that carried C allele were compared to GG genotype ($p=0.110$) (Figure 1d to g) as well as del carriers when compared to ins/ins genotype ($p=0.305$).

Finally, a homogenous subset of LTNP composed by 17 treatment-*naïve* patients at the moment of recruitment, with clinical progression ranging from 10 to 15 years and last CD4+ T median 551,5 (404.75 – 669.5) were analyzed. In a similar way, the frequency of HLA-A*3 allele was also increased (5 carriers/12 non-carriers), and none of the protective alleles HLA-B*27 and HLA-B*57 were overrepresented. HLA-B*44 and HLA-B*35 were the most frequent alleles (0.17 and 0.11 respectively) followed by HLA-B*51, HLA-B*39, HLA-B*15 e HLA-B*07. Neither the polymorphisms and haplotypes of *HLA-G* gene nor the Bw4 motif seems to be correlated with this group.

Discussion

The HIV infection has been extensively studied over the past decades however the mechanisms underlying the pathogenesis of the virus are not completely understood. A large number of viral and host genes have been identified as important elements in HIV-infection modulation even though these genes and variants explain only a small portion of the heterogeneity observed in disease progression of infected patients.^{8,31} The immune system has been received an especial attention since genetic variations on HLA

class I were identified as the most important factors involved in AIDS progression and viral control.¹³

In the present study, 98 subjects were selected and classified into rapid progressors, chronic progressors and long-term nonprogressors according to their time to AIDS progression. A significant difference on ethnic origin among the studied categories was observed. In chronic progressors we observed a higher frequency of European-derived individuals while LTNP presented a higher frequency of African-derived patients. A long-term AIDS survival in African-derived patients was also observed by Okulicz *et al.*² However, neither of the polymorphisms investigated in the present study nor the alleles or haplotypes were identified as the cause of this distribution, since none of them significantly varied between these two populations.

Homozygosis of HLA-B showed the clearest effect on lower time to AIDS-survival and rapid progression, but no influence was observed regarding CD4+ T cell decline. The homozygous genotype is a rare characteristic observed in human population due to the high variability within the HLA genes and the evolutionary forces that favor the persistence of heterozygote individuals in the population. The heterozygote advantage suggest that individuals harboring heterozygous genotypes at HLA loci are able to present a broader range of antigenic peptides to cytotoxic-T lymphocytes than are homozygotes, resulting in a more effective immune responses.^{16,32}

In addition to homozygosity, other two HLA alleles are consistently associated to rapid AIDS progression in the literature: HLA-B*35 and HLA-B*53.^{16,33} The low frequency found for HLA-B*53 as well as the high frequency observed for HLA-B*35 allele among our patients are in accordance to another study in HIV-infected Brazilian subjects.³⁴ The presence of HLA-B*53 allele showed a tendency to present a shorter time to AIDS progression compared to non-B53 patients. On the other hand, the HLA-B*35 could not be correlated to a rapid progression to AIDS or CD4+ T cell decline. In fact, a higher frequency of this allele was observed among 17 LTNP treatment-*naïve* patients. Its important to note that the influence of HLA-B*35 in rapid disease progression is attributed just to a subset of its alleles called HLA-B*35Px.¹⁵ Our analyses did not allow the recognition of Px and Py groups, however this evaluation could be useful to elucidate the increased frequency of HLA-B*35 in LTNP, since this groups can potentially diverge in specific T-CD8+ response against Gag epitopes.³⁵

As well as rapid progression to AIDS, the influence of several genetic factors is well established in long-term survival.³⁶ An independent role of Bw4 homozygosity in control of viremia and protection to AIDS was described by Flores-Villanueva *et al.*³⁷ More recently, in a study performed by Silva *et al.*³⁸ the influence attributed to Bw4 on viral control was entirely dependent to the presence of HLA-B*57. Despite the higher frequency of Bw4 motif in LTNP patients when compared to RP, no consistence association was observed within the Bw4/Bw4 genotype or the allele in relation to AIDS survival, CD4+ T slope and the categories of progression. In addition, Bw4 motif and Bw4/Bw4 genotype presented a lower frequency in the 17 subset of *naïve*-LTNP compared to the alternative motif Bw6. The alleles that harbor the Bw4 motif comprises just one third of all HLA-B alleles,³⁷ which possible explains the increased frequency of alleles that comprised Bw6 serology group , such as HLA-B*35, -B*39, and -B*7 in the LTNP group.

Based on the literature, it would be expected that the HLA-B*57 allele would be overrepresented in the LTNP group.³⁹ As this was not observed in our study, long-term AIDS survival could be explained, in part, by the presence of HLA-B*27, -B*44, -B*15 and -B*51, which were also previously associated with slow clinical progression and viral control.^{37,40,41} Even when the 17 LTNP treatment-*naïve* patients were analyzed separately no association with HLA-B*27 and HLA-B*57 was observed. The low frequencies of these protective alleles in HIV-infected patients is not surprising, since other studies performed in HIV Brazilian population showed similar results.^{34,42}

Furthermore, the protective role of HLA-B*57 and HLA-B*27 alleles conferred by its capacity to present foreign Gag-derived antigens exhibiting a high selective pressure on the virus since the earliest stages of infection,^{43,44} explain just in part the long-term AIDS-free condition.^{45,46} Cao *et al.*⁴⁷ described 10 patients with more than 10 years of HIV-infection progression and stable CD4+ T cell count independently of a high frequency of HLA-B*27 and HLA-B*57 alleles. In the same way, Pereyra *et al.*¹ observed that the majority of viremic controllers analyzed were not HLA-B*57 carriers. Moreover, among elite controllers only 44% were HLA-B*57 positive. Emu *et al.*⁴⁸ showed that although certain HLA are associated with highly HIV-specific CD8+ T cells their presence is neither necessarily nor sufficient for viral control.

Other HLA-B alleles such as HLA-B*51 and HLA-B*08 were also analyzed in the present work. Our data did not confirm the previously association of HLA-B*51 with slow disease progression⁴¹ and HLA-B*08 with rapid AIDS progression.⁴⁹ The

mechanism behind these associations is not as well established as those for HLA-B*27, HLA-B*57 and HLA-B*35, however it seems that cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses measured in patients with HLA alleles associated with rapid progression recognize only a small proportion of the known epitopes restricted by these HLA class I molecules, while, CTL responses measured in patients with slow-progression HLA alleles recognize a large proportion of viral epitopes.⁵⁰

The influence of HLA-A in AIDS disease outcome is far less documented. We demonstrated an independent and strong association of HLA-A*3 with lower time to AIDS progression. A previous study by Magierowska *et al.*¹⁴ investigated the influence of several HLA alleles in AIDS progression. The HLA-A*3 was significantly overrepresented in LNTP, together with HLA-B*14, HLA-B*27, HLA-DR*6 and HLA-DR*7. The mechanism behind the protective role of this allele is still unclear, however HLA-A*3 molecules appear to induce a strong CD8+ T cell response by presenting a large panel of viral epitopes.⁵¹ Moreover, HLA-A*3 and HLA-A*11 function as a ligand for KIR3DL2, suggesting a role of these molecules in modulating innate immune response on HIV-1 infection.¹⁹

Both HLA-A*3 and HLA-A*11 alleles are the most frequent members of the superfamily A3, and are considered extremely homogenous, differing only on seven amino acid residues, most of them along the α 1 and α 2 helix.²⁰ Despite the structural and possible functionality similarity, no influence for HLA-A*11 was demonstrated since the frequency of this allele in the studied population was extremely low.

Although HLA-G is not considered a classical HLA class I protein, the role of this molecule in the suppression of immune response²¹ has suggested its influence in the HIV infection modulation and progression to AIDS. To our knowledge this is the first study that assessed the influence of these polymorphisms in AIDS disease progression, although susceptibility to HIV-1 infection was already associated to higher levels of HLA-G.^{52,53} Additionally, Lajoie *et al.*⁵⁴ showed that soluble protein HLA-G expression was associated with more rapid disease progression. Levels of HLA-G remained elevated during the chronic phase in rapid progressors who responded to HAART, but were restored to normal levels in chronic progressors and LNTP.⁵⁵ Considering these findings, we hypothesized that higher levels of HLA-G conferred by the presence of del and C alleles of 14bp insertion/deletion and +3142 polymorphisms respectively, would be associated with rapid progression to AIDS as well as higher CD4+ T cell decline. No correlation between the *HLA-G* polymorphisms or the haplotypes with the categories of

AIDS progression was observed. However, when the whole group was considered on survival analyses, CC genotype and del/del genotype showed a lower median time to AIDS progression. Despite the lack of statistical association, our data are consistent with the hypothesis that higher levels HLA-G contribute to AIDS progression in infected individuals.

It is important to highlight that the role of HLA-G soluble molecules is not completely elucidated since the opposite effect has already been observed in a study of HIV vertical transmission in Brazilian children and 14bp *HLA-G* polymorphism, which demonstrated a possible protective role of del allele.⁵⁵ Moreover, the genotypes that conferred lower levels of HLA-G expression were also associated with HCV co-infection in sickle cell disease patients.²⁸ In addition, the modulation of immune response by HLA-G is dependent of co-factors such as interaction with KIR2DL4 on peripheral blood NK cells.²³ Therefore, despite a possible independent role of HLA-G in disease outcome, these factors should be taken into account.

In the present study, the rigorous criteria used in patients selection, allowed us to divide the HIV-infected individuals into three groups considering their time to progression to AIDS and thereby investigate the possible genetic variations influencing in each condition. Our major findings support the role of homozygous genotype on rapid progression to AIDS as well as the influence of HLA-A*3 and long-term survival. Furthermore, this is the first study that assessed the influence of HLA-G polymorphisms 14bp insertion/deletion and +3142 G/C on AIDS progression and the results obtained are consistent with the hypothesis that higher levels HLA-G contribute to AIDS progression. The absence of classical genetic markers related to rapid and long-term nonprogression emphasizes the importance of study genetic diversity among different populations. Therefore, more studies that consider other genes involved on AIDS progression and viral control (i.e. KIR, HCP5 and HLA-C) as well as viral factors, should be performed in this population to obtain a clearly definition of the effect of this variants on HIV-1 infection modulation.

References

- 1 Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, *et al.*: Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *The Journal of Infectious Diseases* 2008;197:563–571.
- 2 Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, *et al.*: Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *The Journal of Infectious Diseases* 2009;200:1714–1723.
- 3 Casado C, Colombo S, Rauch A, *et al.*: Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PloS One* 2010;5:1-6.
- 4 Rinaldo C, Kingsley L, Neumann J, *et al.*: Association of human immunodeficiency virus (HIV) p24 antigenemia with decrease in CD4+ lymphocytes and onset of acquired immunodeficiency syndrome during the early phase of HIV infection. *Journal of clinical microbiology* 1989;27:880-884.
- 5 Klein MR and Miedema F: Long-term survivors of HIV-1 infection. *Trends in microbiology* 1995;3:386–391.
- 6 Coakley E, Petropoulos CJ and Whitcomb JM: Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Current opinion in infectious diseases* 2005;18:9–15.
- 7 Fellay J, Shianna KV, Ge D, *et al.*: A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. *Science* 2007;317:944–947.
- 8 An P and Winkler CA: Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics* 2010;26:119–131.
- 9 Liu R, Paxton WA, Choe S, *et al.*: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367–377.
- 10 Sáez-Cirión A, Lacabartz C, Lambotte O, *et al.*: HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *PNAS* 2007;104:6776–6781.
- 11 Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, *et al.*: Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nature medicine* 1997;3:212–217.
- 12 Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J, *et al.* HLA-G promotes immune tolerance. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2000;14:93–8.
- 13 Kaur G and Mehra N.: Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. *Tissue antigens* 2009;74:373–385.

- 14 Magierowska M, Theodorou I, Debré P, *et al.*: Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 1999;93:936–941.
- 15 Gao X, Nelson GW, Karacki P, *et al.*: Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *The New England Journal of Medicine* 2001;344:1668–1675.
- 16 Carrington M, Nelson GW, Martin MP, *et al.*: HLA and HIV-1: Heterozygote Advantage and B*35-Cw*04 Disadvantage. *Science* 1999;283:1748–1752.
- 17 Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, *et al.*: HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *PNAS* 2000;97:2709–2714.
- 18 Bashirova A, Thomas R and Carrington M.: HLA/KIR restraint of HIV: surviving the fittest. *Annual Review of Immunology* 2011;29:295–317.
- 19 Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, *et al.*: Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *European Journal of Immunology* 2004;34:1673–1679.
- 20 Lichterfeld M, Williams KL, Mui SK, *et al.*: T cell receptor cross-recognition of an HIV-1 CD8+ T cell epitope presented by closely related alleles from the HLA-A3 superfamily. *International immunology* 2006;18:1179–1188.
- 21 Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, *et al.*: Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011;68:369–395.
- 22 Le Rond S, Azema C, Krawice-Raddane I, *et al.*: Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *Journal Of Immunology* 2006;176:3266–76.
- 23 LeMaout J, Zafaranloo K, Le Danff C, *et al.*: HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4 and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J* 2005;19:662–664.
- 24 Veit TD, Chies JAB. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transplant immunology* 2009;20:229–31.
- 25 Ministério da Saúde: Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV. 2008; 1-130.
- 26 Lahiri DK, Nurnberger JI.: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 1991;19:5444.
- 27 Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, *et al.*: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144

- primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;46:355–367.
- 28 Cordero E, Veit TD, da Silva M a L, *et al.* HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue antigens* 2009;74:308–313.
- 29 Excoffier, LG and Schneider, S: Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005;1:47-50.
- 30 Long, JC: Multiple Locus Haplotype Analysis, version 2.0. Section on Population Genetics and Linkage, Laboratory of Neurogenetics, NIAAA, National Institutes of Health, Bethesda, MD.1999.
- 31 O'Brien SJ, Nelson GW: Human genes that limit AIDS. *Nature genetics* 2004;36:565–574.
- 32 Tang J, Costello C, Keet IP, *et al.*: HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1999;15:317–324.
- 33 Dalmau J, Puertas MC, Azuara M, *et al.*: Contribution of immunological and virological factors to extremely severe primary HIV-1 infection. *Clinical Infectious Disease* 2009;48:229–238.
- 34 Teixeira SLM, Bastos FI, Hacker MA, *et al.*: Distribution of CCR5 genotypes and HLA Class I B alleles in HIV-1 infected and uninfected injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Infection, genetics and evolution* 2009;9:638–642.
- 35 Jin X, Gao X, Ramanathan M, *et al.*: Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) -Specific CD8+-T-Cell Responses for Groups of HIV-1-Infected Individuals with Different HLA-B*35 Genotypes. *Journal of Virology* 2002;76:12603–12610.
- 36 Carrington M, Martin MP and van Bergen J. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *The Cell* 2008;16:620–7.
- 37 Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, *et al.*: Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *PNAS* 2001;98:5140–5145.
- 38 Silva, EM, Acosta AX, Santos, EJM *et al.*: HLA-Bw4-B*57 and Cw*18 alleles are associated with plasma viral load modulation in HIV-1 infected individuals in Salvador, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2010;14:468–475.
- 39 Salgado M, Simón A, Sanz-Minguela B, *et al.*: An additive effect of protective host genetic factors correlates with HIV nonprogression status. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2011;56:300–305.

- 40 Kaslow RA, Carrington M, Apple R, *et al.*: Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature medicine* 1996;2:405–411.
- 41 Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, *et al.*: Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 2009;458:641–645.
- 42 Crovella S, Biller L, Santos S, *et al.*: Frequency of HLA B*5701 allele carriers in abacavir treated-HIV infected patients and controls from northeastern Brazil. *Clinics* 2011;66:1485–1488.
- 43 Jia X, McLaren PJ, Kadie CM, *et al.*: The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation. *Science* 2010;330:1551–1557.
- 44 Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, *et al.*: HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS Medicine* 2006;3:1851-1863.
- 45 Migueles SA, Laborico AC, Imamichi H, *et al.*: The Differential Ability of HLA B*5701 Long-Term Nonprogressors and Progressors To Restrict Human Immunodeficiency Virus Replication Is Not Caused by Loss of Recognition of Autologous Viral gag Sequences. *Journal of Virology* 2003;77:6889–6898.
- 46 Navis M, Schellens I, van Baarle D, *et al.*: Viral replication capacity as a correlate of HLA B57/B5801-associated nonprogressive HIV-1 infection. *Journal of immunology* 2007;179:3133–3143.
- 47 Cao Y, Limo Q, Zhang L, *et al.*: Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term survivors of Human Immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England Journal of Medicine* 1995;332:201-208.
- 48 Emu B, Sinclair E, Hatano H, *et al.*: HLA Class I-Restricted T-Cell Responses May Contribute to the Control of Human Immunodeficiency Virus infection, but Such Responses Are Not Always Necessary for Long-Term Virus Control. *Journal of Virology* 2008;82:5398-5407.
- 49 Brettle RP, McNeil AJ, Burns S, *et al.*: Progression of HIV: follow-up of Edinburgh injecting drug users with narrow seroconversion intervals in 1983-1985. *AIDS* 1996;10:419–30.
- 50 Scherer A, Frater J, Oxenius A, *et al.*: Quantifiable cytotoxic T lymphocyte responses and HLA-related risk of progression to AIDS. *PNAS* 2004;101:12266–12270.
- 51 Racape J, Connan F, Hoebeke J, *et al.*: Influence of dominant HIV-1 epitopes on HLA-A3/peptide complex formation. *PNAS* 2006;103:18208–18213.
- 52 Thibodeau V, Lajoie J, Labbé A-C, *et al.*: High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PloS One* 2011;6:1-6.

53 Matte C, Lajoie J, Lacaille J, *et al.*: Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. *AIDS* 2004;18:427–431.

54 Lajoie J, Fontaine J, Tremblay C, *et al.*: Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection. *AIDS* 2009;23:1437–1440.

55 Fabris A, Catamo E, Segat L, *et al.*: Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS* 2009;23:177–182.

Address correspondence to:

Dr. José Artur Bogo Chies. Laboratory of Immunogenetics. Institute of Biosciences,

Department of Genetics, UFRGS.

Av. Bento Gonçalves – 9500, Campus do Vale. 91501970

Porto Alegre, RS – BRAZIL. PO BOX 15053.

Email address: jabchies@terra.com br.

Tables

Table 1. Characteristics of HIV-infected patients (n=98)

Characteristic	Frequency
Gender (% women)	74.5
Age (years old); mean \pm SD	40.49 \pm 10,2
Ethnicity (% European-descendent)	59.4
Exposure to HIV-1 (%)	
Heterosexual	77.7
MSM	7.4
IDU	8.5
Others	6.4
Relationship	
Fixed partner (% yes)	58.5
Sexual Behavior (%)	
Heterosexual	91.0
MSM	9.0
Smoke (% yes)	40.8
Alcohol (% yes)	11.5
Drug Addiction (% yes)	27.8
Marijuana	60.0
Cocaine	72.0
Crack	36.0
Co-infections (%)	
HCV	20.4
HBV	7.1
Tuberculosis	13.3
Toxoplasmosis	7.1
Others	10.2
Antiretroviral Therapy	
HAART during pregnancy (n)	36
HAART regimen (%)	78.6
2NRTI + 1 NNRTI (%)	46.8
2NRTI + 1 PI (%)	42.9
Treatment adhesion (% yes)	40.0
City of living (%)	
Porto Alegre (capital)	60.9
Metropolitan Region	33.3
Others	5.8
Education (% yes)	
Incomplete Elementary School	53.7
Complete Elementary School	7.4
Incomplete High School	8.4
Complete High School	23.2
Others	7.3
Employment (% yes)	58.4
Oral contraceptive (% yes)	19.5

MSM = men who have sex with men; IDU = injected drug user; HCV = Hepatitis C virus; HBV = Hepatitis B virus; HAART = Highly Active Antiretroviral Therapy; NRTI = Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NNRTI = Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; PI = Protease Inhibitor

Table 2. Frequency of HLA-B alleles, genotypes and HLA-G polymorphisms and haplotypes

Genes/ Alleles/Haplotypes	Frequency [n]				
	RP	CP	LTNP	P	Overall
HLA-B					
Homozyous genotype	0.16 [3]	0.04 [2]	0	0.023	0.05 [5]
Bw4 Allele	0.34[13]	0.31 [28]	0.43 [25]	0.325	0.36 [66]
Bw4/Bw4	0.11 [2]	0.04 [2]	0.21 [6]		0.11 [10]
Bw4/Bw6	0.47 [9]	0.54 [24]	0.45[13]	0.509	0.5 [46]
Bw6/Bw6	0.42 [8]	0.42 [19]	0.34 [10]		0.39 [37]
HLA-B*07	0.10 [4]	0.1 [9]	0.09 [5]	0.761	0.09 [18]
HLA-B*08	0	0.07 [5]	0	0.729	0.03 [5]
HLA-B*13	0	0.02 [2]	0.02 [1]	0.578	0.02 [3]
HLA-B*14	0.03 [1]	0.11 [10]	0.02 [1]	0.576	0.06 [12]
HLA-B*15	0.13 [5]	0.11 [10]	0.12 [7]	0.911	0.12 [22]
HLA-B*18	0.07 [3]	0	0.02 [1]	0.082	0.02 [4]
HLA-B*27	0.03 [1]	0.01 [1]	0.05 [3]	0.347	0.03 [5]
HLA-B*35	0.16 [6]	0.11 [10]	0.09 [5]	0.311	0.11 [21]
HLA-B*37	0	0.01 [1]	0.02 [1]	0.432	0.01 [2]
HLA-B*39	0.03 [1]	0.02 [2]	0.05 [3]	0.423	0.03 [6]
HLA-B*40	0.05 [2]	0.07 [6]	0.02 [1]	0.334	0.05 [9]
HLA-B*41	0	0.01 [1]	0.02 [1]	0.432	0.01 [2]
HLA-B*42	0	0.02 [2]	0.07 [4]	0.047	0.03 [6]
HLA-B*44	0.13 [5]	0.1 [9]	0.16 [9]	0.607	0.12 [23]
HLA-B*45	0.03 [1]	0.01 [1]	0.05 [3]	0.347	0.03 [5]
HLA-B*48	0.03 [1]	0	0	0.119	0.005 [1]
HLA-B*49	0	0.01 [1]	0.02 [2]	0.168	0.02 [3]
HLA-B*50	0	0.03 [3]	0	0.791	0.02 [3]
HLA-B*51	0.08 [3]	0.05 [4]	0.09 [5]	0.759	0.06 [12]
HLA-B*53	0.05 [2]	0.05 [4]	0	0.179	0.03 [6]
HLA-B*55	0.03 [1]	0.02 [2]	0	0.277	0.02 [3]
HLA-B*56	0	0.01 [1]	0.02 [1]	0.432	0.01 [2]
HLA-B*57	0	0.03 [3]	0	0.791	0.02 [3]
HLA-B*58	0.05 [2]	0.03 [3]	0.07 [4]	0.612	0.05 [9]
HLA-B*82	0	0	0.02 [1]	0.209	0.005 [1]
HLA-G					
ins/ins	0.1 [2]	0.07 [3]	0.17 [5]		0.10 [10]
ins/del	0.55 [11]	0.54 [25]	0.49 [14]	0.879	0.53 [50]
del/del	0.35 [7]	0.39 [18]	0.34 [10]		0.37 [35]
del Allele	0.62 [25]	0.66 [61]	0.58 [34]	0.925	0.63 [120]
C/C	0.25 [5]	0.18 [8]	0.28 [8]		0.23 [21]
C/G	0.55 [11]	0.64 [28]	0.41 [12]	0.341	0.54 [51]
G/G	0.2 [4]	0.18 [8]	0.31 [9]		0.23 [21]
C Allele	0.52 [21]	0.5 [44]	0.48 [28]	0.309	0.5 [93]
G-ins	0.5 [10]	0.48 [21]	0.48 [14]		0.48 [45]
G-del	0.25 [5]	0.34 [15]	0.24 [7]	0.813	0.29 [27]
C-del	0.25 [5]	0.18 [8]	0.28 [8]		0.23 [21]

RP=rapid progressors; CP=chronic progressors; LTNP=long-term nonprogressors; n= number of genotypes/alleles and haplotypes observed. For HLA-B frequencies 93 patients were included: 19 RP; 45 CP and 29 LTNP; For HLA-G 14bp insertion/deletion frequency 95 patients were considered: 20 RP; 46 CP and 29 LTNP; For HLA-G +3142 C/G frequency 93 patients were considered: 20 RP; 44 CP and 29 LTNP; For HLA-G Haplotypes 93 patients were considered: 20 RP; 44 CP and 29 LTNP.

Table 3. Influence of genetic profile in T-CD4+ cell decline during pre-treatment follow-up.

Genotype/ Allele/ Haplotype	Median	IQR	p
HLA-B			
Homozigous genotype	-1.44	(-2.79 to -0.09)	0.950
Heterozigous genotype	-0.676	(-1.65 to -0.32)	
Bw4/Bw6 Motif			
HLA-Bw4 carriers	-0.856	(-1.7 to -0.33)	0.518
HLA- Bw4 non-carriers	-0.629	(-1.73 to -0.26)	
Bw4/Bw4	-1.01	(-3.16 to -0.16)	0.807
Bw4/Bw6	-0.766	(-1.67 to -0.35)	
Bw6/Bw6	-0.629	(-1.73 to -0.26)	
HLA -B*35			
HLA-B*35 carriers	-0.809	(-2.67 to -0.24)	0.657
HLA-B*35 non-carriers	-0.676	(-1.54 to -0.32)	
HLA-B*53			
HLA-B*53 carriers	-3.39	(-8.79 to -0.59)	0.14
HLA-B*53 non-carriers	-0.676	(-1.6 to -0.3)	
HLA-B*57			
HLA- B*57 carriers	-0.314	(-6.95 to 0.34)	0.573
HLA-B*57 non-carriers	-0.723	(-1.67 to -0.35)	
HLA-B*27			
HLA- B*27 carriers	-0.225	(-1.24 to -0.21)	0.21
HLA-B*27 non-carriers	-0.772	(-1.84 to -0.39)	
HLA -B*08			
HLA-B*08 carriers	-0.405	(-0.56 to -0.31)	0.153
HLA-B*08 non-carriers	-0.869	(-1.89 to -0.31)	
HLA-B*44			
HLA-B*44 carriers	-0.619	(-2.1 to -0.21)	0.726
HLA-B*44 non-carriers	-0.771	(-1.65 to -0.35)	
HLA-B*51			
HLA-B*51 carriers	-1.143	(-1.70 to -0.55)	0.372
HLA-B*51 non-carriers	-0.646	(-1.77 to -0.26)	
HLA-B*42			
HLA-B*42 carriers	-0.44	(-1.95 to -0.21)	0.506
HLA-B*42 non-carriers	-0.68	(-1.84 to -0.24)	
HLA -A*3			
HLA-A*3 carriers	-0.676	(-1.38 to -0.55)	0.471
HLA-A*3 non-carriers	-0.624	(-1.94 to -0.23)	
HLA -A*11			
HLA- A*11 carriers	-0.461	(-0.9 to -0.03)	0.289
HLA-A*11 non-carriers	-0.672	(-1.81 to -0.3)	
HLA-G +3142 G/C			
C/C	-0.618	(-2.72 to -0.37)	0.498
C/G	-0.771	(-1.7 to -0.314)	
G/G	-0.549	(-1.109 to -0.191)	

IQR = Interquartile range.

Continuation of Table 3. Influence of genetic profile in T-CD4+ cell decline during pre-treatment follow-up.

Genotype/ Allele/ Haplotype	Median	IQR	P
HLA-G +3142 G/C			
G Allele	-0.676	(-1.48 to -0.27)	0.615
No G Allele	-0.617	(-2.72 to -0.378)	
C Allele	-0.676	(-2.12 to -0.32)	0.242
No C Allele	-0.549	(-1.11 to -0.19)	
HLA-G 14pb ins/del			
ins/ins	-0.491	(-0.785 to -0.31)	
ins/del	-0.881	(-1.625 to -0.285)	0.638
del/del	-0.741	(-2.189 to -0.308)	
ins Allele	-0.676	(-1.57 to -0.3)	0.845
No ins Allele	-0.741	(-2.19 to -0.31)	
del Allele	-0.868	(-1.81 to -0.3)	0.344
No del Allele	-0.491	(-0.78 to -0.31)	
HLA-G Haplotype			
ins/G	-0.592	(-1.6 to -0.299)	
del/G	-0.969	(-1.39 to -0.191)	0.881
del/C	-0.617	(-2.722 to -0.377)	

IQR = Interquartile range.

Table 4. Multivariable Cox Regression Analyzes: Association of genotypes, alleles and haplotypes with time to AIDS progression

<i>Genotypes/Alleles</i>	Cox Regression		
	HR	CI (95%)	p
HLA-B			
Heterozygous genotype	1		-
Homozygous genotype	3.48	(1.316 – 9.205)	0.012
Bw4/Bw6 Motif			
HLA-Bw4 non-carriers	1		-
HLA-Bw4 carriers	1.066	(0.611 – 1.859)	0.822
Bw6/Bw6	1		-
Bw4/Bw6	1.104	(0.619 – 1.967)	0.738
Bw4/Bw4	0.69	(0.277 -1.717)	0.425
HLA -B*35			
HLA-B*35 non-carriers	1		-
HLA-B*35 carriers	0.782	(0.413 – 1.483)	0.451
HLA-B*53			
HLA-B*53 non-carriers	1		-
HLA-B*53 carriers	1.479	(0.472 – 4.634)	0.502
HLA-B*57			
HLA-B*57 non-carriers	1		-
HLA-B*57 carriers	1.121	(0.219 – 5.763)	0.891
HLA-B*27			
HLA-B*27 non-carriers	1		-
HLA-B*27 carriers	0.892	(0.174 – 4.564)	0.891
HLA -B*08			
HLA-B*08 non-carriers	1		-
HLA-B*08 carriers	1.82	(0.521 – 6.354)	0.348
HLA-B*44			
HLA-B*44 non-carriers	1		-
HLA-B*44 carriers	0.622	(0.321 – 1.206)	0.16
HLA-B*51			
HLA-B*51 non-carriers	1		-
HLA-B*51 carriers	1.123	(0.539 – 2.339)	0.757
HLA-B*42			
HLA-B*42 non-carriers	1		-
HLA-B*42 carriers	0.915	(0.368 – 2.273)	0.848
HLA-A*3			
HLA-A*3 non-carriers	1		-
HLA-A*3 carriers	0.456	(0.223 – 0.930)	0.031
HLA-A*11			
HLA-A*11 non-carriers	1		-
HLA-A*11 carriers	1.617	(0.469 – 5.570)	0.446
HLA-G +3142 G/C			
G/G	1		-
C/G	1.648	(0.810 – 3.352)	0.168
C/C	0.987	(0.422 – 2.308)	0.975

Continuation Table 4. Multivariable Cox Regression Analyses: Association of genotypes, alleles and haplotypes with time to AIDS progression.

<i>Genotypes/Alleles</i>	Cox Regression		
	HR	CI (95%)	p
HLA-G +3142 G/C			
C Allele	1.419	(0.711 – 2.830)	0.321
G Allele	0.681	(0.358 – 1.293)	0.24
HLA-G 14pb ins/del			
ins/ins	1		-
ins/del	1.406	(0.554 – 3.573)	0.473
del/del	1.464	(0.572 – 3.749)	0.427
ins Allele	1.11	(0.654 – 1.884)	0.7
del Allele	1.433	(0.586 – 3.505)	0.43
HLA-G Haplotype			
ins/G	1		-
del/G	1.276	(0.702 – 2.318)	0.424
del/C	0.732	(0.374 – 1.432)	0.362

Adjusted model for gender, ethnicity, CCR5 Δ 32, HLA-B*27/-B*57, HLA-B*35/-B*53.
 HR, Hazard Ratio; CI, confidence interval.

Figure 1.

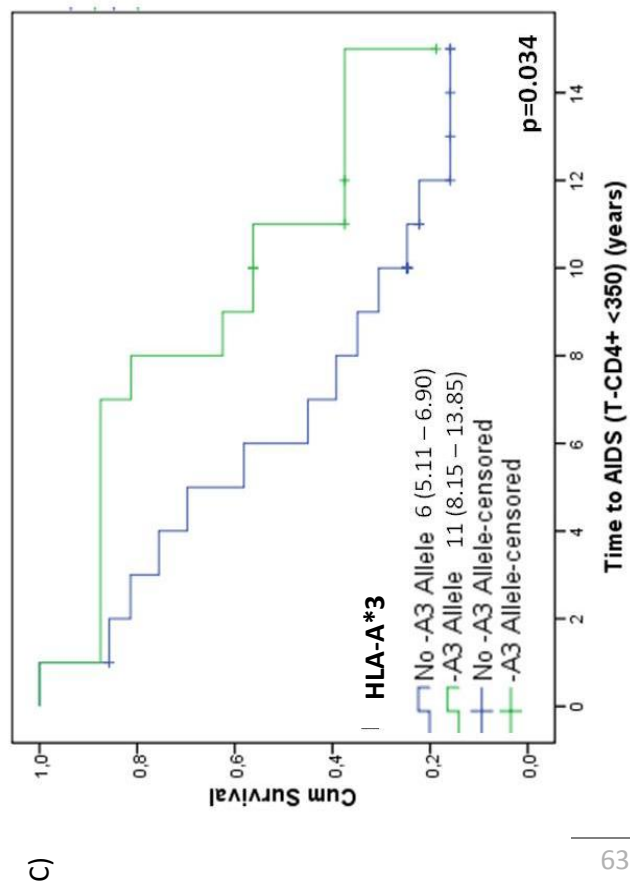
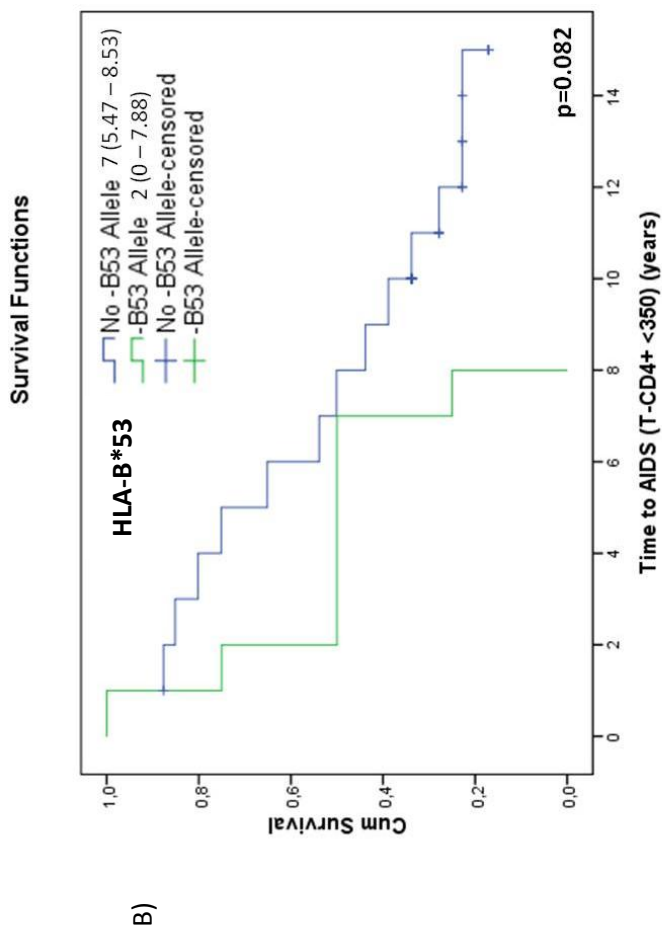
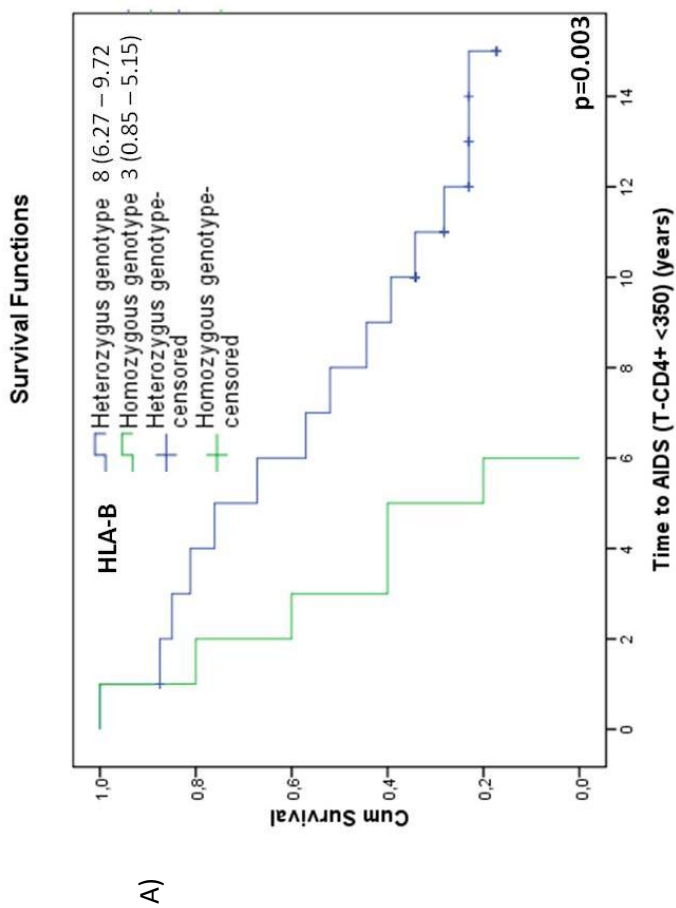
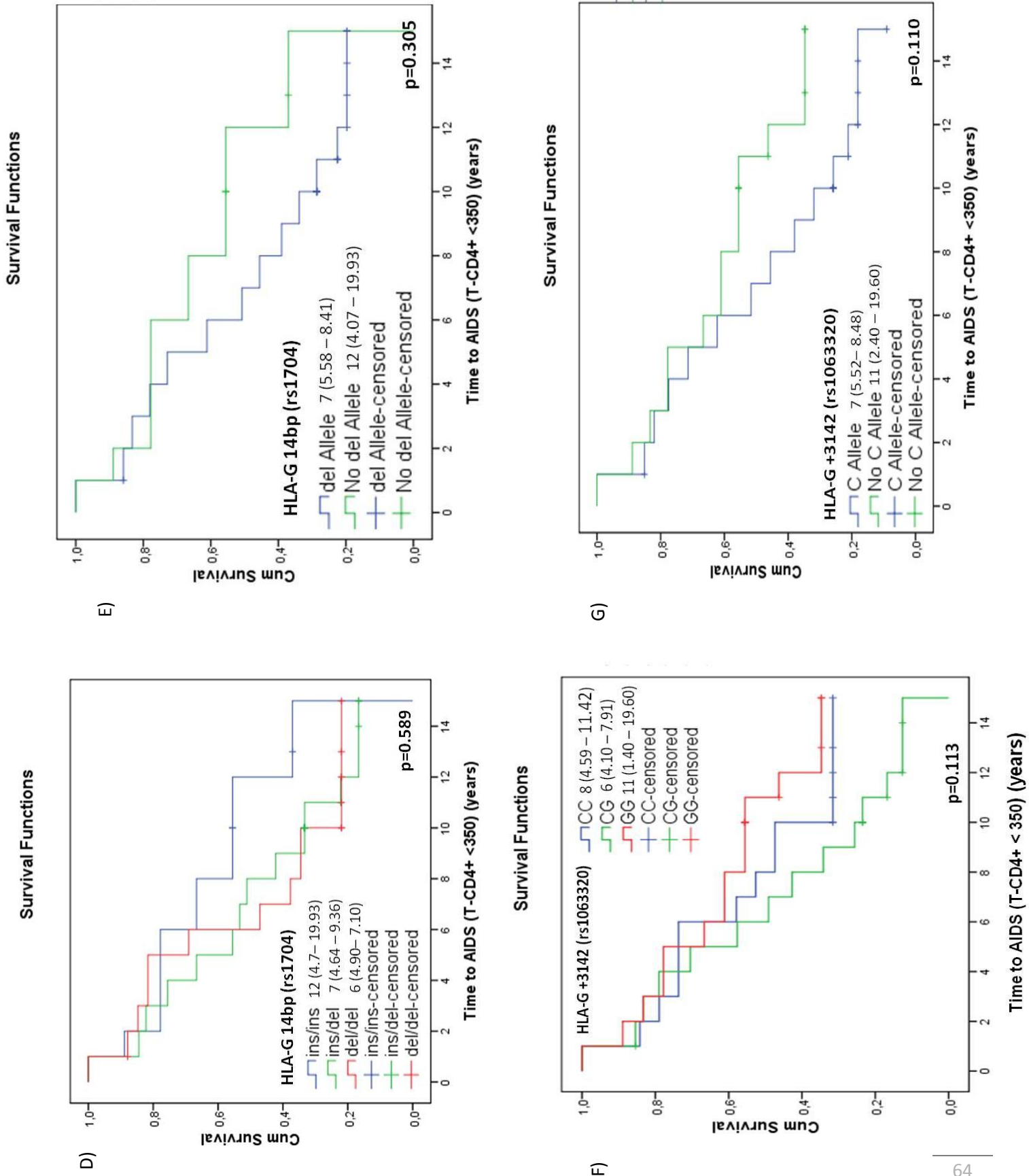


Figure 1. A) Homozygous genotype for HLA-B showed a significantly difference on AIDS time progression compared to heterozygous genotype. B) HLA-B*53 positive individuals demonstrated a shorter period of AIDS progression compared to B-53 non-carriers. C) HLA-A*3 carriers showed a delay on AIDS progression compared to non-carriers.

Figure 1. D) *HLA-G* 14bp insertion/deletion (rs1704): del/del genotype showed a shorter period of time to AIDS progression compared to ins/ins and heterozygous genotypes. E) *HLA-G* del allele showed a shorter period to AIDS progression compared to individual that do not carried del allele. F) *HLA-G* +3142 polymorphism (rs1063320): CC genotype showed a shorter period of time to AIDS progression compared to GG genotype. G) *HLA-G* Allele C showed a shorter period to AIDS progression compared to allele C non-carriers.



Capítulo 4: Dados Complementares

É importante ressaltar que além dos genes apresentados no artigo científico apresentado, outros dois fatores genéticos (HCP5 e genes KIR) foram avaliados durante o desenvolvimento deste projeto de mestrado. As duas variantes genéticas selecionadas apresentam um claro papel na progressão à aids.

A identificação do polimorfismo rs2395029 do gene HCP5 foi realizada através da metodologia proposta por Galván *et al.*, 2011. A amplificação do material genético foi realizada em dois tubos separadamente, um para cada alelo de interesse (T e G). Em cada reação foi incluído um conjunto de *primers*, que amplificava um fragmento de 835pb, o qual serviu como controle interno de reação, além de um dos dois *primers* alelo específico, o qual junto com o *primer* reverso do controle interno originava o fragmento de interesse (404pb). Uma amostra heterozigota foi obtida com o autor do artigo original para auxiliar na padronização da metodologia (GALVÁN *et al.*, 2011). Os produtos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio e visualizados em luz ultra-violeta (Figura 5).

Dos 98 pacientes analisados, 04 indivíduos apresentaram o genótipo heterozigoto enquanto que nenhum paciente foi identificado como homozigoto GG, demonstrando a baixa frequência do alelo G nesses pacientes (0.02). Análises preliminares não demonstraram nenhuma correlação desse polimorfismo entre as diferentes categorias de progressão ($p=0,685$) nem mesmo com o tempo progressão para aids ($p=0,906$) (Figura 6).

Conforme descrito previamente por Fellay *et al.*, 2007, o alelo G do gene HCP5 encontra-se em desequilíbrio de ligação com HLA-B*57. Dos 4 indivíduos identificados como portadores do alelo G, 3 indivíduos também eram portadores do HLA-B*57. Os três indivíduos portadores HLA-B*57/HCP5-G pertencem ao grupo de progressores crônicos, enquanto que o indivíduo que apresenta o alelo G, mas não apresenta o HLA-B*57 pertence ao grupo de progressores lentos.

Os genes KIR e seus ligantes HLA também foram selecionados para avaliação. A identificação dos genes KIR foi realizada através da técnica de PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) utilizando o kit comercial LABType® SSO KIR (RSSOKIR ONE LAMBDA, Inc., Canoga Park, USA), que identifica a presença ou ausência de 16 genes. A amplificação do DNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante,

utilizando D-MIX, uma mistura padrão contendo Buffer, dNTPs, MgCl₂, H₂O, *primers* específicos para os éxons 3, 4, 5, 7, 8, 9 e Taq Polimerase (Super-Therm JMR Holdings, USA). A mix com o material genético de cada indivíduo foi colocada no termociclador Gene Amp PCR 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) e submetida às seguintes condições de amplificação: desnaturação 96°C por 3', seguidos de 5 ciclos de 20'' a 96°C, 20'' a 60°C e 20'' a 72°C; 30 ciclos de 10'' a 96°C, 15'' a 60°C e 20'' a 72°C e finalmente um estágio de extensão a 72°C por 10'. O produto amplificado foi desnaturado e hibridizado com sondas complementares ao DNA (sondas de oligonucleotídeos sequência-específica) conjugadas com microesferas fluorescentes. A leitura das reações foi realizada utilizando-se um citômetro de fluxo (LABScanTM 100), o qual emprega a tecnologia LuminexTM. A análise dos resultados foi feita com o software HLA FUSION RESEARCH (ONE LAMBDA, Inc., Canoga Park, USA), o qual faz a coleta dos dados e a determinação dos genes.

As frequências obtidas para os genes KIR para os 98 indivíduos estão descritas na Tabela 3. Em relação aos ligantes HLA, além do HLA-G, dos alelos HLA-A*3 e HLA-A*11, e do motivo Bw4, os quais já foram apresentados anteriormente no artigo científico, também analisamos a frequência dos grupos C1 e C2 do HLA-C (Tabela 4). A identificação dos grupos C1 e C2 foi realizada através de PCR-SSP (*Sequence Specific Primer* PCR) segundo metodologia descrita por Bunce *et al.*, 1995. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e a identificação da presença ou ausência dos grupos C1 e C2 visualizada com brometo de etídeo. O resultado da tipagem dos genes KIR só foi obtido em Janeiro de 2012, desta forma, ainda não foi possível realizar todas as análises estatísticas necessárias para avaliação completa da influência desses genes em conjunto com seus ligantes HLA na progressão para aids.

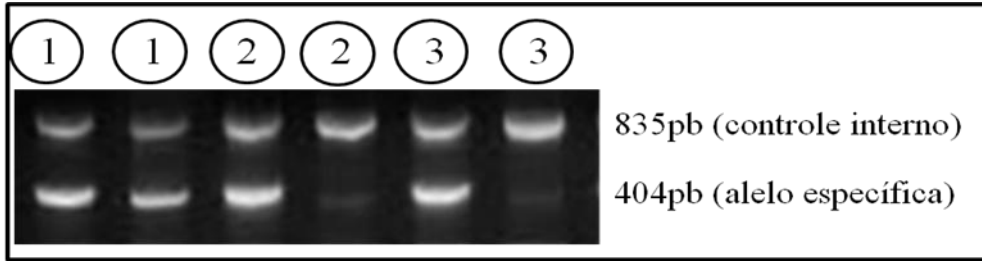


Figura 5. Gel 1,5% de agarose com amplificação para o polimorfismo rs2395029 do gene *HCP5*.
 1 = paciente heterozigoto (T/G); 2 e 3 = pacientes homozigotos para alelo T (T/T)

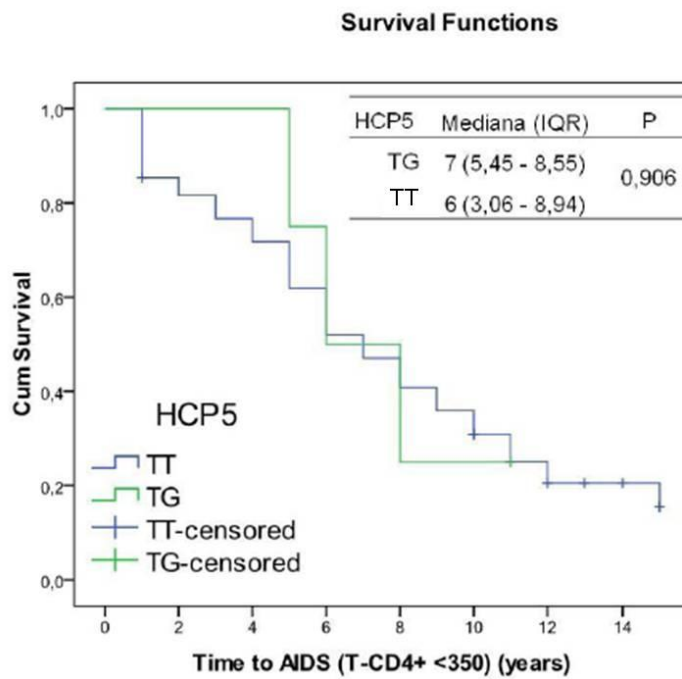


Figura 6. Tempo de progressão para aids entre os genótipos do gene *HCP5*.

Tabela 3. Frequência dos genes KIR em 98 pacientes HIV positivos.

KIR	Frequência [n]
KIR2DL1	0,91 [89]
KIR2DL2	0,46 [45]
KIR2DL3	0,89 [87]
KIR2DL4	0,95 [93]
KIR2DL5	0,45 [44]
KIR2DP1	0,91 [89]
KIR2DS1	0,27 [27]
KIR2DS2	0,49 [48]
KIR2DS3	0,26 [25]
KIR2DS4	0,92 [90]
KIR2DS5	0,26 [25]
KIR3DL1	0,93 [91]
KIR3DL2	0,94 [92]
KIR3DL3	0,94 [92]
KIR3DP1	0,95 [93]
KIR3DS1	0,26 [25]

n = número de genes observados

Tabela 4. Frequência preliminar dos grupos C1 e C2 do HLA-C

HLA-Cw	Frequência [n]
HLA_C1	0,57 [101]
HLA_C2	0,43 [75]

n = número de alelos observados

Capítulo 5: Discussão

Desde sua descoberta em 1983, o HIV se tornou um grave problema de saúde pública em todo o mundo. No Brasil atualmente, estima-se que existam mais de 600 mil pessoas infectadas com o vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apesar dos avanços obtidos com as campanhas públicas de prevenção da transmissão e com a distribuição dos medicamentos antirretrovirais, o acesso tardio ao sistema público de saúde ainda é uma realidade alarmante no país, o que torna o diagnóstico e tratamento dos indivíduos HIV positivos um desafio.

O objetivo principal deste estudo foi identificar pacientes HIV positivos em atendimento regular no Serviço de Infectologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição de Porto Alegre, RS que contemplassem as diferentes categorias de progressão para aids - rápidos, crônicos e lentos - a partir de rigorosos critérios estabelecidos previamente à seleção dos pacientes e avaliar a presença de fatores genéticos associados à progressão para aids nestes indivíduos. Em 90% dos prontuários médicos revisados, não foi possível estimar o tempo de progressão para aids. O diagnóstico tardio da infecção é uma das principais razões para este resultado, além da baixa adesão do paciente ao acompanhamento clínico após seu diagnóstico e da falta de clareza ou exatidão dos dados clínicos nos prontuários médicos. Aproximadamente de 20 a 60% dos adultos que ingressam pela primeira vez no serviço especializado de saúde já se encontram no estágio de aids (MUKOLO *et al.*, 2012). O alto grau de comprometimento do sistema imunológico propicia o aparecimento de infecções oportunistas, tornando menores as chances do indivíduo de responder à medicação antirretroviral e consequentemente aumentando o risco de óbito (GIRARDI *et al.*, 2007; MUKOLO *et al.*, 2012).

Atualmente, a epidemia de HIV/aids do Brasil é caracterizada por fenômenos como heterossexualização, feminização e pauperização, os quais também podem ser observados entre as características sócio-comportamentais e demográficas do presente estudo. Além disso, o alto percentual de mulheres neste trabalho também pode ser justificado pelo fato do sexo masculino ser considerado um fator de risco ao diagnóstico tardio da infecção pelo HIV (SZWARCWALD *et al.*, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; MUKOLO *et al.*, 2012).

Sabe-se que diversas características incluindo gênero, idade avançada, etnia e co-infecções pelos vírus das hepatites B e C podem influenciar no tempo de progressão para a aids (NICASTRI *et al.*, 2005; MORSICA *et al.*, 2007; OKULICZ *et al.*, 2009). As variáveis etnia e gênero demonstraram uma influência significativa no tempo de progressão da doença ($p=0,029$ e $p=0,038$ respectivamente), mas somente etnia apresentou uma distribuição diferenciada entre progressores rápidos, crônicos e lentos ($p=0,020$). Pacientes com origem européia foram mais frequentemente encontrados no grupo de progressores crônicos, enquanto que a frequência de pacientes afro-descendentes foi superior no grupo de progressores lentos, concordando com os resultados observados por Okulicz *et al.*, (2009). Contudo, nenhum dos polimorfismos estudados parece estar diretamente relacionado com essa distribuição, visto que nenhuma diferença na frequência dos genótipos e alelos foi observada entre os dois grupos étnicos.

Os estudos moleculares vêm buscando identificar fatores virais e do hospedeiro que possam explicar, mesmo que em parte, a grande heterogeneidade observada na progressão à aids (AN e WINKLER, 2010). Considerando a alta variabilidade do sistema imunológico, podemos concluir que a progressão para aids é influenciada por um conjunto de fatores genéticos, os quais podem ser extremamente variáveis entre diferentes populações. No presente trabalho, confirmamos a forte influência da homozigose de alelos HLA na progressão rápida para aids além do efeito protetor da presença do alelo HLA-A*3 na progressão da doença. A progressão rápida em indivíduos homozigotos está diretamente relacionada à sua menor diversidade na apresentação de peptídeos para as células T quando comparado ao genótipo heterozigoto, resultando em uma menor ativação da resposta imunológica contra o HIV (CARRINGTON, M. *et al.*, 1999; TANG *et al.*, 1999). Já a associação do HLA-A*3 com a progressão lenta para a aids pode ser explicada pela habilidade deste alelo em apresentar uma alta variedade de peptídeos virais, e consequentemente induzir uma resposta T-CD8+ efetiva (RACAPE *et al.*, 2006). Adicionalmente, este alelo funciona como ligante do receptor KIR3DL2 das células NK, o que sugere sua participação na modulação da resposta imune inata (HANSASUTA *et al.*, 2004).

Apesar da diversidade do sistema HLA, o papel dos alelos HLA-B*27 e HLA-B*57 na progressão lenta para aids assim como o efeito do HLA-B*35 na progressão rápida da doença têm sido amplamente reportados na literatura (CAO *et al.*, 1995; MAGIEROWSKA *et al.*, 1999; CARRINGTON *et al.*, 1999; MIGUELES *et al.*, 2000;

GAO *et al.*, 2010). No presente trabalho, não foi possível confirmar a associação do alelo HLA-B*57 com a progressão lenta para a aids. Por outro lado, sugerimos que a presença dos alelos HLA-B*27, HLA-B*44, HLA-B*15 e HLA-B*51 pode modular, em menor escala, o controle da infecção, corroborando estudos anteriores que apontam para a influência desses alelos na progressão lenta da doença e controle da viremia (AL JABRI *et al.*, 2001; FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 2001; KAWASHIMA *et al.*, 2009). A presença do motivo Bw4 também não pode ser diretamente associada com a progressão lenta da aids, apesar dos alelos HLA-B*27, HLA-B*44 e HLA-B*51 serem portadores desse motivo (<http://hla.alleles.org>). Esse resultado discorda do efeito independente do motivo Bw4 no controle da viremia observado por Flores-Villanueva *et al.*, (2001). Mais recentemente, em um estudo realizado na população brasileira, o efeito da presença do motivo Bw4 na viremia plasmática foi totalmente dependente da presença do alelo HLA-B*57 (SILVA *et al.*, 2010).

De forma semelhante, a progressão rápida para aids não pode ser diretamente atribuída à presença do alelo HLA-B*35. No entanto, sabe-se que apenas uma pequena parcela desses alelos, os quais compõem o grupo Px, tem sido relacionada com a progressão acelerada da doença (GAO *et al.*, 2001). O mecanismo pelo qual o alelo HLA-B*35Px leva a uma progressão acelerada para aids não parece estar diretamente relacionado com a falha na apresentação de antígenos, pois ambos os grupos apresentam epítomos conservados da proteína Gag. Contudo, recentemente foi demonstrada uma pequena, porém significativa diferença na indução de resposta citotóxica entre os dois grupos (JIN *et al.*, 2002; O'BRIEN e NELSON, 2004).

Nossos achados corroboram alguns efeitos previamente descritos na literatura e ainda sugerem um importante papel de moléculas de HLA classe I não clássicas na imunopatogênese do HIV. Sabendo que infecção pelo HIV-1 pode aumentar os níveis de expressão da molécula HLA-G (MATTE, *et al.*, 2004; LAJOIE *et al.*, 2006; THIBODEAU *et al.*, 2011), decidimos investigar a influência de dois polimorfismos da região 3'UTR (14pb inserção/deleção e +3142C/G) os quais estão relacionados à alterações na expressão do *HLA-G*. Os dois polimorfismos estudados para o este gene não demonstraram associação clara com a progressão da doença, porém indicaram que uma maior expressão do gene, conferida pela presença dos alelos C e del, estaria relacionada com uma maior tolerância do sistema imunológico frente a infecção viral e consequentemente a uma progressão mais rápida para aids, concordando com resultados obtidos anteriormente por Lajoie *et al.*, (2010).

A resposta imune contra o HIV é modulada por múltiplos fatores genéticos, os quais podem estar relacionados direta ou indiretamente com o reconhecimento do vírus, incluindo genes que participam da resposta imune inata e genes envolvidos na resposta imune adaptativa (KAUR e MEHRA, 2009b). À medida que os estudos moleculares avançam novos marcadores são identificados e seus efeitos devem ser confirmados em diferentes populações. No estudo realizado por Fellay *et al.*, 2007, a presença dos alelos G e C dos polimorfismo rs2395029 no gene *HCP5* e rs9264942 da região promotora do *HLA-C*, respectivamente, foi associada a um maior controle da viremia plasmática em pacientes HIV positivos. O papel do HLA-C na modulação da infecção viral foi inicialmente questionado devido a sua menor variabilidade e expressão celular quando comparado ao HLA-B. Além disso, nenhum dos grupos do HLA-C (C1 e C2) e seus respectivos receptores KIR demonstraram influência na patogênese do HIV (BASHIROVA *et al.*, 2011). Recentemente, Kulkarni *et al.*, 2011 demonstraram que a região 3'UTR do gene *HLA-C*, a qual funciona como um sítio de regulação pós-transcricional mediada por microRNAs, parece exercer um papel fundamental no controle da expressão do *HLA-C* quando comparado ao polimorfismo da região promotora.

Em relação aos genes KIR e seus ligantes HLA, a proteção conferida pelo sinergismo dos receptores KIR3DL1/KIR3DS1 com o motivo Bw4 é a associação mais clara com relação à progressão da aids (BARBOUR *et al.*, 2007; MORVAN *et al.*, 2009; BOULET *et al.*, 2010; ELLER *et al.*, 2011). Além disso, essa interação já foi associada à baixa carga viral e prevenção no aparecimento de infecções oportunistas (MARTIN, *et al.*, 2002; ELLER *et al.*, 2011).

Sabe-se que a presença dos alelos HLA-B*27, HLA-B*57 e HLA-B*35 explicam somente uma pequena parcela das diferenças observadas durante a progressão clínica para aids. A ausência de associação desses alelos com o tempo de progressão para aids neste estudo incentiva a investigação de novos fatores genéticos neste mesmo grupo de pacientes. Como perspectivas futuras pretendemos concluir a investigação da influência do polimorfismo no gene *HCP5* (rs2395029) e da interação entre KIR e seus ligantes HLA na progressão para aids e ainda adicionar a avaliação dos polimorfismos da região 3'UTR e região promotora (rs9264942) do gene *HLA-C*.

A compreensão da diversidade genética da população HIV positiva brasileira, assim como a identificação de marcadores envolvidos na modulação da infecção pode futuramente permitir novas estratégias de acompanhamento clínico e tratamento desses

pacientes. Além disso, esses resultados podem contribuir para o entendimento da patogênese viral, além de auxiliar o desenvolvimento de vacinas e novos alvos terapêuticos.

Referências

AL JABRI, A. A. HLA and in vitro susceptibility to HIV infection. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 12-13, p. 959-967, 2002.

ALTFELD, M.; KALIFE, E. T.; QI, Y. *et al.* HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 10, p. 1851-1864, 2006.

AN, P.; WINKLER, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 3, p. 119-131, 2010.

ARNETT, K. L.; HUANG, W; VALIANTE, N. M.; BARBER, L. D.; PARHAM, P. The Bw4/Bw6 difference between HLA-B*0802 and HLA-B*0801 changes the peptides endogenously bound and the stimulation of alloreactive T cells. **Immunogenetics**, v. 48, n. 1, p. 56-61, 1998.

BACCHETTI, P.; MOSS, A. R. Incubation period of AIDS in San Francisco. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 251-253, 1989.

BARBOSA JUNIOR, A.; SZWARCOWALD, C. L.; PASCUM, A. R. P.; SOUZA JÚNIOR, P. B. Tendências da epidemia de AIDS entre subgrupos sob maior risco no Brasil, 1980-2004. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 727-737, 2009.

BARBOUR, J. D.; SRIRAM, U.; CAILLIER, S. J. *et al.* Synergy or independence? Deciphering the interaction of HLA Class I and NK cell KIR alleles in early HIV-1 disease progression. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 4, p.471-474, 2007.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868-870, 1983.

BASHIROVA, A. A.; THOMAS, R.; CARRINGTON, M. HLA/KIR restraint of HIV: surviving the fittest. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 295-317, 2011.

BIHL, F.; FRAHM, N.; GIAMMARINO, L. DI. *et al.* Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, p. 4094-4101, 2006.

BORGHANS, J. A. M.; MOLGAARD, A.; BOER, R. J.; KEŞMIR, C. HLA alleles associated with slow progression to AIDS truly prefer to present HIV-1 p24. **PloS One**, v. 2, n. 9, p.1-9, 2007.

BOULET, S.; SONG, R.; KAMYA, P. *et al.* HIV protective KIR3DL1 and HLA-B genotypes influence NK cell function following stimulation with HLA-devoid cells. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 4, p. 2057-2064, 2010.

BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A. L.; FARAH PEREIRA, N.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v. 56, n. 5, p. 417-427, 2000.

BRETTLE, R. P.; MCNEIL, A. J.; BURNS, S. *et al.* Progression of HIV: follow-up of Edinburgh injecting drug users with narrow seroconversion intervals in 1983-1985. **AIDS**, v. 10, n. 4, p. 419-430, 1996.

BRUMME, Z. L.; GOODRICH, J.; MAYER, H. B. *et al.* Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 3, p. 466-474, 2005.

- BUNCE, M.; O' NEIL, C. M.; BARNARDO, M. C. *et al.* Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). **Tissue Antigens**, v.46, p.355-357, 1995.
- CAO, Y.; LIMO, Q.; ZHANG, L.; SAFRIT, J.; HO, D. Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term survivors of Human Immunodeficiency virus type 1 infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 4, p.201-208, 1995.
- CARR, A.; COOPER, D. A. Adverse effects of antiretroviral therapy. **The Lancet**, v. 356, p. 1423-1430, 2000.
- CARRINGTON, M.; NELSON, G. W.; MARTIN, M. P. *et al.* HLA and HIV-1: Heterozygote Advantage and B*35-Cw*04 Disadvantage. **Science**, v. 283, n. 5408, p. 1748-1752, 1999.
- CARRINGTON, M.; O'BRIEN, S. J. The influence of HLA genotype on AIDS. **Annual Review of Medicine**, v. 54, p. 535-551, 2003.
- CARRINGTON, M.; MARTIN, M. P.; BERGEN, J. V. KIR-HLA intercourse in HIV disease. **The Cell**, v. 16, n. 12, p. 620-627, 2008.
- CASADO, C.; COLOMBO, S.; RAUCH, A. *et al.* Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. **PloS One**, v. 5, n. 6, p. 1-6, 2010.
- CATANO, G.; KULKARNI, H.; HE, W. *et al.* HIV-1 disease-influencing effects associated with ZNRD1, HCP5 and HLA-C alleles are attributable mainly to either HLA-A10 or HLA-B*57 alleles. **PloS One**, v. 3, n. 11, p. 1-16, 2008.
- CHAKRABARTI, L. A.; SIMON, V. Immune mechanism of HIV control. **Current Opinion Immunology**, v. 22, n. 4, p. 488-496, 2010.
- COAKLEY, E.; PETROPOULOS, C. J.; WHITCOMB, J. M. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 9-15, 2005.
- COHEN, M. S.; HELLMANN, N.; LEVY, J. A. *et al.* The spread , treatment , and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1244-1254, 2008.
- COLOMBO, S.; RAUCH, A.; ROTGER, M. *et al.* The HCP5 single-nucleotide polymorphism: a simple screening tool for prediction of hypersensitivity reaction to abacavir. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 6, p. 864-867, 2008.
- CONSIGLIO, C. R.; VEIT, T. D.; MONTICIELO, O. A. *et al.* Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 6, p. 540-545, 2011.
- CORDERO, E. A. A.; VEIT, T. D.; SILVA, M. A. L. *et al.* HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 4, p. 308-313, 2009.
- COSTIN, J. M. Cytopathic mechanisms of HIV-1. **Virology journal**, v. 4, p. 100, 2007.
- CRESSEY, T. R.; LALLEMANT, M. Pharmacogenetics of antiretroviral drugs for the treatment of HIV-infected patients: an update. **Infection, genetics and evolution**, v. 7, n. 2, p. 333-342, 2007.
- CROVELLA, S.; BILLER, L.; SANTOS, S. *et al.* Frequency of HLA B*5701 allele carriers in abacavir treated-HIV infected patients and controls from northeastern Brazil. **Clinics**, v. 66, n. 8, p. 1485-1488, 2011.

DALALIO, M. M. D. O.; SELL, A. M.; TODA, L. Y. *et al.* Frequência dos antígenos HLA- A e HLA- B em populações das regiões de Curitiba e Norte/Noroeste do Estado do Paraná. **Maringá**, v. 24, n. 3, p. 743-748, 2002.

DALGLEISH, A. G.; BEVERLEY, P. C.; CLAPHAM, P. R. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 763-767, 1984.

DALMAU, J.; PUERTAS, M. C.; AZUARA, M. *et al.* Contribution of immunological and virological factors to extremely severe primary HIV-1 infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 48, n. 2, p. 229-238, 2009.

DEACON, N. J.; TSYKIN, A.; SOLOMON, A. *et al.* Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. **Science**, v. 270, n. 5238, p. 988-91, 1995.

DEAN, M.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C. *et al.* Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the CKR5 Structural Gene. **Science**, v. 274, p. 1856-1862, 1996.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System (First of Two Parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000a.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System (Second of Two Parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 2, p. 108-117, 2000b.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina, Ribeirão Preto**, 2000a.

DONADI, E. A.; SILVEIRA, R. D.; DEGHAIDE, N. H. S.; FERRAZ, A. S. Frequência dos Antígenos de Histocompatibilidade na População Normal da Região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 33, p. 19-26, 2000b.

DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C.; ARNAIZ-VILLENA, A. *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.

DYER, W. B.; ZAUNDERS, J. J.; YUAN, F. F. *et al.* Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. **Retrovirology**, v. 5, p. 112, 2008.

ELLER, M. A.; KOEHLER, R. N.; KIJAK, G. H. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with increased NK cell polyfunctionality and higher levels of KIR3DL1+ NK cells in ugandans carrying the HLA-B Bw4 motif. **Journal of Virology**, v. 85, n. 10, p. 4802-4811, 2011.

EMU, B.; SINCLAIR, E.; HATANO, H. *et al.* HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5398-5407, 2008.

FABRIS, A.; CATAMO, E.; SEGAT, L. *et al.* Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 177-182, 2009.

FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M.; SULIGOI, B.; BUTTÒ, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Ann Ist Super Sanità**, v. 46, n. 1, p. 5-14, 2010.

FAUCI, A S.; PANTALEO, G.; STANLEY, S.; WEISSMAN, D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, n. 7, p. 654-663, 1996.

- FEGER, U.; TOLOSA, E.; HUANG, Y.H. *et al.* HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. **Blood**, v. 110, n. 2, p. 568-577, 2007.
- FELLAY, J.; SHIANN, K. V.; GE, D. *et al.* A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. **Science**, v. 317, n. 5840, p. 944-947, 2007.
- FLORES-VILLANUEVA, P. O.; YUNIS, E. J.; DELGADO, J. C. *et al.* Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. **PNAS**, v. 98, n. 9, p. 5140-5145, 2001.
- FRASER, C.; HOLLINGSWORTH, T. D.; CHAPMAN, R.; WOLF, F.; HANAGE, W. P. Variation in HIV-1 set-point viral load: epidemiological analysis and an evolutionary hypothesis. **PNAS**, v. 104, n. 44, p. 17441-17446, 2007.
- FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 26, n. 1-6, p. 13-33, 2001.
- GALVÁN, C. A.; ELBARCHA, O. C.; FERNÁNDEZ, E. J.; BELTRAMO, D. M.; SORIA, N. W. Rapid HCP5 single-nucleotide polymorphism genotyping: a simple allele-specific PCR method for prediction of hypersensitivity reaction to Abacavir. **Clinic Chimica Acta**, v. 412, n. 15-16, p. 1382-1384, 2011.
- GAO, X.; NELSON, G. W.; KARACKI, P. *et al.* Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 22, p. 1668-1675, 2001.
- GAO, X.; O'BRIEN, T. R.; WELZEL, T. M. *et al.* HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load, and progression to AIDS, but not susceptibility to infection. **AIDS**, v. 24, n. 12, p. 1835-1840, 2010.
- GERETTI, A. M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2006.
- GILLESPIE, G. M. A.; KAUL, R.; DONG, T. *et al.* Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in slow progressors with B*57. **AIDS**, v. 16, n. 7, p. 961-972, 2002.
- GIRARDI, E.; SABIN, C. A.; MONFORTE, A. D. Late diagnosis of HIV infection: epidemiological features, consequences and strategies to encourage earlier testing. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 46, p.3-8, 2007.
- GRABAR, S.; SELINGER-LENEMAN, H.; ABGRALL, S. *et al.* Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. **AIDS**, v. 23, n. 9, p. 1163-1169, 2009.
- HADDAD, R.; CILIÃO ALVES, D. C.; ROCHA-JUNIOR, M. C. *et al.* HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. **AIDS Research and Human retroviruses**, v. 27, n. 3, p. 283-288, 2011.
- HAN, Y.; LAI, J.; BARDITCH-CROVO, P. *et al.* The role of protective HCP5 and HLA-C associated polymorphisms in the control of HIV-1 replication in a subset of elite suppressors. **AIDS**, v. 22, n. 4, p. 541-544, 2008.
- HANSASUTA, P.; DONG, T.; THANANCHAI, H. *et al.* Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1673-1679, 2004.
- HAYNES, B. F.; PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. **Science**, v. 271, n. 5247, p. 324-328, 1996.

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D.; OSMANOV, SALADIN. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, n. 16, p.13-23, 2006.

HENDEL, H.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; LEBUANEC, H. *et al.* New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 11, p.6942-6946, 1999.

HUANG, X.; LING, H.; MAO, W. *et al.* Association of HLA-A, B, DRB1 alleles and haplotypes with HIV-1 infection in Chongqing, China. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p.1-9, 2009.

HUANG, Y.; ZHANG, L.; HO, D. D. Characterization of nef sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Virology**, v. 69, n. 1, p. 93-100, 1995.

HUNT, J. S.; ORR, H. T. HLA and maternal-fetal recognition. **FASEB J**, v. 6, n. 6, p. 2344-2348, 1992.

IANNELLO, A.; DEBECHE, O.; SAMARANI, S.; AHMAD, A. Antiviral NK cell responses in HIV infection: NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 1, p. 1-26, 2008.

JIN, X.; GAO, X.; RAMANATHAN, M. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) - Specific CD8+-T-Cell Responses for Groups of HIV-1-Infected Individuals with Different HLA-B*35 Genotypes. **Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p. 12603-12610, 2002.

KASLOW, R. A.; CARRINGTON, M.; APPLE, R. *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. **Nature Medicine**, v. 2, n. 4, p. 405-411, 1996.

KASLOW, R. A.; RIVERS, C.; TANG, J. *et al.* Polymorphisms in HLA class I genes associated with both favorable prognosis of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection and positive cytotoxic T-lymphocyte responses to ALVAC-HIV recombinant canarypox vaccines. **Journal of Virology**, v. 75, n. 18, p. 8681-8689, 2001.

KAUR, G.; MEHRA, N. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: susceptibility to HIV infection. **Tissue Antigens**, v. 73, n. 4, p. 289-301, 2009a.

KAUR, G.; MEHRA, N. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 5, p. 373-385, 2009b.

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

KLEIN, M. R.; MIEDEMA, F. Long-term survivors of HIV-1 infection. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 386-391, 1995.

KULKARNI, S.; SAVAN, R.; QI, Y. *et al.* Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 495-498, 2011.

LAJOIE, J.; HARGROVE, J.; ZIJENAH, L. S. *et al.* Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 2, p. 298-301, 2006.

LAJOIE, J.; FONTAINE, J.; TREMBLAY, C. *et al.* Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection. **AIDS**, v. 23, n. 11, p. 1437-1440, 2009.

LAJOIE, J.; MASSINGA, L. M.; POUDRIER, J. *et al.* Blood soluble human leukocyte antigen G levels are associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Beninese commercial sex workers. **Human Immunology**, v. 71, n. 2, p. 182-185, 2010.

LE MAOULT, J.; ZAFARANLOO, K.; LE DANFF, C.; CAROSELLA, E. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4 and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. **FASEB J**, v. 19, p. 662-664, 2005.

LE ROND, S.; AZEMA, C.; KRAWICE-RADDANE, I.; DURRBACH, A.; GUETTIER, C. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. **Journal Of Immunology**, v. 176, p. 3266-3276, 2006.

LI, X. C.; RAGHAVAN, M. Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 15, n. 4, p. 499-504, 2010.

LICHTERFELD, M.; WILLIAMS, K. L.; MUI, S. K. *et al.* T cell receptor cross-recognition of an HIV-1 CD8+ T cell epitope presented by closely related alleles from the HLA-A3 superfamily. **International Immunology**, v. 18, n. 7, p. 1179-1188, 2006.

LIMOU, S.; LE CLERC, S.; COULONGES, C. *et al.* Genomewide association study of an AIDS-nonprogression cohort emphasizes the role played by HLA genes (ANRS Genomewide Association Study 02). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 3, p. 419-426, 2009.

LIU, R.; PAXTON, W. A.; CHOE, S. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-377, 1996.

LOZANO, J. M.; LUQUE, J.; FRIAS, M.; RIVERO, A.; PEN, J. CD8(+)HLA-G(+) Regulatory T Cells Are Expanded in HIV-1-infected patients. **Viral Immunology**, v. 22, n. 6, p. 463-465, 2009.

MAGIEROWSKA, M.; THEODOROU, I.; DEBRÉ, P. *et al.* Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. **Blood**, v. 93, n. 3, p. 936-941, 1999.

MARTIN, M. P.; GAO, X.; LEE, J.H. *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nature Genetics**, v. 31, n. 4, p. 429-434, 2002.

MARTINSON, J. J.; CHAPMAN, N. H.; REES, D. C.; LIU, Y.-T.; CLEGG, J. B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nature Genetics**, v. 16, p. 100-103, 1997.

MATTE, C.; LAJOIE, J.; LACAÏLLE, J. *et al.* Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. **AIDS**, v. 18, n. 3, p. 427-431, 2004.

MATTHEWS, P. C.; ADLAND, E.; LISTGARTEN, J. *et al.* HLA-A*7401-mediated control of HIV viremia is independent of its linkage disequilibrium with HLA-B*5703. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5675-5686, 2011.

MEDEIROS, R. DE; JUNQUEIRA, D. M.; MATTE, M. C. C. *et al.* Co-Circulation HIV-1 Subtypes B, C, and CRF31_BC in a Drug-Naive Population From Southernmost Brazil: Analysis of Primary Resistance Mutations. **Journal of Medical Virology**, v.83, n. 10, p. 1682-1688, 2011.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, 2007.

MIGUELES, S. A.; SABBAGHIAN, M. S.; SHUPERT, W. L. *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. **PNAS**, v. 97, n. 6, p. 2709-2714, 2000.

- MINDEL, A.; TENANT-FLOWERS, M. Natural history and management of early HIV infection. **BMJ**, v. 322, p. 1290-1293, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV, 2008. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/recomendacoes-de-tratamento-consensos>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. UNGASS Brasil, 2010a. Disponível em: http://data.unaids.org/pub/Report/2008/brazil_2008_country_progress_report_en.pdf
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Antirretroviral em Gestantes, 2010b. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/recomendacoes-de-tratamento-consensos>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico DST/AIDS, 2011. Disponível em: http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/boletim_epidemiologico_2011
- MORETTA, L.; MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 5, p. 626-33, 2004.
- MORSICA, G.; BAGAGLIO, S.; GHEZZI, S. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) coinfection in a cohort of HIV positive long-term non-progressors: possible protective effect of infecting HCV genotype on HIV disease progression. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 2, p. 82-86, 2007.
- MORVAN, M.; WILLEM, C.; GAGNE, K. *et al.* Phenotypic and functional analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK cell subsets demonstrate differential regulation by Bw4 molecules and induced KIR3DS1 expression on stimulated NK cells. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 6727-6735, 2009.
- MOYLE, G. J.; WILDFIRE, A.; MANDALIA, S. *et al.* Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 6, p. 866-872, 2005.
- MUESING, M. A.; SMITH, D. H.; CABRADILLA, C. D. *et al.* Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. **Nature**, v. 313, n. 6002, p. 450-458, 1985.
- MUKOLO, A.; VILLEGAS, R.; ALIYU, M.; WALLSTON, K. A. Predictors of Late Presentation for HIV Diagnosis: A Literature Review and Suggested Way Forward. **AIDS and behavior**, 2012.
- NEIL, S.; BIENIASZ, P. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 9, p. 569-580, 2009.
- NICASTRI, E.; ANGELETTI, C.; PALMISANO, L. *et al.* Gender differences in clinical progression of HIV-1-infected individuals during long-term highly active antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 19, n. 6, p. 577-583, 2005.
- OKULICZ, J. F.; MARCONI, V. C.; LANDRUM, M. L. *et al.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 11, p. 1714-1723, 2009.
- OLAJOS, A.; SURÁNYI, P. The value of HLA-B27 typing in the diagnosis of early, oligosymptomatic spondylarthropathies. **British Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 2, p. 192, 1996.
- O'BRIEN, S. J.; NELSON, G. W. Human genes that limit AIDS. **Nature Genetics**, v. 36, n. 6, p. 565-574, 2004.
- O'CONNELL, K. A; BAILEY, J. R.; BLANKSON, J. N. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 12, p. 631-637, 2009.

PARHAM, P. Immunogenetics of killer-cell immunoglobulin-like receptors. **Tissue Antigens**, v. 62, p. 194-200, 2003.

PEDERSEN, C.; LINDHARDT, B. O.; JENSEN, B. L. *et al.* Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. **BMJ**, v. 299, n. 6692, p. 154-157, 1989.

PEREYRA, F.; ADDO, M. M.; KAUFMANN, D. E. *et al.* Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 4, p. 563-571, 2008.

PLANTIER, J. C.; LEOZ, M.; DICKERSON, J. E. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 871-872, 2009.

PRESTON, B. D.; POIESZ, B. J.; LOEB, L. A. Fidelity of HIV-1 Reverse Transcriptase, v.242, n. 4882, p.1168-1171, 1988.

RACAPE, J.; CONNAN, F.; HOEBEKE, J.; CHOPPIN, J.; GUILLET, J. G. Influence of dominant HIV-1 epitopes on HLA-A3/peptide complex formation. **PNAS**, v. 103, n. 48, p. 18208-18213, 2006.

RAMBAUT, A.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A.; HOLMES, E. C. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature Reviews**, v. 5, n. 1, p. 52-61, 2004.

RINALDO, C.; KINGSLEY, L.; NEUMANN, J. *et al.* Association of human immunodeficiency virus (HIV) p24 antigenemia with decrease in CD4+ lymphocytes and onset of acquired immunodeficiency syndrome during the early phase of HIV infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 880-884, 1989.

ROBERTSON, D. L.; ANDERSON, J. P.; BRADAC, J. A. *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-6, 2000.

ROBINSON, J.; MISTRY, K.; MCWILLIAM, H. *et al.* The IMGT/HLA database. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database issue, p. 1171-1176, 2011.

RODRÍGUEZ-NÓVOA, S.; CUENCA, L.; MORELLO, J. *et al.* Use of the HCP5 single nucleotide polymorphism to predict hypersensitivity reactions to abacavir: correlation with HLA-B*5701. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1567-1569, 2010.

ROUAS-FREISS, N.; PAUL, P.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. HLA-G promotes immune tolerance. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 14, n. 2, p. 93-98, 2000.

SAJADI, M. HIV-1 natural viral suppressors: control of viral replication in the absence of therapy. **Retrovirology**, v. 12, p. 5-7, 2006.

SALGADO, M.; SIMÓN, A.; SANZ-MINGUELA, B. *et al.* An additive effect of protective host genetic factors correlates with HIV nonprogression status. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 56, n. 4, p. 300-305, 2011.

SANTOS, A. F.; SOARES, M. A. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. **Viruses**, v. 2, n.2, p. 503-531, 2010.

SCHNEIDEWIND, A.; BROCKMAN, M. A.; YANG, R. *et al.* Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. **Journal of Virology**, v. 81, n. 22, p. 12382-12393, 2007.

SCHNEIDEWIND, A.; BRUMME, Z. L.; BRUMME, C. J. *et al.* Transmission and long-term stability of compensated CD8 escape mutations. **Journal of Virology**, v. 83, n. 8, p. 3993-3997, 2009.

- SCHWARTZ, O.; MARÉCHAL, V.; LE GALL, S.; LEMONNER, F.; HEARD, J.M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by Nef protein. **Nature Medicine**, v. 2, n. 3, p. 338-342, 1996.
- SCHWARTZ, S. A; NAIR, M. P. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, n. 3, p. 295-305, 1999.
- SHANKARKUMAR, U.; PAWAR, A.; GHOSH, K.; BAJPAI, S.; PAZARE, A. Human leucocyte antigen class II DRB1 and DQB1 associations in human immunodeficiency virus-infected patients of Mumbai, India. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, n. 3, p. 199-204, 2010.
- SILVA, E.M.; ACOSTA, A.X., SANTOS, E.J.M. et al. HLA-Bw4-B*57 and Cw*18 alleles are associated with plasma viral load modulation in HIV-1 infected individuals in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p.468–475, 2010.
- SINGH, P.; KAUR, G.; SHARMA, G.; MEHRA, N. K. Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression. **Vaccine**, v. 26, n. 24, p. 2966-2980, 2008.
- SZWARCWALD, C. L.; BARBOSA-JÚNIOR, A.; PASCOM, A. R.; SOUZA-JÚNIOR, P. R. DE. Knowledge, practices and behaviours related to HIV transmission among the Brazilian population in the 15-54 years age group, 2004. **AIDS**, v. 19, p. 51-58, 2005.
- SÁEZ-CIRIÓN, A.; LACABARATZ, C.; LAMBOTTE, O. et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. **PNAS**, v. 104, n. 16, p. 6776-6781, 2007.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 75-86, 2009.
- TANG, J; COSTELLO, C.; KEET, I. P. *et al.* HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 15, n. 4, p. 317-324, 1999.
- THIBODEAU, V.; LAJOIE, J.; LABBÉ, A.-C. *et al.* High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. 1-6, 2011.
- THOMAS, R.; APPS, R.; QI, Y. *et al.* HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1290-1294, 2009.
- TOULOUMI, G.; HATZAKIS, A. Natural history of HIV-1 infection. **Clinics in Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 389-399, 2000.
- TRACHTENBERG, E. A.; ERLICH, H. A. A Review of the Role of the Human Leukocyte Antigen (HLA) System as a Host Immunogenetic Factor Influencing HIV Transmission and Progression to AIDS. **In HIV Molecular Immunology 2001**. Edited by Korber BTK, Brander C, Haynes BF, Moore JP, Koup RA, Kuiken C, Walker BD, Watkins DI. Theoretical Biology and Biophysics Group; p. 43-60, 2001.
- TRACHTENBERG, E.; KORBER, B.; SOLLARS, C. et al. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 928-935, 2003.
- UNAIDS. Global HIV/AIDS Response , 2011 Disponível em:
http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/hiv_full_report_2011.pdf
- VAN MANEN, D.; KOOTSTRA, N. A.; BOESER-NUNNINK, B. *et al.* Association of HLA-C and HCP5 gene regions with the clinical course of HIV-1 infection. **AIDS**, v. 23, n. 1, p. 19-28, 2009.

- VARGAS, A. E.; MARRERO, A. R.; SALZANO, F. M.; BORTOLINI, M. C.; CHIES, J. A. B. Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 321-325, 2006.
- VARGAS, R. G.; SARTURI, P. R.; MATTAR, S. B. *et al.* Association of HLA-G alleles and 3'UTR 14bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. **Human Immunology**, v. 72, n. 6, p. 479-85, 2011.
- VEIT, T. D.; CHIES, J. A. B. Tolerance versus immune response - microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transplant Immunology**, v. 20, n. 4, p. 229-231, 2009.
- VIANNA, P.; DALMÁZ, C. A.; VEIT, T. D. *et al.* Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. **Human Immunology**, v. 68, n. 8, p. 668-674, 2007.
- WILLBERG, C. B.; GARRISON, K. E.; JONES, R. B. *et al.* Rapid progressing allele HLA-B35 Px restricted anti-HIV-1 CD8+ T cells recognize vestigial CTL epitopes. **PloS One**, v. 5, n. 4, p. e10249, 2010.
- WILLIAMS, A. P.; BATEMAN, A. R.; KHAKOO, S. I. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. **Mol Interv**, v. 5, n. 4, p. 226-240, 2005.
- YOON, W.; MA, B. J.; FELLAY, J. *et al.* A polymorphism in the HCP5 gene associated with HLA-B*5701 does not restrict HIV-1 in vitro. **AIDS**, v. 24, n. 1, p. 156-157, 2010.

Anexos

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^{1,2}, Rúbia Marília de Medeiros^{1,2}, Dennis Maletich Junqueira^{1,2}, Leonardo Augusto Luvison Araújo¹, José Artur Bogo Chies², Cynara Nunes Carvalho³, Marineide Gonçalves de Melo⁴, Breno Riegel Santos⁴, Luiz Fernando Job Jobim², Maria Lucia Rossetti¹.

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 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 _____

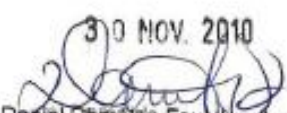
Nome do Pesquisador: _____ Assinatura do Pesquisador: _____

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

QUESTIONÁRIO

Projeto: “**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE PACIENTES INFECTADOS COM HIV-1**”

1. Nome do Paciente: _____
2. Data de Nascimento: ____ / ____ / ____
3. Sexo: () Masculino () Feminino
4. Município de Residência: _____
5. Estado Civil: () Solteiro () Casado () Acompanhado
6. Etnia (auto-declaração): () Branco () Não-branco
7. Profissão: _____ Em atividade: () Sim () Não
8. Escolaridade: _____
9. Data da última sorologia negativa para HIV: ____ / ____ / ____
10. Data da primeira sorologia positiva para HIV: ____ / ____ / ____
11. Possível forma de Transmissão:
() Heterossexual () HSH () UDI () Transfusão sanguínea ou Transplante
() Transmissão vertical (Materno fetal) () Outro. Qual? _____
12. Gestante: () Sim () Não
13. Fumo: () Sim () Não
14. Uso de Álcool: () Sim () Não
15. Uso de drogas: () Sim () Não Se sim, qual? _____
16. Comorbidades e Coinfecções:
() Diabetes () Cardiopatia () Hemodiálise () Hepatite B () Hepatite C
() HTLV () Tuberculose () Outras DST, qual? _____
17. Viajou para o exterior: () Sim () Não
18. Continentes do Exterior:
() África () Europa () Ásia () América do Sul () América do Norte
19. Teve contato sexual/drogas injetáveis no exterior: () Sim () Não
Onde? _____
20. Teve contato sexual/drogas injetáveis com estrangeiros no Brasil:
() Sim () Não Se sim, qual a origem do contato? _____
21. Tem alguma doença crônica ou histórico familiar deste tipo de doença? Se sim, qual?

22. Tem alguma doença auto-imune ou histórico familiar? Se sim, qual?



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Trico, 596
CEP 91350-200 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357-2000
CNPJ: 02.787.116/0001-20

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

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Ribbes, 20
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357-4100
CNPJ: 02.787.126/0001-76

HOSPITAL FÉMINA S.A.
Rua Mesquita, 17
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3314-2000
CNPJ: 02.693.134/0001-63



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.

Porto Alegre, 30 de novembro de 2010.

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



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

Av Ipiranga 5400, Prédio Administrativo.
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS
e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CEP/FEPPS-RS Nº: 13/2010

PROCESSO Nº: 002964-20.69/ 10-5

PROJETO PADCT Nº: 12/2010

Deliberação conforme reunião realizada em: (27/09/2009)

Título do Projeto:

**“AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PACIENTES INFECTADOS COM HIV-1”.**

Nome do pesquisador principal:

Sabrina Esteves de Matos Almeida

PARECER	
<input checked="" type="checkbox"/>	APROVADO
<input type="checkbox"/>	APROVADO COM RECOMENDAÇÕES
<input type="checkbox"/>	NECESSITA DE ADEQUAÇÕES
<input type="checkbox"/>	NÃO APROVADO

PARECER DO COMITÊ:

O Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS/RS em reunião do dia 27/09/2010, Ata nº 13/2010, que o presente projeto está adequado ética e metodologicamente de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Res.196/96/CNS e suas complementares) e portanto, **aprovado** por este Comitê.

Reiteramos que relatórios semestrais do projeto em andamento, relatório final e cópia do trabalho de conclusão e/ou publicação deverão ser entregues ao Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS.

Porto Alegre, 27 de setembro de 2010.


Maria da Graça Boucinha Marques
Coordenadora CEP-FEPPS/RS



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110478

Data da Versão do Projeto: 11/10/2011

Pesquisadores:

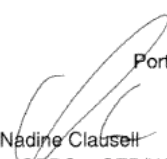
JOSÉ ARTUR BOGO CHIES
MARIANA DE SAMPAIO LEITE JOBIM WILSON
SABRINA ESTEVES DE MATOS ALMEIDA
MARIA CRISTINA COTTA MATTE
BRENO RIEGEL SANTOS
PAMELA PORTELA DA SILVA
LUIZ FERNANDO JOB JOBIM

Título: ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES KIR E HLA E SUA INFLUÊNCIA NA PROGRESSÃO DE INDIVÍDUOS HIV SOROPOSITIVOS PARA AIDS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 31 de outubro de 2011.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA