

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

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES
ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE INATA DE
PACIENTES INFECTADOS COM HIV-1 E SUA INFLUÊNCIA
NA PROGRESSÃO À AIDS**

Rúbia Marília de Medeiros

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

INSTITUIÇÕES E FINANCIAMENTO

Instituições executoras:

- Laboratório de Imunogenética
Departamento de Genética - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT)
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS)

Instituições colaboradoras:

- Laboratório de Genética Humana
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)
- Serviço de Infectologia
Grupo Hospitalar Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre (GHC)

Agência de Financiamento:

- CNPq

"It takes all the running you can do, to keep in the same place."
Alice Through the Looking Glass – Lewis Carroll

AGRADECIMENTOS:

.....

Gostaria de agradecer imensamente...

Aos meus pais Lilia e Jaci pelo incentivo e apoio, desde o início dos tempos;

Aos meus irmãos Liliane, Junior, Maria e Carla pela companhia e exemplo;

Aos meus sobrinhos João Vitor, Júlia e Lívia pela alegria;

Ao meu amor Hélder pela confiança, força e atenção;

As minhas amigas de “infância” (Aline, Elis, Luane, Lu, Lis e Pri) e aos amigos da “Bio” (Andrya, Ju, Jami, Pedro, Gabriel, Gui e Gustavo) pela compreensão e infinita paciência;

Ao Dennis por sempre me inspirar e ensinar com carinho;

A Maria Cristina por ter participado tão intensamente da minha vida nos 2 últimos anos;

A todo o pessoal do CDCT, em especial a Re, a Raquel e a Lu; e ao restante do “grupo HIV”, Leo, Tales e Tiago pelo incentivo e companheirismo;

Ao pessoal do Lab de Imunogenética, em especial ao Bruno e a Gabriela pelo “início”;

Ao Serviço de Infectologia do GHC pelo aprendizado;

Ao Zeca e a Sabrina por tornarem o meu crescimento profissional possível;

E, enfim, a ciência por preencher de forma tão linda a minha vida.

Obrigada!

SUMÁRIO

.....

06	ABREVIATURAS
08	RESUMO
09	ABSTRACT
10	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO
10	1.1. AIDS
11	1.2. A replicação
13	1.3. A infecção
16	1.4. A progressão à AIDS
17	1.5. Variabilidade genética
19	1.6. Resposta imune inata
21	1.7. MBL
26	1.8. TLRs
34	CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVA
35	CAPÍTULO 3: OBJETIVO
36	CAPÍTULO 4: MANUSCRITO
37	Abstract
38	Introduction
39	Methods
42	Results
44	Discussion
49	References
54	Tables
58	Figures
60	Legends
61	CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO
64	CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS
65	REFERÊNCIAS

ABREVIATURAS

.....

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> (Quimiocina CCL5)
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i> (Receptor de quimiocinas tipo CC5)
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i> (Molécula de diferenciação 4)
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i> (Molécula de diferenciação 8)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Prevenção e Controle de Doenças)
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (Receptor de quimiocinas tipo CXC4)
DC	<i>Dendritic Cell</i> (Células dendríticas)
DC-SING	<i>(Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)</i> (Células dendríticas com receptores de adesão de superfícies SING)
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
HAART	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i> (Terapia Antirretroviral Altamente Ativa)
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> (Virus da hepatite B)
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> (Virus da hepatite C)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Virus da Imunodeficiência Humana)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
IFN	<i>Interferon</i> (Interferon)
IL-1	<i>Interleukin-1</i> (Interleucina-1)
IL-6	<i>Interleukin-6</i> (Interleucina-1)
NRTI	<i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i> Inibidor Não Análogo de Nucleotídeo da Transcriptase Reversa

NNRTI	<i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i> Inibidor Análogo de Nucleotídeo da Transcriptase Reversa
PI	<i>Protease Inhibitor</i> Inibidor de Protease
IRAK1	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1</i> (Receptor tipo interleucina-1 associado a kinase 1)
IRAK4	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4</i> (Receptor tipo interleucina-1 associado a kinase 4)
IRF7	<i>Interferon Regulatory Factor 7</i> (Fator Regulatório de Interferon 7)
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i> (Regiões repetidas ricas em leucinas)
LTNPs	<i>Long-Term NonProgressors</i> (Não progressores por longo tempo)
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> (Regiões terminais repetidas longas)
MASP	<i>Mannan-binding lectin serine protease</i> (Protease do tipo serina de ligação a manose)
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i> (Proteína de ligação a manose)
mDC	<i>Myeloid Dendritic Cell</i> (Célula dendrítica mielóide)
My-D88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response gene 88</i> (Fator mielóide de diferenciação 88)
NF-κB	<i>Nuclear Factor - kappa Beta</i> (Fator Nuclear kappa beta)
PAMPS	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (Padrões moleculares associados a antígenos)
pDC	<i>Plasmacytoid Dendritic Cell</i> (Célula dendrítica plasmocítica)
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i> (Receptores de padrões de reconhecimento)
RNA	<i>Rybonucleic Acid</i> (Ácido ribonucléico)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Substituições de base única)
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i> (Receptores do tipo <i>Toll-like</i>)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
UNAIDS	<i>United Nations Programme on HIV/AIDS</i> (Programa das Nações Unidas para HIV/AIDS)

RESUMO:

.....

Variações em genes de resposta imune têm sido associadas com a progressão à AIDS. Após a infecção pelo HIV a proteína sérica MBL é capaz de reconhecer N-glicanos presentes na glicoproteína viral gp120. Além disso, TLRs reconhecem diferentes moléculas antigênicas do vírus presentes no interior da célula, como o ssRNA viral reconhecido pelo TLR7 e o DNA proviral reconhecido pelo TLR9. O presente estudo investigou a influência de polimorfismos nos genes *MBL2*, *TLR7* e *TLR9* na progressão à AIDS em uma população com ancestralidade Europeia e Africana. A partir da investigação retrospectiva de 3.300 prontuários médicos de pacientes HIV+ em atendimento regular, 107 indivíduos foram classificados quanto à progressão para a AIDS (20 progressores rápidos, 29 progressores lentos e 58 outros). Através de técnicas de biologia molecular, polimorfismos na região promotora (H/L, rs11003125 e X/Y, rs7096206) e no exon-1 (R52C, rs5030737; G54D, rs1800450; G57E, rs1800451) do gene *MBL2* foram determinados, assim como do gene *TLR7* (Gln11Leu, rs179008) e do gene *TLR9* (T-1237C, rs5743836 e G1635A, rs352140). Para avaliar a influência dos genótipos na progressão para AIDS, testes estatísticos como Análise de Sobrevivência (Kaplan-meier), regressão de Cox e regressões logísticas binárias foram realizados; além disso, a presença dos alelos CCR5del32 e HLA27/HLA57 foram utilizados como fator de correção. Foram observadas diferenças significativas na composição étnica dentro das categorias de progressão, 58,6% dos pacientes com progressão lenta eram Afrodescendentes ($p < 0,05$). A Análise de Sobrevivência para o polimorfismo -1237T/C no *TLR9* revelou uma associação significativa entre os portadores do alelo C e um tempo mediano maior (10 anos) de progressão à AIDS, quando comparado com os portadores do alelo A (6 anos). Além disso, esta associação também foi reproduzida na regressão multivariada de Cox (0,616 Hz, 95% CI 0,379-1,003, $p < 0,05$), incluindo idade e etnia como variáveis. No entanto, ajustando o modelo para a presença dos alelos CCR5del32 e HLA-B27/57 a associação foi perdida. Já para o polimorfismo +1635G/A no *TLR9*, ao analisar a variação dentro dos grupos étnicos, encontramos uma associação significativa do alelo A com a progressão rápida para AIDS em Eurodescendentes. Nenhum resultado significativo foi encontrado para as variantes investigadas nos genes *TLR7* e *MBL2*. Nossos resultados sugerem que o *background* genético é importante na progressão à AIDS, embora todos os genes e variantes responsáveis por este comportamento ainda não estejam identificados. Além disso, os dados indicam uma relação entre os polimorfismos -1237T/C e +1635G/A no gene *TLR9* e progressão para a AIDS.

ABSTRACT:

.....

Variations in innate immune response genes have been associated with different AIDS progression. In HIV infection MBL (mannose-binding lectin) recognizes N-glycans present in the viral glycoprotein gp120, and TLRs (toll-like receptors) recognizes different HIV molecules present inside the infected cell; ie TLR7 recognizes to viral RNA and TLR9 to proviral DNA. The present study investigated the influence of *MBL2*, *TLR7* and *TLR9* polymorphisms in AIDS progression in a population with European and African ancestry in patients from Southernmost Brazil. From 3,300 medical records of HIV+ patients, 107 were classified according to AIDS progression (20 rapids, 58 chronics and 29 slows AIDS progressors). Promoter region (H/L, rs11003125 e X/Y, rs7096206) and exon-1 region (R52C, rs5030737; G54D, rs1800450; G57E, rs1800451) polymorphisms in the *MBL2* gene were determined, as well as in *TLR7*(Gln11Leu, rs179008) and *TLR9* (T-1237C, rs5743836 e G1635A, rs352140). To evaluate the influence of genotypes in the progression to AIDS, statistical tests as Survival Analysis, Cox regression and binary logistic regressions were performed. Significant differences were observed in the ethnic composition within progression categories, 58.6% of slow-AIDS progressors patients were African-derived ($p<0.05$). Kaplan-Meier curves applied to polymorphism -1237T/C in *TLR9* revealed a significant association between C allele carriers and longer time (10 years) for AIDS progression when compared with A allele carriers (6 years). Moreover, this association was also reproduced in the multivariate Cox regression (0.616 Hz, 95% CI 0.379 to 1.003, $p <0.05$), including age and ethnicity as variables. However, adjusting the model to the presence of the alleles CCR5del32 and HLA-B27/57 the association was lost. For the polymorphism +1635G/A in *TLR9* gene, when analyzing the variation within ethnic groups, an statistically significant association of allele A (1.966 HZ, 95% CI 1.052 3.674, $p<0.05$) with rapid AIDS progression was observed in European-derived patients. No significant results for *MBL2* and *TLR7* polymorphism and AIDS progression were shown. Our data highlights a relationship between the investigated polymorphisms in TLR9 gene and progression to AIDS. In addition, the results suggests the genetic background is important in HIV-1 infection, although several genes and variants responsible by this behavior remain to be identified.

Capítulo 1: Introdução

.....

1.1 AIDS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ficou conhecida mundialmente em 1981, quando o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC-EUA) relatou inexplicáveis ocorrências de doenças oportunistas em jovens americanos (Montagnier, 2002). Em 1983, o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foi isolado de um paciente com linfadenopatia; e, em 1983, demonstrou-se em definitivo que este era o agente etiológico da AIDS (Gallo et al., 1983; Montagnier, 2002). Na verdade, a AIDS é um conjunto de sintomas e infecções resultantes do dano específico do sistema imunológico ocasionado pelo HIV (Haynes, Pantaleo, & Fauci, 1996), atualmente, é uma das principais causas de mortalidade por doenças infecciosas em todo o mundo.

Segundo a UNAIDS, existem aproximadamente 33,3 milhões de pessoas infectadas pelo HIV no mundo; sendo a África responsável por 68% de todos os casos (UNAIDS, 2011). Outros continentes também apresentam números preocupantes - existem 5 milhões de infectados na Ásia; 1,5 milhões na América do Norte; 1,4 milhões no Leste Europeu e 1,4 milhões na América Latina (UNAIDS, 2010).

No Brasil, desde 1988, já foram registrados mais de 217.091 mil óbitos em consequência desta epidemia, e segundo estimativas do Ministério da Saúde, existem hoje 630 mil indivíduos infectados pelo HIV no país (DST E AIDS, 2011). A prevalência é de 0,61% entre pessoas na faixa etária de 15 a 49 anos, e quando analisada por gênero a prevalência é de 0,41% em mulheres e de 0,82% em homens. A razão de casos de AIDS entre homens e mulheres, que era de 15:1 em 1986, passou para 1,5:1 em 2009, demonstrando uma tendência de equilíbrio entre os sexos.

Enquanto a taxa de incidência de novos casos da doença no Brasil encontra-se estável desde o ano de 2002, na região Sul o número de novos casos voltou a crescer a partir de 2006 (DST E AIDS, 2011). O Rio Grande do Sul apresenta um dos maiores percentuais de casos de AIDS do país, com o maior número de pacientes em uso da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, *Highly Active Antiretroviral Therapy*) e o maior número de pacientes em acompanhamento. São 99,8 casos a cada 100 mil

habitantes, sendo 15 mil concentrados em Porto Alegre. Logo atrás da capital, encontra-se Alvorada, Uruguaiana, Sapucaia do Sul e Canoas.

1.2 HIV

O HIV é um retrovírus, da família Lentiviridae (Levy, 1993). Pertencente ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogênicos, ele necessita de uma enzima denominada transcriptase reversa (RT) para sua multiplicação. A RT é responsável pela retrotranscrição do RNA viral em cDNA (provírus), o qual é posteriormente inserido no genoma humano (Taylor & Hammer, 2008).

O HIV é morfológicamente formado por um envelope lipoprotéico e um nucleocapsídeo contendo duas fitas de RNA, onde estão dispostas as informações genéticas (Rambaut et al, 2004). Seu genoma é composto por três regiões gênicas: GAG (região codificadora de proteínas da matriz), POL (região que codifica as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase) e ENV (região que codifica proteínas do envelope) (Taylor & Hammer, 2008). Existem também dois genes regulatórios (TAT e REV) e quatro genes acessórios (NEF, VIF, VPR, VPU) (Rambaut et al., 2004), os quais são responsáveis por adaptações virais para a sobrevivência do vírus no hospedeiro.

O envelope do HIV possui cerca de 50% de sua massa composta por glicanos, ou seja, polissacarídeos formados a partir de ligações o-glicosídicas (Go et al., 2008). Acredita-se que por se tratar de um fator determinante na mediação da entrada viral e fusão nas células hospedeiras, as alterações nos locais de glicosilação, observadas ao longo da infecção, são uma evolução eficaz contra a neutralização por anticorpos a fim de escapar da resposta imune (Go et al., 2008)

O ciclo de infecção e replicação do HIV pode ser didaticamente dividido em seis fases: (i) interação e entrada; (ii) desmantelamento; (iii) transcrição reversa; (iv) integração do provírus (v) síntese de proteínas e montagem e (vi) brotamento (Figura 01) (Rambaut et al., 2004).

Inicialmente, o processo de infecção da célula hospedeira pelo HIV envolve a interação entre a proteína viral gp120 e as moléculas receptoras e co-receptoras da célula hospedeira, CD4 e CCR5 ou CXCR4 respectivamente (Fanales-Belasio et al, 2010). As moléculas de CD4 são glicoproteínas presentes na membrana de algumas células do sistema imune. Após utilizar o CD4 como receptor primário, o HIV interage

com os receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4, que se comportam como co-receptores virais (Dragic et al., 1996). O CCR5 é uma proteína codificada pelo gene CCR5, pertencente à família dos receptores de beta-quimiocinas; já o CXCR4 pertence à família de receptores alfa-quimiocina. As interações entre o vírus e as moléculas receptoras e co-receptoras permitem a fusão e consequentemente a entrada do capsídeo viral na célula, através de um processo de múltiplas etapas (Fanales-Belasio et al., 2010; Schwartz et al, 2006).

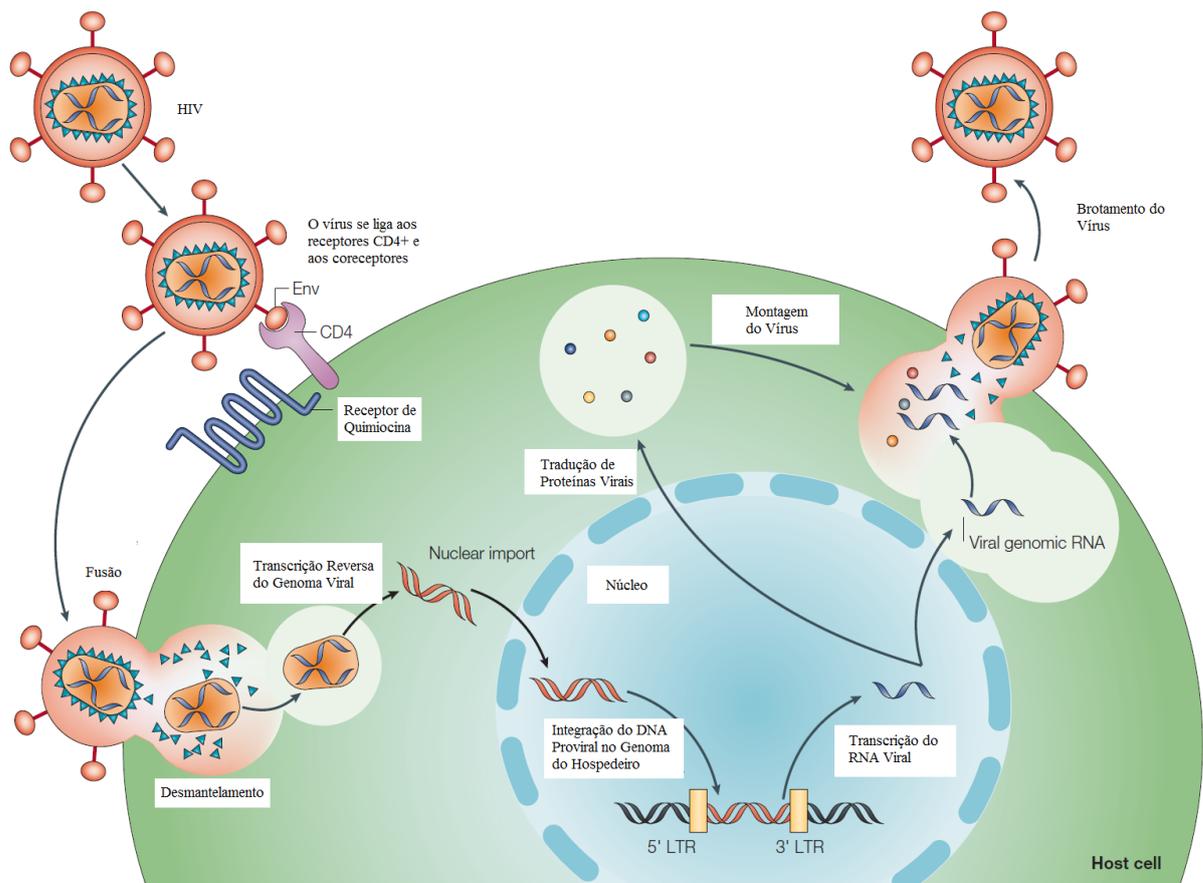


Figura 1: Esquema dos principais aspectos do ciclo replicativo do HIV (Adaptado de Rambaut et al, 2004).

Após a entrada na célula o capsídeo viral sofre o desmantelamento liberando o RNA viral e dando início ao processo de retrotranscrição. O produto final da transcrição reversa é uma molécula de DNA dupla-fita (Charneau et al., 1994) que será integrada randomicamente ao genoma humano. Além disso, os processos de transcrição iniciais dos genes provirais resultam na síntese de proteínas virais regulatórias TAT e REV (Fanales-Belasio et al., 2010).

RNAs virais codificantes migram para o citoplasma, onde proteínas para novos vírions serão sintetizadas. Próximo a superfície interna da membrana plasmática da

célula hospedeira duas moléculas de RNAs se associam às enzimas virais, enquanto proteínas do capsídeo se associam a estes formando o nucleocapsídeo. A partir daí, iniciará o brotamento, processo de saída da partícula viral da célula (Levy, 1993; Schwartz & Nair, 1999).

1.3 A infecção pelo HIV e a aids

Diferentes tipos celulares podem ser infectados pelo HIV, basta que as células expressem em sua superfície as proteínas do tipo CD4, CCR5 e/ou CXCR4 (Levy, 1993). As primeiras células infectadas pelo vírus geralmente são as células dendríticas (DC) encontradas em vários tecidos humanos, entre eles a mucosa do trato genital e a mucosa anal, principais portas de entrada utilizadas pelo HIV (Wu & RamaniKewal, 2006). Em seguida, as células dendríticas, “conduzem” o vírus aos linfonodos onde ocorre a infecção dos linfócitos T CD4+ (células T-CD4+), principais alvos celulares do HIV e fundamentais para a coordenação das defesas do organismo (Brenchley & Douek, 2008). As DCs são capazes de realizar a transfeção do HIV até as células T, pois o vírus liga-se ao receptor do tipo lectina presente na membrana celular e é internalizado mantendo-se intacto até a passagem para um linfócito T CD4+ presente nos linfonodos (Hladik & McElrath, 2008).

O tecido linfoide (especialmente linfonodos e placa de Peyer no intestino) é o ambiente propício para o vírus replicar-se rapidamente, pois nesses tecidos além da grande concentração de células T CD4+ há abundante produção de citocinas pro-inflamatórias (Brenchley & Douek, 2008). O vírus se beneficia da expressão de citocinas como IL-1 e TNF- α , as quais são capazes de estimular a replicação viral através da ativação de mensageiros secundários que se ligam à região LTR do HIV, como o fator de transcrição NF- $\kappa\beta$ (Borrow & Bhardwaj, 2008). A presença do provírus no genoma de células T nos linfonodos é até 10 vezes mais frequente do que em células mononucleares no sangue, tornando estes tecidos os principais reservatórios virais e o local de maior destruição de linfócitos T CD4+ (Hladik & McElrath, 2008).

Clinicamente a infecção pelo HIV pode ser dividida em três fases: infecção aguda, infecção crônica e AIDS (Figura 2) (Costin, 2007). A história natural da infecção aguda caracteriza-se tanto por uma carga viral elevada, como por uma resposta imune intensa. Durante o primeiro pico de viremia, ocorre a rápida diminuição do número de linfócitos T-CD4+ que posteriormente volta a aumentar, no entanto geralmente não

retornando aos níveis prévios à infecção (O'Brien et al., 1996). Observa-se, também, aumento do número absoluto de linfócitos T-CD8+ circulantes com a inversão da relação células T CD4+/CD8+ (Schechter & Rachid, 2005). Este aumento de células T-CD8+ reflete uma resposta T citotóxica potente, que é detectada antes mesmo do aparecimento de anticorpos neutralizantes. Durante esta fase, a maior causa de depleção das células T CD4+ se deve a resposta citotóxica das células T CD8+ e a morte programada desencadeada por mecanismos endógenos (McMichael & Rowland, 2001). Existem evidências de que a imunidade celular, mediada por células T CD4+/CD8+, desempenha papel fundamental no controle da viremia na infecção primária (Chakrabarti & Simon, 2010).

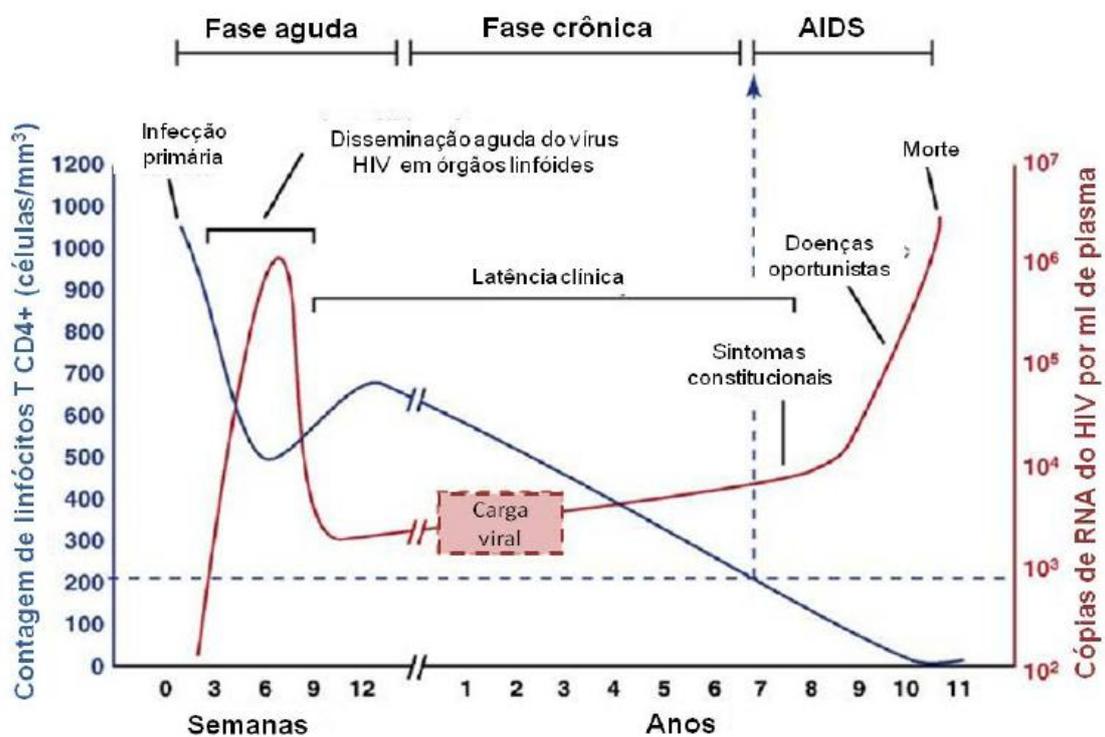


Figura 2: Fases clínicas da infecção pelo HIV – progressão para AIDS (Adaptado de An e Winkler, 2010).

Após a resolução da infecção aguda, inicia-se a fase crônica, quando ocorre a estabilização da viremia em níveis variáveis (os chamados *set points virais*) e da queda da contagem de linfócitos T-CD4+ (O'Brien, et al 1996). Esse quadro está diretamente relacionado à velocidade da replicação viral e conseqüentemente à progressão para a AIDS (O'Brien et al, 1996; Schechter & Rachid, 2005). A infecção crônica inicia-se assintomática, porém gradativamente a infecção progride e o indivíduo começa a

apresentar sinais e sintomas de intensidade variável (Levy, 1993). Nas fases mais tardias da infecção crônica, além da ativação imune generalizada a depleção de células T CD4+ se dá pela perda gradual da capacidade do organismo para gerar novas células T CD4+ (Costin, 2007).

No estágio de AIDS, as células T-CD4+ geralmente estão abaixo do nível crítico de 200 células/mm³, dosagem esta que remete o paciente a uma resposta imunitária ineficaz a patógenos invasores, permitindo o estabelecimento de doenças oportunistas (Costin, 2007). Doenças como pneumonias causadas por *Pneumocystis carinii*, infecções na orofaringe por *Candida* spp., tuberculose pulmonar e extrapulmonar causadas por *Mycobacterium* spp., infecções virais por herpes simplex e citomegalovírus são comuns, e são utilizados como indicadores de imunossupressão acentuada (Levy, 1993). Neste período recomenda-se o início do tratamento antirretroviral, com intuito de inibir a replicação viral e conseqüentemente, restaurar os níveis de T-CD4+, aumentando a sobrevida do paciente (Fauci, 2003). O tempo que transcorre desde a infecção até a AIDS varia consideravelmente entre os indivíduos (Paroli et al., 2001; Schechter & Rachid, 2005).

Com o surgimento da terapia antirretroviral altamente ativa o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes HIV positivos melhoraram muito. O uso do esquema HAART inibe a replicação do HIV, reduzindo a presença do RNA viral no plasma a níveis indetectáveis e prolongando a sobrevida do paciente (Fauci, 2003). No entanto, o esquema apresenta muitos efeitos adversos; além disso, a aderência do paciente ao tratamento, por diversos fatores, é difícil. O vírus permanece latente nas células T de memória, integrado no genoma do hospedeiro, constituindo uma fonte para potencial reativação se os fármacos forem interrompidos (Finzi et al, 1997). Uma combinação de HAART típica envolve dois inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INRT) e um inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa (INNRT) ou um inibidor de protease (IP) (Fauci, 2003).

O Brasil foi um dos primeiros países a garantir o acesso universal e gratuito aos medicamentos antirretrovirais pelo Sistema Único de Saúde (SUS), a partir de 1996 (Reis, 2007). Uma importante estratégia da Política de Medicamentos do Programa Nacional de DST e AIDS estabeleceu recomendações técnicas consensuais para a utilização desses medicamentos (Programa Nacional de DST e Aids., 2008). Segundo as diretrizes do Ministério da Saúde o início de tratamento antirretroviral é recomendado para pacientes HIV positivos com sintomatologia de AIDS, ou ainda, indivíduos

assintomáticos com medidas recorrentes de células T CD4+ abaixo de 350-200cells/mm³; carga viral elevada persistente, independentemente dos níveis T-CD4+ e indivíduos com hepatite C ou B crônica (Programa Nacional de DST e Aids, 2008).

1.4 A progressão à AIDS

Após a infecção pelo HIV, o tempo e a maneira como os indivíduos progredem para AIDS são extremamente variáveis. Logo após as primeiras descobertas a respeito da imunodeficiência adquirida observou-se que uma pequena parcela dos infectados mantinha o controle da replicação viral e/ou não apresentava sintomas clínicos na ausência de terapia antirretroviral (Levy, 1993; Schechter & Rachid, 2005). Nos últimos 30 anos, uma variedade de definições tem sido proposta para categorizar estes indivíduos, os primeiros estudos utilizavam a estabilidade na contagem das células T CD4+ e o tempo que o paciente HIV+ permanecia livre de sintomas (Fauci et al., 2003). Com o passar do tempo, o avanço em técnicas de acompanhamento clínico, como a quantificação da carga viral, possibilitaram uma maior compreensão sobre medidas de progressão para AIDS (Casado et al., 2010).

Atualmente, os pacientes infectados pelo HIV que seguem o curso normal da infecção são conhecidos como progressores crônicos ou típicos. Esses indivíduos representam a maioria da população soropositiva e desenvolvem uma infecção sintomática, iniciando o tratamento antirretroviral entre o 3º e 10º ano após a soroconversão (Schechter & Rachid, 2005). Além disso, possuem no mínimo três determinações de viremias, na ausência da terapia antirretroviral, com *set point* acima de 2000 cópias/mL (Casado et al., 2010). Já uma pequena parcela da população infectada desenvolve uma infecção sintomática diferenciada, que pode ser considerada como uma progressão lenta (mais de 10 anos) ou rápida (menos de três anos) (Ockulicz et al., 2009).

Os indivíduos conhecidos como progressores lentos ou *long-term non-progressors* (LTNPs) parecem controlar o vírus de forma natural (Migueles & Connors, 2010; Paroli et al., 2001). Estes pacientes possuem diferentes valores de carga viral; porém, apresentam como características comuns a habilidade de manter níveis elevados de células T-CD4+ e sem sintomatologias de AIDS na ausência da terapia antirretroviral (Deeks & Walker, 2007; Okulicz et al., 2009; O'Connell et al., 2009). Diversas definições já foram propostas para classificar os progressores lentos de acordo com seus

valores de carga viral; mas, até o momento, não existe um consenso. Um estudo publicado recentemente por Casado *et al.* (2010), propôs a divisão dos LTNPs em três categorias (controladores de elite, controladores da viremia e não-controladores da viremia. Segundo o mesmo autor, os pacientes progressores lentos correspondem entre 5 a 15% da população infectada pelo HIV. Além dos progressores lentos, existem indivíduos que desenvolvem uma progressão rápida para AIDS. Estes pacientes apresentam duas ou mais medidas consecutivas de células T-CD4+ abaixo de 350cél/mm³ em até três anos após a soroconversão e/ou iniciam a terapia antirretroviral neste período (Casado et al., 2010).

Os estudos de coorte observacionais em que indivíduos são monitorados do momento da soroconversão ao desfecho AIDS têm contribuído para a ampliação do conhecimento a respeito da história natural da infecção pelo HIV (An & Winkler, 2010; O'Brien & Nelson, 2004; van Manen et al., 2011). Em nosso país são raros os estudos de coorte de indivíduos infectados pelo vírus antes de desenvolverem a AIDS. Contudo, existe atualmente mais de 20 coortes internacionais, concentradas principalmente em populações dos Norte Americanas (Estados Unidos) e Europeias (França, Holanda, Alemanha, Itália, Suíça, Reino Unido, Espanha, etc.) o que dificulta as extrapolações dos resultados encontrados frente à diversidade genética da população humana.

1.5 Variabilidade genética do hospedeiro e o HIV

Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos nos diferentes tipos de progressão, diversos estudos investigam o quanto fatores virais podem contribuir para a progressão da doença (Costin, 2007; Edward, 2011; Seelamgari, 2004). E ainda, outros trabalhos tentam correlacionar as variações do sistema imune do hospedeiro com a suscetibilidade a infecção e a progressão da doença (O'Connell et al., 2009; Visco-Comandini et al., 2001).

A descoberta do alelo CCR5del32 forneceu a primeira evidência conclusiva para a existência de resistência genética do hospedeiro à infecção pelo HIV (Levy, 1993; Winkler et al., 2004). Esta deleção no gene CCR5 leva a produção de uma proteína truncada que não é transportada para a superfície da célula e, portanto, não permite a entrada viral (Benkirane et al., 1997). Além disso, o alto nível de expressão desse receptor em linfócitos T-CD4+ está associado com altas cargas virais e progressão acelerada da doença (Berger et al., 1999). Outros estudos mostraram ainda, que

polimorfismos em genes que codificam quimiocinas ligantes do CCR5 (como CCL5 e CCRL3L1) inibem a replicação do HIV *in vitro*, provavelmente devido à competição pelo receptor indispensável para entrada do vírus (Vicenzi et al., 1997). Esses achados levaram ao desenvolvimento de drogas que atuam nesse mecanismo, os chamados antagonistas do CCR5 (O'Brien & Nelson, 2004). Tais dados comprovam a relevância de variações genéticas na infecção e patogênese do HIV (An & Winkler, 2010).

Entre as diversas variantes genéticas estudadas, destaca-se o sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano, do inglês Human Leukocyte Antigen), pois tem um papel importante na infecção, já que codifica moléculas envolvidas com a apresentação de antígenos para os linfócitos T (Carrington & O'Brien, 2003). A homozigose para os loci 1, 2 e 3 dos alelos HLA classe I foram positivamente correlacionados com progressão da doença, e indivíduos homozigotos HLA -A, -B e -C mostraram menor tempo de sobrevivência após diagnóstico de AIDS. Alelos específicos do HLA também já foram associados com a progressão da doença: B27 e B57 associados à progressão lenta, enquanto os alelos B35 e B53 à progressão rápida (Kaur & Mehra, 2009; An & Winkler, 2010).

O controle da ativação de citotoxicidade e morte celular através das células natural killers (NK) são regulados por receptores com funções ativadoras e inibidoras presente na superfície celular, incluindo o receptor KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*). Os KIR participam da regulação das células NK através do reconhecimento de ligantes HLA nas células alvo (Carrington et al., 2008). Alguns estudos propõem a ação combinada de variantes no gene KIR com variantes em genes HLA, na defesa contra a infecção pelo HIV-1. Já foi reportado que a combinação do alelo KIR3DS1 com o alelo HLA-Bw4 pode levar a uma progressão lenta à AIDS (Carrington et al., 2008).

Outro mecanismo já associado com o curso da infecção pelo HIV é a expressão diferencial de citocinas. As citocinas são moléculas utilizadas na comunicação celular e estão estreitamente relacionadas com a resposta imune inata e adaptativa (Ekene, 2008). As citocinas estão envolvidas na patogênese do HIV e com a progressão da doença podendo ser classificadas de três formas: HIV-indutoras; HIV-supressoras e citocinas com ambas as capacidades (citocinas bifuncionais) (Vicenzi et al., 1997). As citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ vêm sendo associadas, em diversos estudos, com a progressão para a AIDS (Sobieszczyk et al., 2011).

De uma forma geral, várias frentes do sistema imunológico vêm sendo alvo de investigações, o que tem gerado uma lista crescente de polimorfismos genéticos humanos envolvidos na resposta ao HIV (Quadro I) (An & Winkler, 2010). Embora a influência de cada polimorfismo na progressão à AIDS seja pequena, seus efeitos cumulativos parecem bastante substanciais (An & Winkler, 2010; O'Brien & Nelson, 2004).

Quadro I Algumas associações já relatadas na literatura de variações genéticas do hospedeiro que influenciam na progressão à AIDS (Adaptado de An & Winkler, 2010).

GENE	Associação mais frequente		
Receptores de quimiocinas		Fatores de restrição viral	
CCR5	progressão lenta	APOBEC3G	progressão rápida
CCR2	progressão lenta	TRIM5	progressão rápida
		CUL5	progressão lenta
Quimiocinas		Complexo HLA	
CCL5	progressão lenta	HLA-B57	progressão lenta
SDF-1	progressão lenta	HLA-B27	progressão lenta
CCL3L1	progressão lenta	HLA-53	progressão rápida
Citocinas		HLA-35	progressão rápida
IL-10 (citocina Th2)	progressão rápida	KIRDS1+Bw4	progressão lenta
IL-4 (citocina Th2)	progressão lenta	KIRDS1 sem Bw4	progressão rápida
IFN-gama (citocina Th1)	progressão rápida		

1.6 Resposta Imune Inata

O sistema imune humano classicamente possui duas frentes de defesa: a imunidade inata e a adaptativa, sendo a cooperação das duas necessárias para a eliminação eficiente dos patógenos (Murphy et al., 2010). O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra uma invasão ao organismo, esta resposta deve ser capaz de distinguir entre moléculas próprias e antigênicas; além disso, deve ser rápida para eliminar os micro-organismos antes que estes causem prejuízos (Kumagai et al., 2008).

A resposta imune inata envolve um amplo espectro de células e fatores solúveis que reconhecem e exercem funções efetoras quando desafiados por invasores (Turvey &

Broide, 2010). Esse sistema tem a capacidade de detectar micro-organismos através de receptores de reconhecimento padrão (PRR - *pattern recognition receptor*) como os receptores do tipo toll (TLRs), presentes em superfícies celulares e dentro de compartimentos endossomais, receptores do tipo NOD (NOD-likes) circulantes no citoplasma (Kawai & Akira, 2009). Outro sistema de detecção são moléculas extracelulares circulantes no organismo como defensinas, proteína C reativa, e a proteína de ligação a manose (MBL-2) capaz de ligar-se a antígenos (Ricklin & Lambris, 2007; Turvey & Broide, 2010). Em conjunto esses sistemas reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – *pathogen associated molecular patterns*) como glicídios, lipídeos, peptídeos e ácidos nucleicos. Os PAMPs são específicos e essenciais para o agente patogênico, pois assim a imunidade inata é capaz de acionar um mecanismo adequado para eliminar o micro-organismo, além de garantir que o patógeno não possa alterar (através de mutações) seu padrão de reconhecimento ao longo do tempo (Akira et al., 2008).

Após o reconhecimento dos PAMPs os mecanismos de detecção acionam cascatas intracelulares, as quais através da ativação de diversos factores de transcrição levam à expressão de citocinas, quimiocinas, e moléculas co-estimulatórias (Medzhitov & Janeway, 1997). Citocinas tais desempenham papéis importantes na ativação e na migração de células apresentadoras de antígenos e na indução da resposta imune adaptativa (Medzhitov & Janeway, 1997). Além disso, podem ativar mecanismos que atuarão diretamente na eliminação dos agentes patogênicos como a opsonização, a ativação do sistema complemento e cascatas de coagulação, a ativação da fagocitose e a indução da apoptose (Murphy et al., 2010).

Outro fator importante da imunidade inata é sua amplitude, ou seja, um micro-organismo pode ser reconhecido através de diversos mecanismos em diferentes momentos da invasão (Turvey & Broide, 2010). Na infecção pelo HIV, por exemplo, o vírus pode ser detectado através da ligação a *MBL2* circulante, através dos TLRs endossomais.

1.7 MBL

A Lectina Ligante de Manose (MBL), ou ainda Proteína Ligante de Manose, é uma proteína sérica sintetizada no fígado, que tem uma importante função na imunidade inata (Turner, 2003). Ela possui a capacidade de ligar-se à resíduos de manose, ou a

outros carboidratos comuns a vários patógenos, e mediar diretamente a fagocitose ou através da ativação do sistema complemento pela via das lectinas (Turner, 2003).

A MBL pode interagir diretamente com receptores de manose presentes nas superfícies celular dos macrófagos e de algumas células dendríticas especializadas (DC-SING) e promover a opsonofagocitose (Turner, 2006). Quando associada às proteases MASPs, possui a capacidade de induzir a ativação do sistema complemento pela via das lectinas, a qual é independente da presença de anticorpos (Fujita et al, 2004). O complemento é um sistema multiprotéico, cuja função principal é a eliminação de complexos antigênicos (antígenos ligados a anticorpos ou micro-organismos propriamente) (Ricklin & Lambris, 2007). Geralmente, após uma cascata de reações, o complemento leva a lise do micro-organismo através da abertura de poros em sua superfície; ou ainda, induz a fagocitose do antígeno/patógeno (Ricklin & Lambris, 2007).

A ativação do complemento pela via das lectinas ocorre após o complexo circulante formado pela MBL e MASP-2 (protease associada à serina - 2) reconhecer seu alvo. Então, MBL-MASP-2 clivam as convertases C4 e C2; as quais, por sua vez, clivam a convertase C3 ativando-a. Ou, o complexo MBL-MASP-1 (protease associada à serina - 1) ativa diretamente C3. O caminho a partir de C3 é comum às três vias do sistema complemento (via clássica, via alternativa e via das lectinas) e culmina com a abertura de poros na superfície do patógeno (Fujita et al., 2004).

Alguns estudos demonstraram que a MBL também pode interferir na modulação da inflamação. Eles sugerem que a proteína seria capaz de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias a partir de monócitos (Dommett et al., 2006). A liberação de TNF- α , IL-1 e IL-6 a partir de monócitos foram registradas em concentrações de MBL abaixo de 4mg/ml. No entanto, parece que altas concentrações de MBL suprimem esta expressão.

A estrutura da MBL apresenta-se na forma de multímeros de cadeias polipeptídicas idênticas. Cada cadeia tem uma região C-terminal com um domínio de reconhecimento de carboidratos cálcio-dependente; uma pequena região hidrofóbica, denominada pescoço (em forma de hélice), uma região colagenosa contendo glicina e uma região N-terminal rica em cisteína (Figura 3) (Turner, 2003)

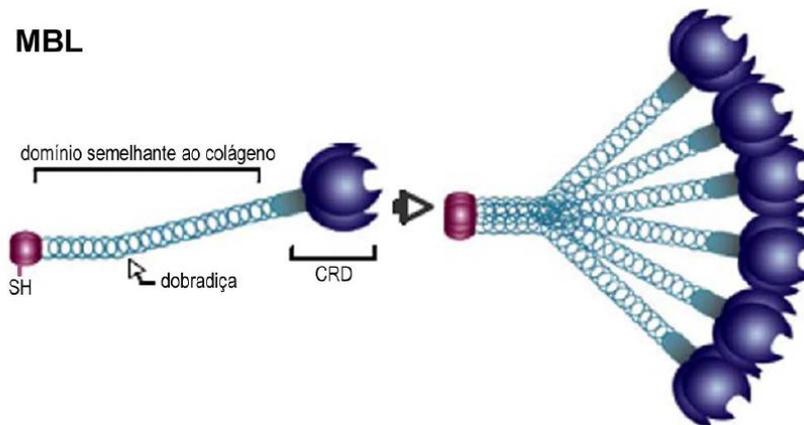


Figura 3: Representação esquemática de uma cadeia polipeptídica de MBL e um oligômero da proteína (Adaptado de Turner, 2003).

A estrutura básica da MBL circulante é composta por três cadeias polipeptídicas formando uma tripla hélice nas porções colagenosas, estabilizadas por interações hidrofóbicas e pontes dissulfídicas entre as regiões N-terminais. No soro, a MBL consiste de oligômeros, de dímeros a hexâmeros, na forma de “buquê de tulipas” (Dommett et al., 2006; Ezekowitz, 2003) A capacidade da proteína para ligar-se de maneira eficaz a microorganismos e ativar o complemento parece depender da presença de oligômeros superiores (acima de tetrâmeros).

Níveis séricos médios de MBL variam entre 1-2 μ g/ml, podendo aumentar até três vezes sua concentração durante a fase aguda de infecções (Thiel et al, 1992). A função da MBL está diretamente associada a sua concentração sérica, que é determinada pela presença de mutações no exón-1 e no promotor do gene *MBL2* (Madsen et al, 1998).

Contudo, alguns autores relatam um efeito protetor dos níveis séricos diminuídos de MBL em infecções por micro-organismos intracelulares (Dommett et al., 2006; Ezekowitz, 2003; Fiane et al., 2005). A partir desses estudos, surgiu a hipótese de que patógenos intracelulares poderiam utilizar as vias de opsonização e fagocitose para invadir mais facilmente suas células alvo após a ligação com a molécula de MBL; ou seja, elevados níveis desta proteína seriam prejudiciais em infecções virais (Catano et al., 2008).

Genética da MBL

Existem dois genes humanos *MBL*, mas apenas *MBL2* codifica uma proteína funcional. O gene *MBL2* está localizado no cromossomo 10 (q11.2-q21) e apresenta

quatro exóns (Figura 4) (Dommett et al., 2006). O exón-1 codifica a região rica em cisteína, parte da região rica em glicina e parte da região semelhante ao colágeno; o exón-2, o restante da região semelhante ao colágeno; o exón-3 a região de ligação e o exón-4, a região de reconhecimento dos carboidratos (Dommett et al., 2006).

No exón-1, três substituições de base única (SNPs) são comumente encontradas: no códon G54D (alelo B - rs1800450), no códon G57Q (alelo C - rs1800451,) e no códon C52R (alelo D - rs5030737), as quais resultam em variantes que são coletivamente denominadas alelo O em contraste com o alelo A, tipo selvagem (Boldt et al., 2010; Larsen et al., 2004). Essas variantes foram relacionadas a alterações na conformação da proteína, resultando na deformação da estrutura em hélice da região colagenosa e, conseqüentemente, interferindo na formação dos oligômeros. Todos os três alelos mutantes têm um efeito dominante nos níveis de MBL no soro, diminuindo os níveis séricos de MBL funcional em até 90%. Os indivíduos que são heterozigotos para os alelos O têm reduzido níveis de MBL oligomerizadas na circulação e os indivíduos que são homozigotos ou heterozigotos compostos para os alelos O têm níveis baixos ou quase ausentes de MBL oligomerizadas (Garred, 2008; Larsen et al., 2004). As frequências gênicas dos alelos B, C e D da *MBL2* variam entre as populações já estudadas. A variante B é a mais frequente entre caucasianos (22-28%) e japoneses (37%); a variante C é característica de populações africanas (50-60%) e a variante D é pouco frequente em todas as populações (Madsen et al., 1998).

Três polimorfismos na região promotora do gene também foram relacionados com a diminuição dos níveis séricos de MBL. Encontrados na posições -550, alelos H e L (G/C, rs11003125); -221, alelos Y e X (G/C, rs7096206) e +4, alelos P e Q (C/T, rs7095891) (Boldt et al., 2010; Ezekowitz, 2003; Garred, 2008). Cabe ressaltar que estas alterações no promotor diminuem a expressão da proteína, enquanto as variantes B, C e D levam a proteínas estruturalmente não funcionais. Em relação aos possíveis genótipos encontrados para região promotora, quatro haplótipos comuns foram identificados : HYP, LYQ, LYP e LXP (Boldt & Petzl-Erler, 2002). A variante X tem um forte efeito na regulação da expressão de MBL, esta alteração no promotor reduz bruscamente os níveis circulantes da proteína. Em análises funcionais, foi demonstrado que os haplótipos LX, LY e HY estão relacionados com baixa, intermediária e alta atividade promotora, respectivamente, de acordo com os níveis séricos da proteína (Dommett et al., 2006; Garred, 2008).

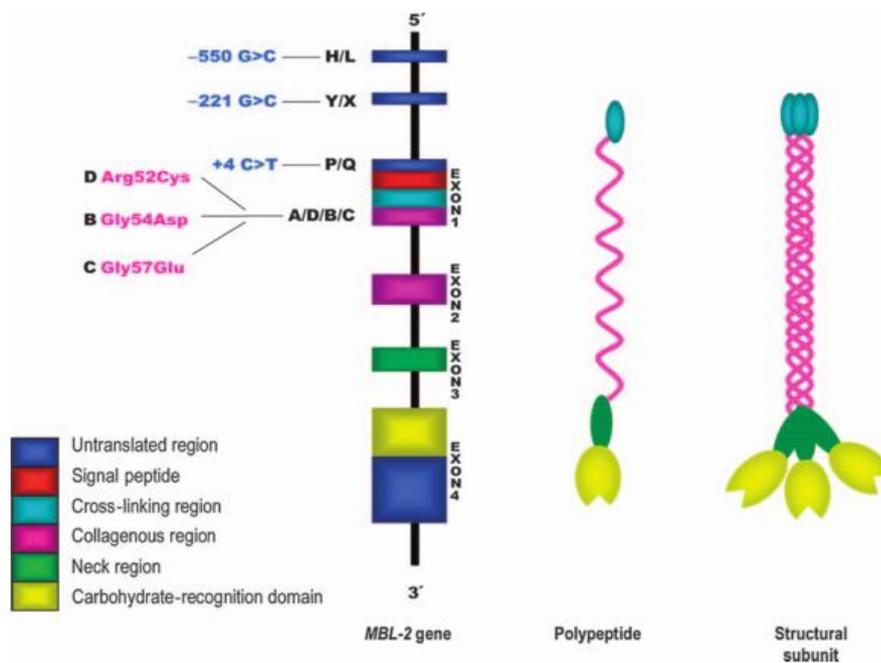


Figura 4: Estrutura do gene *MBL2* e o produto proteico gerado (Adaptado de Dommett et al., 2006).

Os haplótipos da região promotora estão em forte desequilíbrio de ligação com as variações encontradas no exon-1, resultando em sete haplótipos comuns, nomeadamente HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB e LYQC (Boldt et al., 2010; Turner, 2003). Segundo Boldt *et al.* (2002) cerca de 12% da população Caucasiana seria portadora do genótipo LXPA.

Estudos demonstraram que, mesmo durante uma resposta de fase aguda, os indivíduos heterozigóticos ou homozigóticos para mutações no exón e no promotor da *MBL2* foram incapazes de atingir níveis séricos de proteína equivalentes aos indivíduos com genótipo selvagem (Vallinoto et al., 2011; Tan et al., 2009). Aproximadamente um terço da população Caucasiana possui genótipos que conferem baixos níveis de MBL e aproximadamente 5% tem níveis muito baixos de MBL (Dommett et al., 2006). Atualmente, estudos têm realizado a inferência dos níveis séricos de *MBL2* através da análise combinada dos genótipos, ou seja, HYA/A e LYA/A - altos níveis séricos, LXA/LXA, HYA/0 e LYA/0 - níveis séricos intermediários e LXA/0 e 0/0 - baixos níveis séricos (Dommett et al., 2006).

MBL e o HIV

Trabalhos demonstraram que a MBL é capaz de opsonizar e de neutralizar o HIV através do reconhecimento da proteína do envelope viral gp120, a qual é altamente

glicosilada (Figura 5) (Ji et al., 2005). No entanto, experimentos *in vivo* sugerem que a MBL não se liga de forma eficiente ao vírus, ou ainda, que quando ligada a gp120 não é capaz de ativar eficientemente a via da lectina, pois a neutralização do HIV não ocorre em níveis satisfatórios para o organismo, mesmo quando o vírus está em níveis muito baixos (Saarloos et al., 1995). Por outro lado, a opsonização do HIV pela MBL pode alterar o tráfego de vírus durante a infecção. Estudos mostraram que ao ligar-se ao HIV a MBL impede a absorção de vírus pelas DC-SIGN o que estaria associado à menor disseminação do vírus (Ji et al., 2005).

No entanto, estudos clínicos sugerem que a deficiência de MBL sérica pode aumentar de três a oito vezes a chance de aquisição da infecção (Garred et al., 1997; Prohászka et al., 1997). Além disso, essa deficiência aumenta o risco de transmissão vertical (Boniotto et al., 2000). No entanto, esses achados não foram replicados em todas as populações, e alguns estudos não conseguiram demonstrar qualquer tipo de associações entre os níveis séricos da proteína e infecção pelo HIV (Malik et al., 2003; McBride et al., 1998).

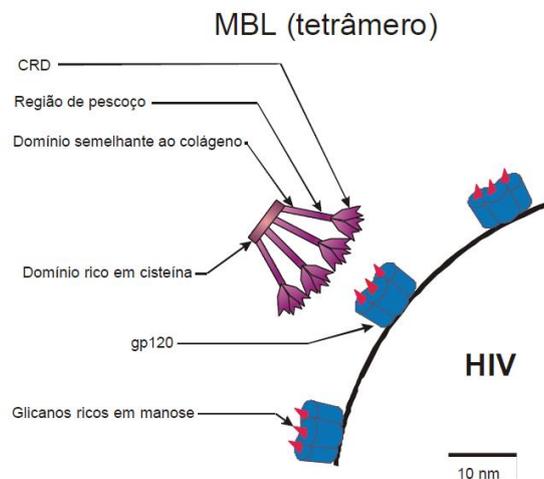


Figura 5: MBL reconhece moléculas de glicanos ricos em manose presentes na superfície viral (Adaptado de Ji et al., 2005).

Com relação a estudos que avaliaram a associação dos polimorfismos do gene *MBL2* aos níveis séricos da proteína e a progressão para a AIDS, as conclusões são ainda mais contraditórias. Os resultados variaram entre não encontrar efeito (McBride et al., 1998), encontrar um efeito negativo dos níveis elevados (ou encontrar efeito benéfico de baixo níveis) (Maas et al., 1998) até encontrar um efeito benéfico de altos níveis de MBL (Boniotto et al., 2000; Garred et al., 1997).

Além disso, um trabalho diferenciado realizado por Catano *et al* (2008) verificou que heterozigotos para os polimorfismos que alteram a integridade estrutural da MBL (o genótipo A/O), estavam associados com efeitos benéficos na progressão da doença. Enquanto a presença do alelo X, o qual resulta na redução dos níveis de MBL, mas mantém a estrutura da proteína intacta, estava associado com a aceleração do início da doença. Estes resultados indicam um papel importante da MBL na progressão para AIDS e mostram que não somente os níveis de MBL *per se*, mas também a integridade estrutural da proteína podem ser determinantes nos fenótipos associados às variações na *MBL2* (Catano et al., 2008). Além disso, as análises de Catano testaram essas associações em diferentes etnias encontrando a mesma tendência entre elas.

Um estudo realizado no Brasil por Vallinoto *et al* (2006) avaliou os polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2* e demonstrou que a presença da variante “B” está associada com níveis elevados de carga viral plasmática, sugerindo sua importância na evolução clínica da infecção pelo HIV-1. Recentemente, daSilva *et al* (2011) investigou 435 indivíduos HIV-positivos e 345 indivíduos HIV-negativos (controles) em Porto Alegre quanto a presença dos SNPs na região promotora e no exón-1 da proteína, separando a população por etnias. Os resultados de daSilva *et al* (2011) mostraram um aumento da frequência genótipos relacionados a baixos níveis séricos (LX e OO) de MBL em eurodescendentes HIV-positivos quando comparados a indivíduos saudáveis, sugerindo uma suscetibilidade a infecção neste grupo étnico. Já para os indivíduos afrodescendentes nenhuma associação foi encontrada.

1.8 TLRs

Os Receptores do *tipo-Toll* (TLRs) são uma classe de receptores transmembranas que desempenham um papel fundamental no sistema imune inato; eles são capazes de reconhecer os PAMPs e assim ativar respostas contra classes de microrganismos específicos (Turvey & Broide, 2010). Estes receptores são expressos em várias células do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas (DC), células B e células T (Kawai & Akira, 2006). Estruturalmente são classificados como receptores glicoproteicos integrais de membrana, caracterizados por um domínio extracelular composto de 550 a 950 aminoácidos, incluindo uma região de repetições ricas em leucina (LRR). Além disso, possuem um domínio citoplasmático, homólogo ao receptor de interleucina do tipo I (ILR-1), o qual é responsável por iniciar uma cascata

de sinalização intracelular logo após o domínio extracelular reconhecer seu ligante (Bowie & O'Neill, 2000; Casanova et al, 2011).

Em mamíferos, cada TLR apresenta capacidade de reconhecer moléculas específicas: os TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem diferentes lipopeptídeos; TLR4 lipopolissacarídeos; TLR5 flagelinas; TLR3 RNA dupla fita; TLR7 e TLR8 RNA simples fita; TLR9 DNA exógenos (Kawai & Akira, 2006). Inicialmente acreditou-se que a especificidade do TLR9 era exclusiva a motivos CpG, que são quatro vezes menos frequentes (e na maior parte metilados) no DNA genômico de mamíferos do que no DNA bacteriano ou viral. Contudo, trabalhos recentes vêm demonstrando que os motivos CpGs não são obrigatórios para induzir uma resposta de reconhecimento de DNA (Chockalingam et al, 2009; Haas et al., 2008).

De acordo com as moléculas que são capazes de rastrear, os receptores do tipo toll podem estar localizados na membrana plasmática - reconhecendo antígenos livres no meio extracelular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) ou podem estar em compartimentos endossomais - detectando ácidos nucleicos exógenos internalizados (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) (Figura 6) (Kawai & Akira, 2009). A organização dos TLRs em compartimentos é fundamental, não somente pelo acesso aos seus ligantes, mas também para a especificidade dos sinais desencadeados a partir deste reconhecimento. Assim, um sistema complexo de regulação existe para assegurar que os TLRs estarão adequadamente localizados, os quais requerem estágios de maturação no complexo de golgi e clivagens proteolíticas (Blasius & Beutler, 2010).

Os TLRs endossomais são extremamente importantes para a resposta imune antiviral (Blasius & Beutler, 2010). Muitos vírus são percebidos apenas por TLRs endossômicos, como por exemplo, o vírus influenza e o vírus da estomatite vesicular (VSV), detectados pelo TLR7 e TLR8 (Carty & Bowie, 2010). Diferentes mecanismos celulares foram desenvolvidos para o correto reconhecimento das moléculas virais através destes TLRs. A absorção de vírus intactos pela via endocítica pode ocorrer por fagocitose, pinocitose ou endocitose mediada por receptores presentes na membrana celular. Além disso, durante os diferentes estágios da infecção os vírus podem ser carregados ao endossomo como resultado de autofagia (Lee et al, 2007).

Ao ligar-se nos domínios ricos em leucinas dos TLRs moléculas de patógenos desencadeiam uma cascata de eventos que levam à ativação de muitos dos genes envolvidos na resposta imune (Bowie & O'Neill, 2000; Cohen, 2005). De um modo geral a sinalização inicia com o recrutamento da molécula adaptadora MyD88 (fator de

diferenciação mielóide 88) que em última instância ativa os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (proteína ativadora-1). Algumas das moléculas adaptadoras já foram caracterizados como TRIF, TIRAP e TRAM/MAL; porém, outras permanecem indefinidas (Kawai & Akira, 2006).

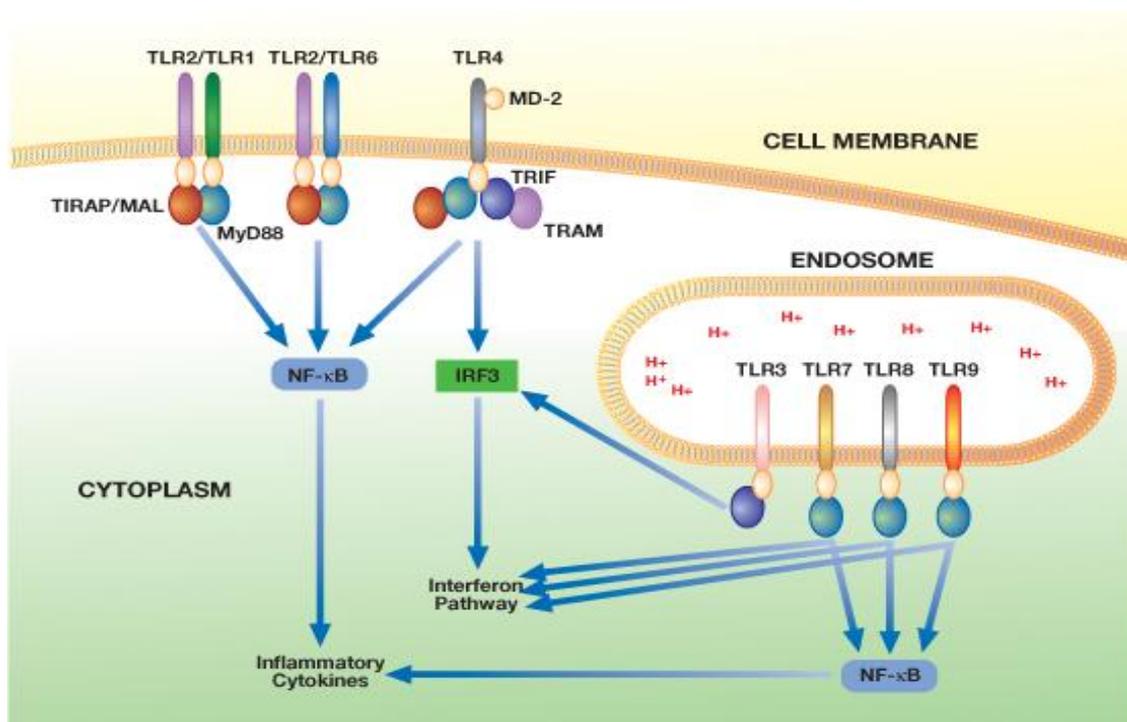


Figura 6: Representação da localização e mecanismo principal de ativação gênica dos TLRs. (Adaptado de Cohen, 2005).

Os TLRs endossomais 7, 8 e 9, além de responderem através da via clássica acima descrita, nas células dendríticas convencionais e nos macrófagos, também são responsáveis pelo acionamento de uma via alternativa em células dendríticas plasmocíticas (Blasius & Beutler, 2010). Nestas células o IRF7 (fator regulador de interferon 7) é constitutivamente expresso e forma um complexo com MyD88, IRAK1 (receptor de interleucina 1 associado a quinase 1) e IRAK4 (receptor de interleucina 1 associado a quinase 4). Em resposta a ligação de um ácido nucléico aos TLRs 7, 8 e 9, IRF7 é fosforilado pelo IRAK1/ IRAK4, dimerizado e translocado até o núcleo; então, em conjunto com NF- κ B e AP-1, regulam a expressão do IFN-1 (interferon tipo 1), e assim incluindo IFN-a e IFN-b (Figura 07) (Blasius & Beutler, 2010; Kawai & Akira, 2009).

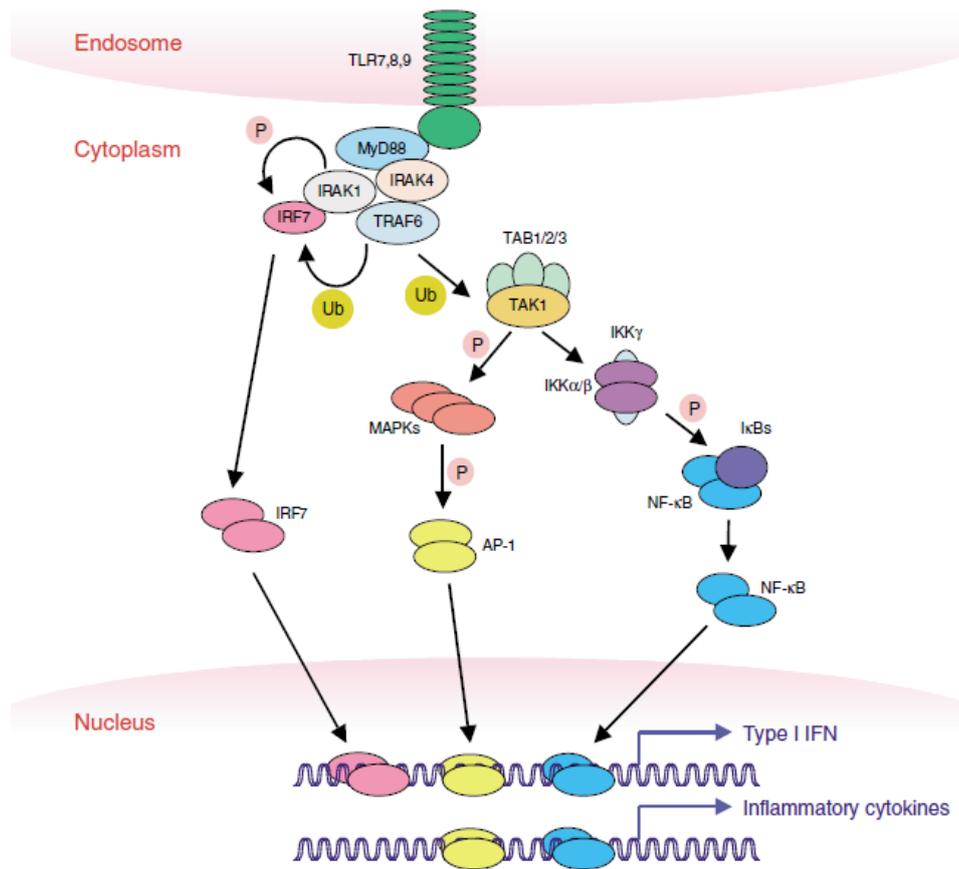


Figura 7: Cascata de ativação de fatores de transcrição após o reconhecimento de PAMPs pelos TLR7, 8 e 9 (Adaptado de Kawai & Akira, 2006).

As células que expressam TLRs são prioritariamente APCs, tais como DCs e macrófagos, que fagocitam patógenos. APCs também ativam a resposta imune através da indução da migração do local de inflamação para a região do linfonodo, onde apresentam antígenos derivados de patógenos para células T CD4⁺ virgens. Células dendríticas plasmocíticas são consideradas as principais células na imunidade antiviral, pois são capazes de produzir IFN do tipo I, além de apresentar antígenos às células T CD4⁺ e T CD8⁺ consolidando a resposta Th1 (Turvey & Broide, 2010).

Contudo, a pressão seletiva gerada pelo sistema imune leva à evolução dos vírus, que acabam superando os mecanismos de defesa do organismo. O HIV, por exemplo, possui regiões LTR que contêm sítios de ligação para NF-κB, assim o vírus utiliza este fator de transcrição celular como ativador da sua replicação (Brichacek et al., 2010; Báfica et al., 2004). Então, ao mesmo tempo que as células estão sinalizando uma invasão viral através da produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais por sua vez ativam o NF-κB, a replicação do HIV está sendo estimulada.

TLRs e o HIV

A infecção pelo HIV, bem como a progressão para AIDS, geralmente ocorre na presença de outros micro-organismos. Estes agentes infecciosos, na maioria das vezes, atuam como co-patógenos, agravando o curso clínico da doença. Além de causarem danos diretamente ao organismo, existem evidências de que estes invasores agravam a infecção interagindo com o HIV através dos TLRs (Báfica et al., 2004). Uma vez ativados, os TLRs (com exceção do TLR3) irão desencadear a ativação dos fatores de transcrição celulares NF- κ B e AP-1, os quais são capazes de ativar a replicação do vírus (Báfica et al., 2004). Estudos sugerem que o TLR4, por exemplo, apesar de estar presente na superfície celular e reconhecer principalmente moléculas de LPS foi associado a progressão acelerada para AIDS (Equils et al., 2001; Pinne et al., 2009). Outra demonstração dessa relação foi conduzida por Sundstrom *et al* (2004), a replicação do HIV foi reativada em mastócitos com infecção latente, após exposições a diferentes agonistas de TLRs. Contudo, os mecanismos por trás dessas interações não estão completamente compreendidos; sendo difíceis de serem investigados, pois cada tipo celular apresenta uma expressão diferencial de TLRs.

O TLR7 tem um importante papel na infecção pelo HIV, ele é uma das primeiras moléculas capaz de detectar o ssRNA viral - material genômico do vírus. Após ser acionado ele é capaz de desencadear, principalmente através da produção de IFN- α , uma resposta antiviral – via células T auxiliares tipo I (Song et al., 2009). O TLR7, assim como o TLR9, está presente em grande concentração em pDC, geralmente são células infectadas pelo HIV precocemente (Wu & RamaniKewal, 2006).

Apesar do HIV apresentar seu genoma na forma de RNA, acredita-se que o TLR9 seja capaz de reconhecer o DNA do vírus após o processo de retrotranscrição. Estudos vêm demonstrando uma relação deste receptor com o curso da infecção, embora os resultados ainda sejam insuficientes para a compreensão do mecanismo. Segundo Martinelli *et al* (2007) a concentração de TLR9 é reduzida em células B de indivíduos infectados pelo HIV, o que acaba gerando respostas celulares deficientes. Já Sander *et al* (2008) observou que a concentração do TLR9 em linfócitos T se manteve equivalente entre indivíduos HIV-positivo em diferentes estágios da infecção e indivíduos não infectados. Além disso, Equils *et al* (2003) verificou que o número de proteínas virais (p24) aumenta com a exposição de DNACpG a células *ex vivo* de camundongos transgênicos infectados com HIV. Por outro lado, o trabalho de Brichacek *et al* (2010) com tecido linfóide tonsilar *ex vivo* demonstrou que a replicação do HIV foi

diminuída na presença de agonistas do TLR9. Como discutido anteriormente, esses estudos são extremamente complexos e difíceis de serem compreendidos.

Genética dos TLRs

Um número crescente de estudos vem consolidando o papel dos TLRs na modulação da resposta imune frente à infecção pelo HIV (Carty & Bowie, 2010). A partir disso, trabalhos vêm avaliando o impacto de SNPs nos genes TLRs em indivíduos infectados com o vírus (Misch & Hawn, 2008).

O gene *TLR7* está localizado no cromossomo X, na região Xp22.2-p22.3 e possui três éxons. Dentre as variações descritas neste gene destaca-se o polimorfismo A32T (rs179008) no éxon-3. Uma análise *in silico*, realizada por Moller-Larsen *et al* (2008), revelou que esta substituição não-sinônima (Gln11Leu) gera uma alteração na sequência peptídica sinal da proteína, o que provavelmente afeta o direcionamento do TLR7 e a sua maturação no complexo de Golgi, diminuindo, assim, a concentração deste nos endossomos. Além disso, esse polimorfismo foi associado a processos alérgicos como asma e com o aumento da suscetibilidade à infecção por HCV (Moller-Larsen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

No estudo de Oh *et al* (2009) a presença do polimorfismo Gln11Leu no gene *TLR7* foi associada com cargas virais elevadas e progressão acelerada para AIDS em uma coorte de pacientes infectados pelo HIV (German HIV-1 Seroconverter Study). Nesse mesmo trabalho, os pesquisadores investigaram alterações na produção de citocinas pro-inflamatórias entre os indivíduos do estudo. Eles verificaram que as células mononucleares dos portadores da variante Gln11Leu secretavam significativamente menos IFN, porém a produção de IL-6 permaneceu inalterada. Visto que a expressão da IL-6 é induzida pelo NF-κB e IFN pelo IRF7, os pesquisadores demonstraram que o TLR7 tem um importante papel na sinalização via IRF7/IFN (Oh *et al.*, 2009). Provavelmente, a diminuição do IFN levou a uma resposta imune prejudicada nos indivíduos que carregavam o alelo T.

O gene *TLR9* está localizado no cromossomo 3p21.3 e possui apenas dois éxons, sendo que o segundo possui a maior região codificante. Entre os polimorfismos mais estudados neste gene estão o T-1237C (rs5743836) e o G+1635A (rs352140). Segundo Lazaro *et al* (2003) estes dois SNPs são as variações mais frequentes em populações Eurodescendentes e afrodescendentes (Lazarus *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos avaliaram a implicação da variante -1237C na expressão do TLR9. Hamann *et al* (2006) verificou que este SNP insere um potencial sítio de ligação ao fator de transcrição NF-kB na região promotora (Hamann et al., 2006). Já um trabalho conduzido por Novak *et al* (2007) mostrou que a sequência do alelo T leva ao aumento da atividade do promotor em relação ao alelo C. Mais tarde, Ng *et al* (2010) não observou diferença na atividade do promotor na presença do polimorfismo, porém o alelo -1237C foi mais expresso em resposta a estímulos que resultavam da ativação do NF-kB, o que seria resultado da maior afinidade ao NF-kB.

Até o momento, apenas dois estudos avaliaram a influência do SNP -1237(T/C) no curso da infecção pelo HIV. O primeiro, de Bochud *et al* (2007), investigou polimorfismos em diferentes TLRs em uma coorte europeia de pacientes HIV-positivos (Swiss HIV cohort) classificados como progressores rápidos (65 indivíduos) e não-rápidos (363 indivíduos), eles não detectaram associação da variante -1237C com progressão para AIDS, embora a frequência do alelo C tenha sido maior nos progressores não rápidos. O segundo trabalho, de Pine, *et al* (2009), o qual investigou essa variação em uma coorte norte americana (Seattle Primary Infection Cohort), associou a presença do alelo C com carga viral elevada e evolução rápida para AIDS, mas essas associações não foram significativas após correção para testes múltiplos.

O polimorfismo +1635 (equivalente ao G2848A) é uma mutação silenciosa no exón-2 do TLR9 (P545P). Embora não leve a nenhuma alteração funcional, essa variação vem sendo associada a diferentes situações, como asma (Lazarus et al., 2003), arteriosclerose (Hamann et al., 2006) e Lupus (dosSantos et al., 2012).

No trabalho de Bochud *et al.* (2007) os pesquisadores também investigaram a influência do polimorfismo G1635A (equivalente ao G2848A) na progressão para AIDS, sendo que os genótipos 1635AG e GG foram associados com a progressão rápida. No entanto, em um estudo subsequente, Soriano *et al* (2008) encontrou um resultado oposto em uma coorte Espanhola (Viral Hepatitis and AIDS Study Group of Virgen del Rocío Hospital, Seville, o genótipo GG foi associado a maiores níveis de células T CD4+ e a uma progressão lenta a AIDS. Um efeito protetor similar foi encontrado no trabalho de Pine *et al* (2009), o genótipo GG foi associado a maiores níveis de células T CD4+ e menores níveis de carga viral circulantes, consequentemente, a uma progressão mais lenta.

Todas essas discordâncias podem ser resultado de diferenças na forma de definir a progressão para AIDS, na quantificação do tempo de infecção e, ainda, na falta de

padronizações das medidas clínicas utilizadas no acompanhamento. Além disso, diferenças nas populações de estudo também devem ser consideradas. Santos *et al*, (2011) investigaram a frequência das variantes 32A/T no *TLR7*, -1237T/C e +1635G/A no *TLR9* em 370 indivíduos com Lupus e 415 indivíduos saudáveis na população de Porto Alegre, e confirmaram diferenças nas frequências alélicas entre Eurodescendentes e Afrodescendentes descritas por Lazarus *et al*, (2003).

Capítulo 2: Justificativa

.....

Como é o caso de todas as doenças infecciosas, o nível de resistência dos indivíduos expostos ao HIV é uma função dependente da variabilidade genética do patógeno, do ambiente, e do hospedeiro (Carrington & O'Brien, 2003). A resposta imune contra o HIV é modulada por diversos fatores, os quais são implicados direta ou indiretamente no reconhecimento viral e na amplificação da resposta imune (Kaur & Mehra, 2009). Evidências do envolvimento da proteína sérica MBL e dos receptores TLR7 e TLR9 na resposta imune inata durante a infecção pelo HIV se acumulam. Assim, a análise de polimorfismos nos genes *MBL2*, *TLR7* e *TLR9* pode contribuir na identificação de fatores genéticos envolvidos na progressão à AIDS.

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de compreender a progressão diferencial para a AIDS; porém a inclusão de diferentes populações, com diferentes ancestralidades pode ajudar a esclarecer como fatores genéticos influenciam no curso da infecção. Estudos avaliando estas questões na população brasileira ainda não foram publicados, principalmente devido à dificuldade de formar um grupo amostral com acompanhamento adequado. Para transpor essa barreira este trabalho propôs investigar de forma retrospectiva dados clínicos obtidos em um grande centro de atendimento a pacientes HIV-positivos em Porto Alegre – RS, Brasil.

Uma vez que seja possível identificar genes que influenciam no curso clínico da infecção, novas estratégias de acompanhamento baseadas nessas diferenças podem ser utilizadas. Além disso, a avaliação desses polimorfismos em uma população com progressão definida para AIDS poderá esclarecer alguns mecanismos envolvidos na resposta imune frente à infecção pelo HIV, permitindo novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos e vacinas.

Capítulo 3: Objetivos

.....

Este estudo tem como objetivo principal avaliar fatores genéticos (*TLR7*, *TLR9* e *MBL2*) envolvidos na resposta imune inata contra o HIV e sua influência na progressão à AIDS em pacientes soropositivos de Porto Alegre, RS-Brasil e região metropolitana.

Objetivos específicos:

- * Estimar a frequência dos polimorfismos 32A/T no *TLR7*; -1237T/C e +1635G/A no *TLR9*; -550G/C, -221G/C na região promotora e nos códons C52R, G54A e Q57A do éxon-1 do gene *MBL2* em pacientes HIV- positivo de Porto Alegre com progressão para a AIDS determinada.
- * Verificar a possível influência dos polimorfismos investigados no tempo estimado de progressão para a AIDS.

Capítulo 4: Manuscrito

.....

A ser submetido ao periódico *Tissue Antigens*.

Influence of polymorphisms in genes of the innate immune response in the progression to AIDS

Rúbia Marília de Medeiros^{1,2}, Maria Cristina Cotta Matte^{1,2}, Daniel Simon³, Breno Riegel dos Santos⁴, Sabrina Esteves de Matos Almeida², José Artur Bogo Chies¹

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

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

³Genética Molecular Humana, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

⁴Serviço de Infectologia, Hospital Nossa Senhora Conceição (GHC), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Rúbia Marília de Medeiros. E-mail: medeirosrubia@gmail.com

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde / Rio Grande do Sul.

Av. Ipiranga 5400. Porto Alegre, CEP: 90610-000, Brazil

Telephone number: 55-51-3339-2386 Fax number: 55- 51-3339-3654

Short titles: *MBL2*, *TLR7*, *TLR9* polymorphisms in the progression to AIDS.

All authors declare no conflict of interest.

Abstract

Variations in innate immune response genes have been associated with different AIDS progression. In HIV infection MBL (mannose-binding lectin) recognizes N-glycans present in the viral glycoprotein gp120, and TLRs (toll-like receptors) recognizes different HIV molecules present inside the infected cell; ie TLR7 recognizes viral RNA and TLR9 to proviral DNA. The present study investigated the influence of *MBL2*, TLR7 and TLR9 polymorphisms in AIDS progression in a population with European and African ancestry in patients from Southernmost Brazil. From 3,300 medical records of HIV+ patients, 107 were classified according to AIDS progression (20 rapid, 58 chronic and 29 slow AIDS progressors). Promoter region (H/L, rs11003125 e X/Y, rs7096206) and exon-1 region (R52C, rs5030737; G54D, rs1800450; G57E, rs1800451) polymorphisms in the *MBL2* gene were determined, as well as in TLR7(Gln111Leu, rs179008) and TLR9 (T-1237C, rs5743836 e G1635A, rs352140). To evaluate the influence of genotypes in the progression to AIDS, statistical tests as Survival Analysis, Cox regression and binary logistic regressions were performed. Significant differences were observed in the ethnic composition within progression categories, 58.6% of slow-AIDS progressors patients were African-derived ($p < 0.05$). Kaplan-Meier curves applied to polymorphism -1237T/C in TLR9 revealed a significant association between C allele carriers and longer time (10 years) for AIDS progression when compared with A allele carriers (6 years). Moreover, this association was also reproduced in the multivariate Cox regression (0.616 Hz, 95% CI 0.379 to 1.003, $p < 0.05$), including age and ethnicity as variables. However, adjusting the model to the presence of the alleles CCR5del32 and HLA-B27/57 the association was lost. For the polymorphism +1635G/A in TLR9 gene, when analyzing the variation within ethnic groups, an statistically significant association of allele A (1.966 HZ, 95% CI 1.052 3.674, $p < 0.05$) with rapid AIDS progression was observed in European-derived patients. No significant results for *MBL2* and TLR7 polymorphism and AIDS progression were shown. Our data highlights a relationship between the investigated polymorphisms in TLR9 gene and progression to AIDS. In addition, the results suggests the genetic background is important in HIV-1 infection, although several genes and variants responsible by this behavior remain to be identified.

Introduction:

Considerable variability exists among individuals in their susceptibility to HIV infection and subsequent disease progression (1). After infection, most of the individuals develop AIDS in a time ranging from 4 to 9 years. However, some individuals begin to manifest profound immunodeficiency in less than three years (rapid progressors) and others remain immunocompetent for more than 10 years (slow progressors) after infection (2,3). Viral and environmental factors, several human genetic factors have been suggested to modulate HIV-1 disease progression (4–6).

Some variations in HLA-B (HLA-B57 and HLA-B27 alleles) and CC chemokine receptor 5 (CCR5del32) genes have been reported as tightly determinants of slow AIDS progression (7–9). Nevertheless current knowledge only explains a small fraction of the whole observed variability in the course of infection. Genes associated with innate immune response are among the candidates to be involved in differential rate of disease progression; among them we should point out serum protein mannose-binding lectin (MBL) and Toll-like receptors (TLRs) (10–12). MBL and TLRs recognize pathogens associated molecular patterns (PAMPs) as carbohydrates and nucleic acids (13). In HIV infection MBL recognizes N-glycans present in the viral glycoprotein gp120, and TLRs recognizes different HIV antigens present inside the infected cell; ie TLR7 binds to viral RNA and TLR9 to proviral DNA (14,15). Upon recognition of the PAMPs different mechanisms are activated in order to control the virus.

In HIV infection MBL mediates its effects by influencing complement activation, opsonization, and phagocytosis (14). Polymorphisms in the *MBL2* promoter region, as the H/L located at -550bp and the X/Y found at -221bp (both G/C nucleotide substitutions) are associated to reduced serum MBL levels (16). Additional variations located at *MBL2* exon 1 are reported to interfere with the protein structure, resulting in impaired protein function (17,18). These region contain three important SNPs, at codon C52T (Arg/Cys, “D” allele), at codon G54A (Gly/Asp, “B” allele) and at codon G57A (Gly/Glu, “C” allele). A wild type sequence is called allele “A”, and the presence of any of these variants is collectively called as allele “O” (16,19,20). The exact mechanism of MBL/HIV interaction has not yet been fully understood. Besides, results on the effect of MBL on HIV disease progression have ranged from finding no effect, to a negative or even a beneficial effect of high MBL levels (20–23). Furthermore, Catano et al (2008)

found that heterozygotes for polymorphisms in exon 1 were associated with beneficial effects on disease progression (24).

TLRs and their ligands have been described in humans and are expressed by different cells of the immune system, either at the cell membrane (TLR1, 2, 6, 4, 5, 10) or in endosomes (TLR 3, 7, 8, 9) (25). Specifically, TLR7 and TLR8 are implicated in the response against HIV infection, recognizing viral single-stranded RNA while TLR9 recognizes DNA sequences (26–28). Polymorphism A32T (Gln11Leu - rs179008) in *TLR7* generates a change in the signal peptide sequence of the protein, which affects TLR7 maturation and targeting to endosomes (29), this SNP was associated with decline on CD4+ T cell counts in a cohort of HIV-infected Europeans, but these findings are yet to be replicated in other studies (30). In regarding to *TLR9*, two SNPs, one in the promoter (T-1237C, rs5743836) and the other a synonymous SNP in the coding region (G1635A, rs352140), were associated with the course of HIV-infection. A possible role of the variant T-1237C in the *TLR9* gene in rapid progression was suggested, although data was not statistically significant (31). The G+1635A SNP was associated with lower viral load set-point and slower disease progression among white North Americans, with similar protective effect noted in a Caucasian Spanish cohort (31,32). However, a similar study conducted in Europeans of the Swiss Cohort suggested an opposite association of this same variant and progression to AIDS (33).

Human populations vary considerably in their predisposition to infection diseases and frequencies of important immunological response variants, probably as a result of adaptation to local selective factors (34). The study of populations from different geographic regions and different ancestries are important to understand how genetic background influence HIV infection and progression (12,35). The present study investigated the influence of polymorphisms in the human genes *MBL2*, *TLR7* and *TLR9* in the progression to AIDS in a population with European and African ancestry.

Materials and Methods:

Study sample

From 3,500 medical records of regular HIV+ patients treated at Hospital Nossa Senhora da Conceição in Southernmost of Brazil, individuals with sufficient data to be classified according to AIDS progression were selected. In order to investigate the correlation between human polymorphisms and progression to AIDS the following

parameters were used in order to estimate the time of progression per individual: (a) time of serology HIV-negative, serology HIV-positive and initiation of treatment for AIDS up to three years, (b) time of serology HIV-positive, clinical monitoring and early treatment for AIDS over four years; (c) time after serology HIV-positive exceeding 10 years without beginning treatment for AIDS. After carefully apply such criteria to select patients from medical records, 107 individuals fulfilled the clinical requirements and could be included in this research. Based in the above described features, patients were divided into two categories: rapid progressors, including individuals that progressed to AIDS within 3 years, and slow progressors, HIV-infected patients (HAART naïve or treated) but not in AIDS for 10 or more years.

The AIDS status was defined based in the initiation of HAART according to the Brazilian Ministry of Public Health criteria (36). Following this guidelines the beginning of antiretroviral therapy is recommended for symptomatic HIV-positive patients. Also, asymptomatic HIV-positive patients, with measures of CD4+ T cell between 350 and 200 cells/mm³; persistent high viral load levels regardless of CD4+ T cell count and those HBV or HCV co-infected with chronic hepatitis should initiate HAART.

This study was approved by the Ethics Committee of Conceição Hospital Group (Num 01-213). All individuals who agreed to participate in the study have at least 18 years old and signed an informed consent. Besides the clinical data, information about socio-demographic features and behaviour were also obtained through questionnaires.

Molecular analysis

Blood samples were collected from all 107 patients through venous puncture. Genomic DNA was isolated using a salting out method (37) and was stored at -20°C. The *MBL2* exon 1 region which contains polymorphisms R52C, G54D and G57E, was amplified by PCR and was sequenced according to Neonate et al, 1998 (38). The *MBL2* promoter region covering the polymorphisms -550 (L or H) and - 221 (X or Y) was amplified using specific primers denominated: L forward, X reverse, H forward and Y reverse, as described by Neonate et al, 1998 (38). To identify the *MBL2* haplotypes, four simultaneous reactions were performed for each sample, using different combinations of primers (LX, LY, HX and HY). Furthermore, a control (cytochrome P450, *CYP2D6*) was amplified in all reactions. The fragments generated were visualized

on 2% agarose (39). After molecular analysis, the genotypes were grouped according to the potential serum level of MBL, as described previously: HYA/LYA and A/A in high serum levels; LXA/LXA, HYA/LYA, and A/O in intermediate serum levels and LXA/O and O/O in low serum levels (40). The polymorphisms A32T in *TLR7* and G1635A in *TLR9* were amplified according protocol described by Cheng et al., 2007 (41). Genotyping analyses were performed using the restriction endonucleases *ApoI* and *BstUI*, and visualized in a 3% agarose gel. The polymorphism T-1237C in *TLR9* was genotyped as described by Carvalho and colleagues (42) and visualized in a 2% agarose gel. CCR5del32, HLA-B27 and HLA-B57 variants were used to control for known genetic factors involved in progression to AIDS.

Statistical analysis

A descriptive analysis was performed by medians and interquartiles ranges or frequencies and percentages. The genotypes were determined by direct counting and the haplotypes inferred using the program Mlocus (43). The chi-square (χ^2) test was applied to check the Hardy-Weinberg equilibrium. Furthermore, differences between the frequency of alleles, genotypes and haplotypes in ethnic groups (Europeus-derived and Africans-derived) were evaluated χ^2 and Fisher's exact test when appropriate. All analyzes for *TLR7*, located in the X chromosome, were made by gender, but only the results for women are showed.

The T-CD4 slope value pre-HAART was estimated by linear regression with the square root of T-CD4+ cell count (44). Only individuals with at least two measures of T CD4+ cell/mm³ in an interval less than two years were considered to determine the slope. To characterize rapid and slow progressors categories non-parametric Mann-Whitney test was used.

To evaluate the influence of genotypes in the progression to AIDS, statistical tests were divided into two steps. The first considered as measure of progression the number of years between the date of seropositivity and the AIDS diagnosis. Kaplan-Meier and log-rank tests were used to make the survival analysis, and then all variables were tested using Cox regression in a univariate model. Variables with $p < 0.1$ were introduced in two multivariate models, one unadjusted and the other adjusted for the presence of the alleles CCR5del32 and HLA-57/B27, which have been associated with slow progression to AIDS (9). Although no correlation was found between genotypes

and ethnic groups, due to differences in allele frequencies reported in previous studies (39,45) conducted survival analyzes in three ways: (a) including all individuals genotyped (b) only European-derived (c) only African-derived.

In the second step, the rapid and slow categories were used to test, through binary logistic regressions, possible associations between these categories, and genotypes/alleles investigated. Such analysis aimed to reduce the effect of small variations in the estimated time of infection for each individual in the final result due to the inability of serological test estimate the exact time of the infection. Initially, a univariate analysis was performed, and then multivariate models were made with and without adjustments by the presence of alleles CCR5del32 and HLA-B57/-B27.

All analyzes were performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS 17.0, Chicago, IL). Were considered statistically significant $p < 0.05$.

Results:

Among the 107 individuals included in the study 59.6% are European-derived and 40.4% African-derived. Sample was composed by 75% of women and 25% of men, ranging from 22 to 67 years old. Moreover, most individuals (86.4%) were infected through unprotected sexual intercourse, followed by injection drug users (8.7%), accidents at work and vertical transmission (5.8%). There were no significant associations between exposure category and presence of co-infections with time of AIDS progression. Socio-demographic and clinical patient characteristics are summarized in Table 1. From clinical data we found 20 patients presenting rapid progression to AIDS, 29 slow progression and 58 patients developed AIDS between 4 and 9 years. Moreover the characterization of categories included significant differences in the value of CD4+ T cell slope, rapid progressors decreased in the number of CD4+ T cell more abruptly (median -0.988; IQ -2.424/-0.399) than the slow progressors (median -0.473; IQ -0.881/-0.160).

Significant differences were observed in the ethnic composition within progression categories, 58.6% of slow progressors patients were African-derived. Given the relevance of such results, the distribution of allelic frequencies between ethnic groups, in the *MBL2* and *TLR7/9* genes were evaluated. Although there are differences between groups, significant results were obtained only for the +1635G/A *TLR9*

polymorphism, in which the G allele was predominantly found in African-derived patients and the A allele was most common in European-derived individuals (Table 2).

Considering the *MBL2* promoter region, 80 individuals were genotyped, alleles L (63.3%) and Y (90.0%) were most frequent and only 3 individuals were X allele carriers. Haplotype combinations LY/LY and LY/HY accounted for 62% of the genetic profiles. It was possible to determine the genotype of *MBL2* exon-1 to 79 individuals and, the frequencies of combined genotypes were 59.7% AA, 36.4% AO and 3.9% OO. MBL levels were inferred from haplotypes, and results pointed to 48.6% of individuals presenting high, 44.6% intermediate and 4.7% low levels. No significant associations between polymorphisms at *MBL2* gene and progression to AIDS were observed on the survival analysis (Figure 1). Due to the low frequency of allele O in African-derived patients, statistical analyses for OO genotype were not supported in this ethnic group. In regard to the Europeans-derived patients, the median time of progression in individuals carrying the OO genotype was lower than in individuals AA and AO carriers (Figure 1, 2B). Moreover, when evaluating the possible relationship between MBL serum levels and AIDS progression it could be observed that the median time was shorter (4 years) among individuals with low levels (Figures 1, 3A).

Evaluation of the 32A/T *TLR7* polymorphism considered only women (n = 81). Only four individuals were TT homozygous. The survival curve for this *TLR7* SNP showed that allele T carriers had a lower median of time progression (7 years) as compared to non-carriers (8 years), although the log rank test and Cox regressions were not significant (Figure 2, 1A-C). Nevertheless, it is interesting to point out that this same trend was seen for AT and TT genotypes.

Polymorphism -1237T/C in *TLR9* gene was evaluated in 102 individuals, among them 3 (2.8%) were homozygous mutant to allele C. Kaplan-Meier curves revealed a significant association between C allele carriers and longer time (10 years) for AIDS progression when compared with the A allele carriers (6 years) (Figure 2, 2A). Such result was similar for TC and CC genotypes ($p < 0.05$). Moreover, this association was also reproduced in the univariate Cox regression (0.587 Hz, 95% CI 0.364 to 0.947, $p < 0.05$) and multivariate (0.616 Hz, 95% CI 0.379 to 1.003, $p < 0.05$), including age and ethnicity as variables (Table 3). However, adjusting the model to the presence of the alleles CCR5del32 and HLA-B27/57 the association was lost. The relevance of the T-1237C *TLR9* SNP seems not to be dependent on the ethnicity, since the same profile

was found in European-derived and African-derived subjects and the frequency of C allele was high in slow progressors of both ethnicities (Figure 2, 2B and 2C). For the polymorphism +1635G/A A in *TLR9* gene significantly different allele frequencies were found between ethnic groups, being G allele the most frequent amongst Europeans-derived and allele A more common in African-derived patients (Figure 2, 3B). Survival analysis, regardless of the ethnicity, was not statistically significant. However, when analyzing the variation within ethnic groups, a statistically significant association of allele A with rapid AIDS progression was observed in European-derived patients. Besides, when the polymorphisms -1237T/C and +1635A/G were evaluated together by Cox regression an association of haplotype GC with slow AIDS progression (0.480 Hz, 95% from 0.249 to 0.928; $P < 0.05$) could be observed (Figure 2, 4A-C). This association was still significant in multivariate analysis including sex and ethnicity (0.432 Hz, 95% CI 0.220 to 0.846, $P < 0.05$) and in the multivariate analyzes adjusted for the presence of alleles CCR5del32 and HLA-B27/57 (0.422 Hz, 95% 0.211 to 0.846, $P < 0.05$) (Table 3). When haplotypes were analyzed by ethnicity, the significance was maintained in Europeans-derived patients.

In the univariate logistic regression analysis, only the -1237T/C *TLR9* genotype was significantly associated with slow AIDS progression (3.73 OD, 1.053 to 13.242 95%, $P < 0.050$), as well as with allele C (0.303 OD, 0.090 to 1.013 95%, $p = 0.053$). But in multivariate models with and without adjustments these associations were lost (data not shown).

Discussion:

Extensive studies have focused on the impact of the host genetic variation in HIV infection course (1,5,6,46,47). Furthermore, many efforts have been made to understand the role of the innate immune system in this pathogenesis (12,27,48). In this regard, the influence of variants on genes that encode proteins which recognize pathogen-associated molecular patterns, as *MBL2*, *TLR7* and *TLR9* in AIDS progression was here evaluated. This study is the first, of our knowledge, to jointly assess *MBL2*, *TLR7* and *TLR9* polymorphisms, previously individually associated with AIDS progression, in an ethnically mixed population.

Current data show that although the epidemic in Brazil has stabilized, most of the mortality is due to the HIV patients discovered to be infected with advanced AIDS

symptoms. Thereby, it was not possible to determine the progression for 96.9% (3,393 HIV-patients) of the investigated patients, creating barriers to clinically monitoring the progression to AIDS. Moreover, the characterization of AIDS progression is extremely diverse (2,46). Time between positive serology for HIV, obtained from thorough retrospectives analysis data, was used to characterize AIDS progression. The decline in CD4+ T cell count can capture, by measuring the slope, a significant difference between progressors classified as rapid (sharp slope) and slow (gentle slope), being a reliable way to evaluate AIDS progression.

Most of the individuals included in this study were women infected through sexual intercourse, following the expectations since in last decade the number of HIV infections diagnosed in women increased dramatically. According to local surveillance data, HIV/AIDS incidence rate in African-derived is 2.5 times higher than in European-derived individuals, which can explain the high frequency of African-derived individuals in our sample (50). Besides, a significant difference in ethnic group proportions among the categories were found, ie, 58.6% of slow progressors are African-derived. Although previous studies have described significant differences between allele frequencies of *MBL2*, *TLR7* and *TLR9* polymorphisms among populations of different ancestries (39,45), subgrouping our patients according to ethnic origin, we found allelic frequency differences only for SNP +1635G/A *TLR9*.

Susceptibility to HIV infection, higher risk of vertical transmission, and accelerated progression to disease were already associated to the presence of allele X in promoter region or allele O in exon-1 of *MBL2* in other studies (22,51,52). However, association with rapid progression was not reproduced in the present work possibly due to the low frequency of this allele (0.1) in our sample in addition to a small number of rapid progressors. Two hypotheses explain the relationship of MBL levels and AIDS progression. The first proposes that lower levels of serum MBL facilitate proliferation of pathogens and thus would be associated with rapid disease progression (53). The second claims that intracellular pathogens, such as HIV, can more easily invade their target cells by opsonization after MBL binding, suggesting that intermediate levels of protein would be beneficial in face of an infection (24). Although extremely subtle and without statistical support, our results show that the median time to progression was higher in individuals with intermediate levels of MBL serum.

According to Oh et al (2009), the presence of mutation 32A/T in the *TLR7* gene in HIV+ patients is associated with decreased production of IFN- α , but does not alter the production of IL-6 (30). They further linked the combination of these factors with the increase in viral load and accelerated progression in infected women. Our study found that the median time to reach the stage of AIDS (six years) for T allele carriers is lower than non-carriers (seven years), but there is no statistical support to reaffirm the results of Oh et al.

Regarding to the *TLR9* gene, only three studies evaluated the influence of variations in this gene in course of HIV infection, all of them in Caucasian cohorts. Bochud et al (2007) found no association between the polymorphism -1237T/C with progression to AIDS, although the frequency of the mutant allele was higher in no-rapid progressors. They also found a significant association of the G allele in +1635G/A SNP with rapid AIDS progression (33). Soon after, Soriano et al (2008) evaluated only the +1635 G/A polymorphism and an association between allele A and rapid progression was observed, in opposition to results of Bochud (32). In addition Pine et al (2009) evaluated both polymorphisms, showing that the presence of allele G in exon-2 of the *TLR9* was associated with slow progression. Such results of Pine corroborate data from Soriano and also shows that the presence of C allele in the promoter was associated with high viral load and rapid progression to AIDS, but this association was not significant after corrections in our study (31).

Concerning the -1237T / C SNP, the results shows that patients carrying the C allele advance to AIDS more slowly (10 years) when compared to non-carriers (6 years) ($p < 0.05$). In addition, multivariate Cox regression adjusted for sex and ethnicity indicated a low probability to initiate AIDS for allele C carriers if compared with non-carriers. So, it was evaluated, by binary logistic regression, the chance of the mutant allele be present in fast and slow categories. In univariate logistic model the association between allele C was maintained with slow progression, but when that variants sex and ethnic origin were introduced, the significance was lost, which also occurred in multivariate to the adjusted model. However for logistic regression the sample number was sharply reduced which notoriously difficult complex models. Nevertheless, the association of the allele C with slow progression does not appear to be influenced by ethnicity because the frequency of the mutant allele increases on slow progressors for both ethnic groups.

As for the polymorphism +1635G/A a significant association of the A allele with rapid progression was found only in European-derived patients, what is in accordance to both Soriano and Pine (31,32). Furthermore, this allele was significantly more prevalent in European-derived individuals and the low frequency of such variant in African-derived patients can somehow have masked the significance within this ethnic group. Regardless, when -1237T/C and +1635G/A haplotypes were analyzed a significant association of GC haplotype with slow progression was observed.

Together, these results showed a potential influence of the *TLR9* gene into AIDS progression highlighting the need for further studies. The involvement of TLRs in HIV infection is still confusing (54,55) , as well as the functional significance of the -1237T/C and +1635G/A variations (56,57). Further studies are necessary to assess the functional effect of these polymorphisms in the receptor expression in the context of HIV infection.

The high frequency of African-derived individuals among slow progressors is quite difficult to explain. Nevertheless it should be pointed that, in our work, all alleles (32A TLR7, -1237C and +1635G TLR9) described as involved in slow progression are more represented among patients of this ethnic origin if compared to Europeans-derived. Ockulicz et al (2009) also showed an increased frequency of African-american individuals among Long-term non-progressors in an USA Cohort (49). This strongly suggests that the genetic background is important in AIDS progression, although genes and variants responsible by this behavior are not yet identified.

The present study evidenced a possible role of variants of the TLR9 gene on AIDS progression in HIV positive Brazilian individuals. These results can contribute to understand the mechanisms involved in immune response HIV infection, allowing new approaches to develop drugs and vaccines. They also evidenced differences between ethnic origin of patients and AIDS progression, with higher frequency of African ancestry individuals among slow-progression patients. Such results are quite important to characterize the HIV epidemic in Brazil and should be taking into account in the epidemic surveillance and management. Moreover, once it is possible to identify genes that influence the clinical course of infection, new prognostic strategies can be carried out. A more comprehensive picture of the human genetic variation is emerging, allowing the comprehension of the role of innate immune factors in shaping the response to HIV.

Reference:

1. Kaur G, Mehra N. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: susceptibility to HIV infection. *Tissue antigens*. 2009 Apr;73(4):289–301.
2. Casado C, Colombo S, Rauch A, Martínez R, Günthard HF, Garcia S, et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PloS one*. 2010 Jan;5(6):e11079.
3. Levy JA. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews*. 1993;57(1):183–289.
4. van Manen D, Delaneau O, Kootstra N a, Boeser-Nunnink BD, Limou S, Bol SM, et al. Genome-wide association scan in HIV-1-infected individuals identifying variants influencing disease course. *PloS one*. 2011 Jan;6(7):e22208.
5. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Weale M, Zhang K, et al. A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. *Science*. 2007;317(5840):944–7.
6. Fellay J, Ge D, Shianna KV, Colombo S, Ledergerber B, Cirulli ET, et al. Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS genetics*. 2009 Dec;5(12):e1000791.
7. Winkler CA, Hendel H, Carrington M, Smith MW, Nelson GW, Brien SJO, et al. Dominant Effects of CCR2–CCR5 Haplotypes in HIV-1 Disease Progression. *Journal Acquir Defici Syndr*. 2004;37(4):13–5.
8. Carrington M, Martin MP, van Bergen J. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends in microbiology*. 2008 Dec;16(12):620–7.
9. Fellay J. Host genome influences on HIV-1 disease. *Antivir Ther*. 2009;14(6):731–8.
10. Biasin M, Clerici M, Piacentini L. Innate immunity in resistance to HIV infection. *The Journal of infectious diseases*. 2010 Nov 1;202 Suppl :S361–5.
11. Levy J a. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends in immunology*. 2001 Jun;22(6):312–6.
12. Sobieszczyk ME, Lingappa JR, McElrath JM. Host genetic polymorphisms associated with innate immune factors and HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6:426–424.
13. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24–32.
14. Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Molecular immunology*. 2005 Feb;42(2):145–52.
15. Chang JJ, Altfeld M. TLR-mediated immune activation in HIV. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):269–70.
16. Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Garred P. Different Molecular Events Result in Low Protein Levels of Mannan-Binding Lectin in Populations from Southeast Africa and South America. *The Journal of Immunology*. 1998;161(31):3169–75.
17. Hansen S, Holmskov U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins. *Immunobiology*. 1998 Aug;199(2):165–89.

18. Larsen F, Madsen HO, Sim RB, Koch C, Garred P. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *The Journal of biological chemistry*. 2004 May;279(20):21302–11.
19. Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue antigens*. 2006 Sep;68(3):193–209.
20. Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet*. 1997 Jan 25;349(9047):236–40.
21. Maas J, de Roda Husman A-MM, Brouwer M, Krol A, Coutinho R, Keet I, et al. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. *AIDS*. 1998 Nov;12(17):2275–80.
22. Boniotto M, Crovella S, Pirulli D, Scarlatti G, Spanò a, Vatta L, et al. Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *Genes and immunity*. 2000 Jun;1(5):346–8.
23. McBride MO, Fischer PB, Sumiya M, McClure MO, Turner MW, Skinner CJ, et al. Mannose-binding protein in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or bacterial infections. *International journal of STD & AIDS*. 1998 Nov;9(11):683–8.
24. Catano G, Agan BK, Kulkarni H, Telles V, Marconi VC, Dolan MJ, et al. Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. *The Journal of infectious diseases*. 2008 Jul 1;198(1):72–80.
25. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*. 2009 Apr;21(4):317–37.
26. Bauer S, Pigisch S, Hangel D, Kaufmann A, Hamm S. Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology*. 2008 Jan;213(3-4):315–28.
27. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010 Jan;7:54.
28. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *Journal of leukocyte biology*. 2003 Oct;74(4):479–85.
29. Moller-Larsen S, Nyegaard M, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA, Borglum AD, et al. Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax*. 2008 Dec;63(12):1064–9.
30. Oh DY, Baumann K, Hamouda O, Eckert JK, Neumann K, Kücherer C, et al. A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *AIDS*. 2009;23(3):297–307.
31. Pine SO, McElrath JM, Bouchud PY. Polymorphisms in TLR4 and TLR9 influence viral load in a seroincident cohort of HIV-1infected individuals. *AIDS*. 2009;23(18):2387–95.
32. Soriano-Sarabia N, Vallejo A, Ramírez-Lorca R, Rodríguez MDM, Salinas A, Pulido I, et al. Influence of the Toll-like receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression. *JAIDS*. 2008 Oct 1;49(2):128–35.
33. Bochud PY, Hersberger M, Taffé P, Bochud M, Stein CM, Rodrigues SD, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 2007;21:441–6.

34. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FDSG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS one*. 2011 Jan;6(2):e17063.
35. Báfica A, Scanga CA, Schito M, Sher A. Influence of Coinfecting Pathogens on HIV Expression: Evidence for a Role of Toll-Like Receptors. *The Journal of Immunology*. 2004;172:7229–34.
36. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV -Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
37. Lahiri DK, Nurnberger JI J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
38. Neonato MG, Lu CY, Guilloud-Bataille M, Lapoumériou C, Nabeel-Jassim H, Dabit D, et al. Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections. *EJHG*. 1999 Sep;7(6):679–86.
39. da Silva GK, Guimarães R, Mattevi VS, Lazzaretti RK, Sprinz E, Kuhmmer R, et al. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *AIDS*. 2011 Feb 20;25(4):411–8.
40. Bouwman LH, Roep BO RA. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol*. 2006;67:247–56.
41. Cheng PL, Eng HL, Chou MH, You HL, Lin TM. Genetic polymorphisms of viral infection-associated Toll-like receptors in Chinese population. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2007 Nov;150(5):311–8.
42. Carvalho A, Marques A, Maciel P RF. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of the Portuguese population. *Mol Cell Probes*. 2007;21(3):316–20.
43. Long JC, Williams RC. An E-M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am J Hum Genet*. 1995;56:799–810.
44. Wolbers M, Babiker A, Sabin C, Young J, Dorrucchi M, Chêne G, et al. Pretreatment CD4 cell slope and progression to AIDS or death in HIV-infected patients initiating antiretroviral therapy--the CASCADE collaboration: a collaboration of 23 cohort studies. *PLoS medicine*. 2010 Feb;7(2):e1000239.
45. Dos Santos B, Valverde J, Rohr P, Monticelo O, Brenol J, Xavier R, et al. TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from Southern Brazil. *Lupus*. 2012 Jan;21(3):302–9.
46. An P, Winkler C a. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics : TIG*. 2010 Mar;26(3):119–31.
47. Chakrabarti L a, Simon V. Immune mechanisms of HIV control. *Current opinion in immunology*. 2010 Aug;22(4):488–96.
48. Borrow P, Bhardwaj N. Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV AIDS*. 2008;3(1):36–44.
49. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, 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 Dec 1;200(11):1714–23.
50. Soares EO. Boletim epidemiológico, num. 44, ano XII. Outubro, 2010; Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre.
 51. Mangano A, Rocco C, Marino SM, Mecikovsky D, Genre F, Aulicino P, et al. Detrimental effects of mannose-binding lectin (MBL2) promoter genotype XA/XA on HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *The Journal of infectious diseases*. 2008 Sep 1;198(5):694–700.
 52. Vallinoto ACR, Menezes-Costa MR, Alves AEM, Machado LFA, de Azevedo VN, Souza LLB, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. *Molecular immunology*. 2006 Mar;43(9):1358–62.
 53. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clinical infectious diseases*. 2003 Dec 1;37(11):1496–505.
 54. Brichacek B, Vanpouille C, Kiselyeva Y, Biancotto A, Merbah M, Hirsch I, et al. Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis. *PloS one*. 2010 Jan;5(9).
 55. Equils O, Schito ML, Karahashi H, Madak Z, Yarali A, Michelsen KS, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication. *Journal of immunology*. 2003 May 15;170(10):5159–64.
 56. Ng, M. T. H., Van't Hof, R., Crockett, J. C., Hope, M. E., Berry, S., Thomson, J., McLean, M. H., et al. (2010). Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infection and immunity*, 78(3), 1345-52.
 57. Novak, N., Yu, C.-F., Bussmann, C., Maintz, L., Peng, W.-M., Hart, J., Hagemann, T., et al. (2007). Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy*, 62(7), 766-72.

Tables

Table 1 - Socio-Demographic and clinical characteristic the study sample.

	Rapids (20)	Slows (29)	Others (58)	Overall (107)
Age (years, IQ)	40(34-50)	39(34-47)	39(33-45)	39 (33-47)
Gender (females)	55.0	89.7	77.6	75.7
Ethnicity				
European-derived	57.9	39.3*	71.5	59.6
African-derived	42.1	60.7	28.5	40.4
Exposure category				
Heterosexual	75.0	78.6	78.3	77.7
MSM	15.0	0.0	8.7	7.8
IDU	5.0	10.7	8.7	8.7
others	5.0	10.7	4.4	5.8
Co-infection				
HCV	10.0	20.7	24.5	21.5
HBV	15.0	3.4	6.1	7.5

* Significantly more African-derived individuals in slow progressors ($p < 0.05$). **Notes:** except for age data are showed %; Exposure category: MSM, Men Who Have Sex With Men; IDU, Injection Drug User; others includes vertical transmission and occupational accident.

Table 2. Frequencies of alleles and haplotypes overall HIV-positive patients evaluated and in Europeans and Africans-derived subgroups.

Gene	Polymorphisms			Allele/haplotypes frequencies		
				Overall	European ^a	African ^b
CCR5	ccr5del32 n=101	rs333	wt	0.950	0.950	0.952
			del32	0.050	0.050	0.048
MBL2 (10q21.1) promoter	-550G/C (H/L) n=80	rs11003125	G	0.367	0.357	0.344
			C	0.633	0.643	0.656
	-221G/C (Y/X) n=80	rs7096206	G	0.900	0.929	0.891
			C	0.100	0.071	0.109
	haplotypes (-550/-221) n=79		LX	0.163	0.133	0.219
			LY	0.725	0.733	0.750
	combined haplotypes LH/YX n=80		HY	0.525	0.511	0.563
			LY/LY	0.325	0.357	0.313
			HY/HY	0.188	0.190	0.156
			LX/LX	0.013	0.000	0.031
LY/HY			0.300	0.310	0.344	
LY/LX			0.113	0.119	0.125	
MBL2 (10q21.1) exón1	R52C (D allele) n=79	rs5030737	C	0.912	0.978	0.935
			T	0.088	0.022	0.065
	G54D (B allele) n=79	rs1800450	G	0.858	0.811	0.903
			A	0.142	0.189	0.097
	G57E (C allele) n=78	rs1800451	G	0.972	0.956	0.903
			A	0.028	0.022	0.097
AO n=79		AA	0.608	0.614	0.567	
		AO	0.354	0.341	0.400	
		OO	0.038	0.045	0.033	
MBL2 (10q21.1) [promoter+exón1]	MBL2 levels n=74		high	0.486	0.537	0.400
			intermediate	0.446	0.366	0.567
			low	0.047	0.098	0.033
TLR7 (Xp22.3)*	32A/T n=81	rs179008	A	0.843	0.793	0.903
			T	0.157	0.207	0.097
TLR9 (3p21.3)	-1237T/C n=102	rs5743836	T	0.803	0.828	0.756
			C	0.197	0.172	0.244
	+1635G/A n=103	rs352140	G	0.505	0.457 **	0.585 **
			A	0.495	0.543**	0.415**
	haplotypes (-1237 +1635) n=101		TA	0.243	0.237	0.294
			TG	0.437	0.458	0.390
CA			0.058	0.051	0.073	
CG			0.262	0.254	0.293	

Notes: ^a European-derived: TLR9 = 59, MBL=45; ^b African-derived: TLR9 = 41, MBL= 32; * only female; ** significant difference

Table 3. Polymorphisms -1237T/C and haplotype -1237/+1635 *TLR9* gene Multivariate Cox proportional hazards regression analysis to assess the independent effects the variables significant in univariate tests. No-adjusted and adjusted models for CCR5del32, HLA-B57/HLA-B27 presence.

	<i>p</i>	HZ	IC 95%			<i>p</i>	HZ	IC 95%	
Gender	0.066	1.591	0.969	2.612	Gender	0.027	1.841	1.071	3.165
Ethnicity	0.033	1.673	1.044	2.681	Ethnicity	0.020	0.530	0.311	0.906
Allele C	0.050	0.616	0.379	1.003	del32	0.802	1.117	0.469	2.659
					B57B27	0.911	1.069	0.330	3.466
					Allele C	0.062	0.600	0.351	1.026
Gender	0.063	1.593	0.974	2.606	Gender	0.045	1.664	1.011	2.738
Ethnicity	0.020	1.763	1.093	2.842	Ethnicity	0.014	1.846	1.135	3.003
Haplotypes					del32	0.859	1.076	0.479	2.416
T G	0.341	0.763	0.438	1.331	B57B27	0.905	1.053	0.450	2.466
C A	0.207	0.525	0.193	1.429	Haplotypes				
C G	0.014	0.432	0.220	0.846	T G	0.260	0.720	0.406	1.276
					C A	0.203	0.519	0.189	1.425
					C G	0.015	0.422	0.211	0.846

Note: The reference for statistical analysis used: female (gender), European-derived (ethnicity), no (C allele), no (allele del32), no (allele B57/B27), yes (haplotype TA).

Figure 01

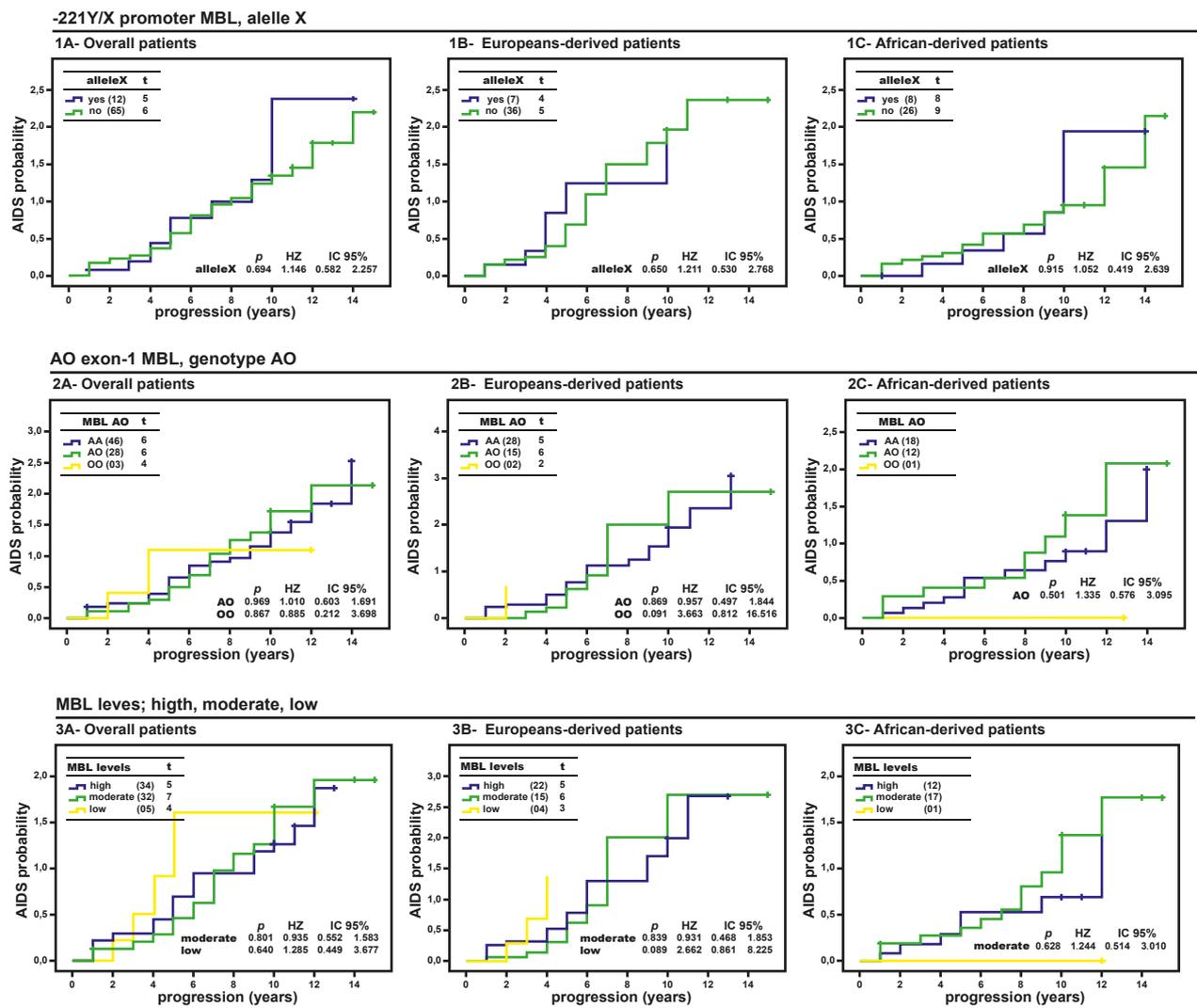
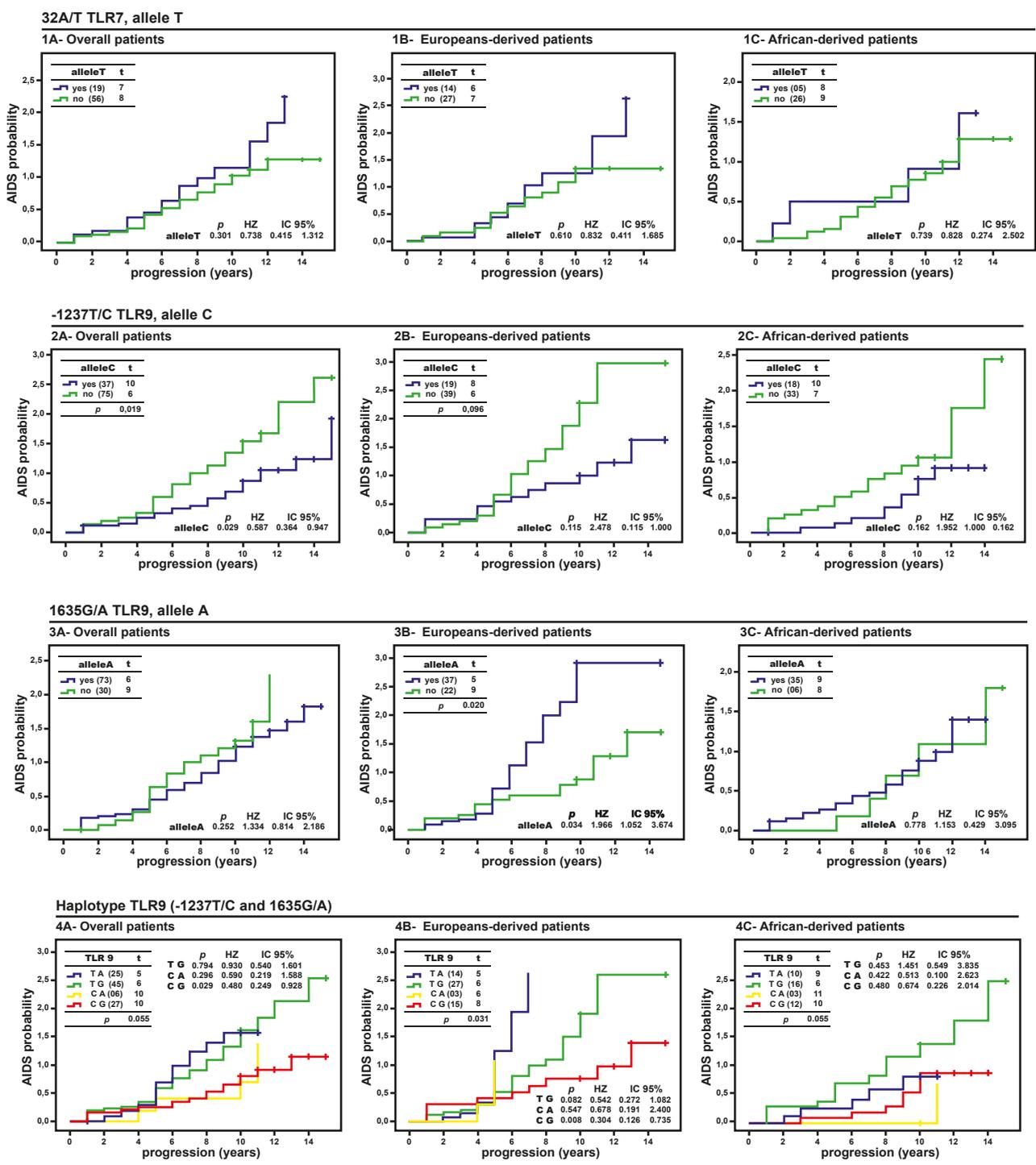


Figure 02



Legends

Figure 1- Influence of polymorphisms in promoter and exon-1 sequences of MBL2 on the rate of disease progression in the HIV in ethnic groups different. A, B, and C, Kaplan-Meier plots demonstrating AIDS progression in overall patients (A), as well as in both the European-derived (B) and African-derived (C) groups. In the panel 1 (1A, 1B and 1C) at the top, the number of individuals with the presence or absence of the allele X and the median time to correspondent progression by log rank test. At the bottom, to regression Cox univariate using as a reference no X allele. In the panel 2 (2A, 2B and 2C), “A” indicates wild-type allele and “O” indicates MBL2 B, C, and D alleles combined; the reference category for statistical analysis was the A/A genotype. In the panel 3 (3A, 3B and 3C), the levels MBL-2 was estimated by genotypes promoter and exon-1 combined (seen methods) and reference used was the high category. Analysis of exon-1 and promoter MBL-2 in Africans-derived had no statistical support due to sample size. P significance value <0,01 to univariate models and <0,05 multivariate; CI, confidence interval; RH, relative hazards.

Figure 2- Influence of polymorphisms in TLR7 and TLR9 on the rate of disease progression in the HIV in ethnic groups different. A, B, and C, Kaplan-Meier plots demonstrating AIDS progression in overall patients (A), as well as in both the European-derived (B) and African-derived (C) groups. In the panel 1 (1A, 1B and 1C) at the top, the number of individuals with the presence or absence of the allele T of the 32A/T TLR7 polymorphism and the median time to correspondent progression by log rank test. At the bottom, to regression Cox univariate using as a reference no T allele. In the panel 2 (2A, 2B and 2C), resulted to allele C of the -1237T/C TLR9 polymorphism. In the panel 3 (3A, 3B and 3C), resulted to allele A of the +1635G/A TLR9 polymorphism. In the panel 4 (4A, 4B and 4C), the haplotypes to TLR9 polymorphisms estimated by MLocus software. The reference used was the TA haplotype. P significance value <0,01 to univariate models and <0,05 multivariate; CI, confidence interval; RH, relative hazards.

Capítulo 6: Discussão

.....

Existe uma grande resistência por parte da população, por diversos fatores, em testar-se para infecção pelo HIV. A falta do diagnóstico leva a um acesso tardio ao acompanhamento clínico e isso impede a determinação da progressão à AIDS. Apesar de grandes esforços terem sido feitos, através da análise minuciosa dos dados clínicos, foi possível estimar o tempo de progressão para a AIDS de apenas 0,03% dos indivíduos investigados. Embora a forma de obtenção dos dados seja um fator limitante, conseguimos confirmar a caracterização da progressão dos pacientes através da diferença significativa do *slope* das células T CD4+ entre os pacientes que progrediram de forma rápida e os pacientes que progrediram (ou progridem) de forma lenta à AIDS.

A maior parte dos indivíduos incluídos no estudo foram mulheres infectadas através de relação sexual, o que era esperado visto que na última década o número de infecções pelo HIV diagnosticados em mulheres tem aumentado drasticamente (DST E AIDS, 2011). Em relação à etnia, segundo dados da Secretaria Municipal da Saúde de Porto Alegre, a taxa de incidência de HIV/AIDS em negros é 2,5 vezes maior do que em brancos, explicando por que encontramos um aumento no número de indivíduos autodeclarados negros (brancos 0,59; negros 0,41) se comparados com a população como um todo nesta cidade (brancos 0,87; negros 0,13). Diferenças étnicas em uma mesma população de estudo podem ser importantes ferramentas para investigar a influência de variações genéticas do hospedeiro na suscetibilidade e na progressão de doenças infecciosas. Nossos resultados mostraram que indivíduos Afrodescendentes progrediram em uma mediana de tempo maior do que indivíduos Eurodescendentes ($p < 0,05$). Embora existam poucos dados na literatura a respeito, encontramos um estudo realizado em uma população miscigenada Norte Americana ($n=4.586$ indivíduos HIV-positivos), que relata um número significativamente maior de Afrodescendentes com a definição clínica de *long-term nonprogressor* e *elite controllers* quando comparados com a população Caucásiana. Este trabalho propunha definir categorias de progressão para AIDS (Ockulicz et al., 2009). Uma hipótese para explicar as diferenças encontradas entre os grupos étnicos são diferenças na estruturação genética desses indivíduos.

Avaliamos o papel de polimorfismos em genes envolvidos no reconhecimento de moléculas virais, os quais são capazes de sinalizar para o organismo uma invasão, na progressão para AIDS. Corroborando os dados já publicados nossos resultados mostram que variações genéticas no hospedeiro, em particular variações em genes da resposta imune inata, contribuem para a progressão da doença.

Não encontramos diferenças significativas entre as frequências alélicas dos polimorfismos avaliados no gene *MBL2* e os grupos étnicos estudados. Contudo, as análises genotípicas para este gene foram prejudicadas devido a dificuldades técnicas que reduziram o tamanho amostral, dificultando inferências estatísticas. Apesar disso, a presença do alelo X no promotor e do alelo O no exon-1 parecem estar relacionados a uma progressão rápida para AIDS. E ainda, nossos resultados apontam para uma relação entre a progressão e os níveis intermediários de MBL.

As frequências alélicas encontradas em indivíduos saudáveis para o polimorfismo 32A/T no *TLR7* estão de acordo com o descrito por Santos *et al* (2011) na população de Porto Alegre. Por estar localizado no cromossomo X as análises para a variante do *TLR7* foram realizadas por sexo, o que reduziu o tamanho amostral e, conseqüentemente, dificultou as associações estatísticas. Apesar disso, podemos observar que o tempo mediano dos portadores do alelo T para chegar ao estágio de AIDS (6 anos) foi menor quando comparados com os não portadores (7 anos). Segundo Oh *et al* (2007) esta alteração no gene do *TLR7* leva a redução na produção de IFN-I, o qual é crucial para ativação da resposta antiviral e não altera a produção de citocinas proinflamatórias como a IL-6 demonstrando que o NF-kB continua sendo ativado. Segundo o mesmo autor, este cenário molecular esta envolvido com redução do tempo médio para início da imunodeficiência, pois reduz a resposta antiviral e mantém a replicação do vírus pela ligação do NF-kB as LTRs virais.

Com relação ao SNP -1237T/C no *TLR9*, Bouchud *et al* (2007) não encontrou associação do alelo C com a progressão e, Pine *et al* (2009), observou uma associação deste alelo com a progressão rápida, a qual não foi mantida após correções estatísticas. Nossos resultados demonstraram uma associação significativa entre presença do alelo C e a progressão lenta para a AIDS. Estudos anteriores relataram uma relação entre a variante -1237C com a maior expressão de *TLR9* na presença de NF-kB, pois essa alteração no promotor levaria a uma maior afinidade a esse fator de transcrição (Novak *et al.* 2007). Esses resultados parecem ser conflitantes, visto que a maior concentração de *TLR9* levaria a maior detecção do DNA proviral e conseqüentemente a maior

ativação do NF- κ B, o que também aumentaria a taxa de replicação do vírus. Já para o polimorfismo +1635G/A nossos resultados estão de acordo com Pine *et al.* (2009) e Soriano *et al.* (2008), os quais correlacionaram a presença do alelo A com a progressão rápida em indivíduos em Caucasianos. Contudo, não encontramos esta associação entre os indivíduos Afrodescendentes, isso pode ser resultado da presença de outras variantes que levam a um desfecho contrário, mascarando o efeito fenotípico da presença do alelo A neste grupo étnico. Estudos que avaliam o envolvimento do TLR9 no curso da infecção pelo HIV são escassos e inconclusivos. Além disso, avaliações funcionais em células com os polimorfismos -1237T/C e +1635G/A na presença do HIV precisam ser realizadas.

A relação entre os indivíduos Afrodescendentes e a progressão lenta é difícil de explicar. No entanto, observamos que os alelos 32A *TLR7*, -1237C e +1635G *TLR9*, envolvidos com a progressão lenta, estão mais representados nos indivíduos Afrodescendentes, se comparados com os Eurodescendentes. Isto reforça o envolvimento do *background* genético na progressão para a AIDS, embora os genes e as variantes responsáveis pelos diferentes desfechos ainda não tenham sido completamente identificados.

Este estudo trouxe, através de análises retrospectivas de dados clínicos, novas informações sobre fatores que podem influenciar a progressão para AIDS. Nossos resultados podem contribuir para a compreensão de mecanismos envolvidos na resposta imune durante a infecção pelo HIV, permitindo novas abordagens no desenvolvimento de medicamentos e vacinas. Salientamos que a caracterização da progressão através de dados retrospectivos, utilizando medidas de células T CD4+ como fator de confirmação, parece ser uma ferramenta viável em países onde existam sistemas uniformizados de notificação de AIDS, contudo coortes são praticamente inexistentes.

Além disso, nossos resultados são importantes na caracterização da epidemia do HIV no Brasil. Visto que somos um país miscigenado, novas investigações devem ser realizadas para compreendermos o papel desta diversidade genética na infecção pelo HIV. E, uma vez que seja possível identificar genes que influenciam no curso clínico da infecção, novas estratégias de prognóstico e acompanhamento poderão ser realizadas.

Capítulo 7: Considerações finais

.....

Este estudo faz parte de um projeto que pretende investigar a influência de variações genéticas no sistema imune do hospedeiro e a diversidade genética viral na progressão para AIDS. Nesse sentido, investigações no perfil da resposta imune adaptativa, assim como, avaliações de mutações em genes virais estão sendo realizadas nesse grupo amostral. Com relação às análises das variantes do sistema imune inato, foco deste trabalho, pretendemos concluir a avaliação do gene da *MBL2* e então, avaliarmos de forma conjunta os oito polimorfismos investigados. Análises estatísticas, como a Análise dos Componentes Principais (CPA), podem ser boas ferramentas para trazer novas perspectivas sobre o papel de um conjunto gênico na progressão para a AIDS. Com isso, visamos esclarecer alguns mecanismos envolvidos na resposta imune frente à infecção pelo HIV, permitindo novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos e vacinas.

REFERÊNCIAS:

.....

- An, P., & Winkler, C.A. (2010). Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics*, 26(3), 119-31.
- Báfica, A., Scanga, C.A., Schito, M., & Sher, A. (2004). Influence of Coinfecting Pathogens on HIV Expression: Evidence for a Role of Toll-Like Receptors. *The Journal of Immunology*, 172, 7229-7234.
- Benkirane M., Jin D.Y., Chun R.F., Koup R.A. (1997). Mechanism of Transdominant Inhibition of CCR5-mediated HIV-1 Infection by ccr5Delta 32. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 30603-30606.
- Berger, E.A., Murphy, P.M., & Farber, J.M.(1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology*, 17, 657-700.
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3), 305-15.
- Bochud, P., Hersberger, M., Taffé, P., Bochud, M., Stein, C.M., Rodrigues, S.D., Calandra, T., et al. (2007). Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*, 21, 441-446.
- Boldt, A.B.W., Messias-Reason, I.J., Meyer, D., Schrago, C.G., Lang, F., Lell, B., Dietz, K., et al. (2010). Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (MBL2) haplotypes. *BMC genetics*, 11, 38.
- Boniotto, M., Crovella, S., Pirulli, D., Scarlatti, G., Spanò, A., Vatta, L., Zezlina, S., et al. (2000). Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *Genes and immunity*, 1(5), 346-8.
- Borrow, P. & Bhardwaj, N. (2008). Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV AIDS*, 3(1), 36-44.
- Bowie, A., & O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology*, 67(4), 508-14.
- Brenchley, J.M., & Douek, D.C. (2008). HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal immunology*, 1(1), 23-30.
- Brichacek, B., Vanpouille, C., Kiselyeva, Y., Biancotto, A., Merbah, M., Hirsch, I., Lisco, A., et al. (2010). Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis. *PloS one*, 5(9).

- Carrington, M., & O'Brien, S. J. (2003). The influence of HLA genotype on AIDS. *Annual review of medicine*, 54, 535-551.
- Carrington M., Martin M.P., & vanBergen J. (2008). KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends in microbiology*, 16(12), 620-627.
- Carty, M., & Bowie, a G. (2010). Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clinical and experimental immunology*, 161(3), 397-406.
- Casado, C., Colombo, S., Rauch, A., Martínez, R., Günthard, H. F., Garcia, S., Rodríguez, C., et al. (2010). Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PloS one*, 5(6), e11079.
- Casanova, J.L., Abel, L., & Quintana-Murci, L. (2011). Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual review of immunology*, 29, 447-91.
- Catano, G., Agan, B. K., Kulkarni, H., Telles, V., Marconi, V.C., Dolan, M.J., & Ahuja, S.K. (2008). Independent effects of genetic variations in mannose-binding lectin influence the course of HIV disease: the advantage of heterozygosity for coding mutations. *The Journal of infectious diseases*, 198(1), 72-80.
- Chakrabarti, L.A, & Simon, V. (2010). Immune mechanisms of HIV control. *Current opinion in immunology*, 22(4), 488-96. Elsevier Ltd.
- Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H., & Clavel, F. (1994). HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *Journal of molecular biology*, 241(5), 651-62.
- Chockalingam, A., Brooks, J. C., Cameron, J. L., Blum, L. K., & Leifer, C.A. (2009). TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunology and cell biology*, 87(3), 209-17.
- Costin, J.M. (2007). Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology journal*, 4, 100.
- Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - *Boletim epidemiologico AIDS-DST* (2011). Ministério da Saúde - Brasília, BR.
- Deeks, S.G., & Walker, B.D. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*, 27(3), 406-416.
- Dommett, R.M., Klein, N., & Turner, M.W. (2006). Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue antigens*, 68(3), 193-209.
- Dos Santos, B., Valverde, J., Rohr, P., Monticielo, O., Brenol, J., Xavier, R., & Chies, J. (2012). TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from Southern Brazil. *Lupus*, 21(3), 302-9.

- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., et al. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 381(6584), 667-73. d
- Edward C,K. (2011). *Pathology of AIDS*. Mercer University School of Medicine Savannah (22nd ed., pp. 01-376).
- Ekene, O.C. (2008). Cytokines and HIV/AIDS: a critical look at the existing relationship between them. *Roumanian archives of microbiology and immunology*, 67(3-4), 67-80.
- Equils, O., Faure, E., Thomas, L., Bulut, Y., Trushin, S., & Arditi, M. (2001). Bacterial lipopolysaccharide activates HIV long terminal repeat through Toll-like receptor 4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(4), 2342-7.
- Equils, O., Schito, M. L., Karahashi, H., Madak, Z., Yarali, A., Michelsen, K. S., Sher, A., et al. (2003). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication. *Journal of immunology*, 170(10), 5159-64.
- Ezekowitz, R. A. (2003). Role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *The Journal of infectious diseases*, 187, S335-9.
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., & Butto, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection : a brief overview, 46(1), 5-14.
- Fauci, Anthony S. (2003). HIV SPECIAL HIV and AIDS : 20 years of science. *Nature Medicine*, 9(7), 839-843.
- Fiane, A. E., Ueland, T., Simonsen, S., Scott, H., Endresen, K., Gullestad, L., Geiran, O. R., et al. (2005). Low mannose-binding lectin and increased complement activation correlate to allograft vasculopathy, ischaemia, and rejection after human heart transplantation. *European heart journal*, 26(16), 1660-5.
- Finzi D., Hermankova M., Pierson T., Carruth L.M., Buck C., Chaisson R.E., Quinn T.C., et al (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, 278(5341), 1295-300.
- Fujita, T., Matsushita, M., & Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews*, 198(1), 185-202.
- Gallo, R., Sarin, P., Gelmann, E., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V., Mann, D., et al. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 865-867.
- Garred P., Madsen H.O., Balslev U., Hofmann, B., Pedersen, C., Gerstoft, J., & Svejgaard, A. (1997). Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet*, 349(9047), 236-40.

- Garred P. (2008). Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 6), 1461-6.
- Go, E. P., Irungu, J., Zhang, Y., Dalpathado, D. S., Liao, H.-xin, Sutherland, L. L., Alam, S. M., et al. (2008). Glycosylation site-specific analysis of HIV envelope proteins reveals major differences in glycosylation site occupancy, glycoform profiles, and antigenic epitopes. *Journal of Proteome Research*, 7, 1660-1674.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Latz, E., & Wagner, H. (2008). The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, 28(3), 315-23.
- Hamann, L., Glaeser, C., Hamprecht, A., Gross, M., Gomma, A., & Schumann, R. R. (2006). Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 364(1-2), 303-7.
- Haynes, B. F., Pantaleo, G., & Fauci, A. S. (1996). Toward an Understanding of the Correlates of Protective Immunity to HIV Infection. *Science*, 271(5247), 324-328.
- Hladik, F., & McElrath, M. J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature reviews. Immunology*, 8(6), 447-457.
- Ji, X., Gewurz, H., & Spear, G. T. (2005). Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Molecular immunology*, 42(2), 145-52.
- Kaur, G., & Mehra, N. (2009). Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: susceptibility to HIV infection. *Tissue antigens*, 73(4), 289-301.
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell death and differentiation*, 13(5), 816-25.
- Kawai, T., & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*, 21(4), 317-337.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). Pathogen recognition by innate receptors. *Journal of infection and chemotherapy* 14(2), 86-92.
- Larsen, F., Madsen, H.O., Sim, R.B., Koch, C., & Garred, P. (2004). Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *The Journal of biological chemistry*, 279(20), 21302-11.
- Lazarus, R., Klimecki, W.T., Raby, B.A., Vercelli, D., Palmer, L.J., Kwiatkowski, D.J., Silverman, E. K., et al. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene: frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*, 81(1), 85-91.
- Lee, H. K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., & Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*, 315(5817), 1398-401.

- Levy, J.A. (1993). Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews*, 57(1), 183-289.
- Maas, J., Husman, A.M.R., Brouwer, M., Krol, A., Coutinho, R., Keet, I., van Leeuwen, R., et al. (1998). Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. *AIDS*, 12(17), 2275-2280.
- Madsen, Hans O., Satz, M.L., Høgh, B., & Garred, P. (1998). Different Molecular Events Result in Low Protein Levels of Mannan-Binding Lectin in Populations from Southeast Africa and South America. *The Journal of Immunology*, 161(31), 3169-3175.
- Malik, S., Arias, M., Di Flumeri, C., Garcia, L. F., & Schurr, E. (2003). Absence of association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 infection in a Colombian population. *Immunogenetics*, 55(1), 49-52.
- Martinelli, E., Cicala, C., Van Ryk, D., Goode, D. J., Macleod, K., Arthos, J., & Fauci, A. S. (2007). HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha secretion in plasmacytoid dendritic cells. *PNAS* 104(9), 3396-401.
- McBride, M.O., Fischer, P.B., Sumiya, M., McClure, M.O., Turner, M.W., Skinner, C.J., Weber, J.N., et al. (1998). Mannose-binding protein in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or bacterial infections. *International journal of STD & AIDS*, 9(11), 683-8.
- McMichael, A. J., & Rowland-jones, S. L. (2001). Cellular immune responses to HIV. *Nature*, 410, 980-987.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. a. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295-8.
- Migueles, S.A., & Connors, M. (2010). Long-term nonprogressive disease among untreated HIV-infected individuals: clinical implications of understanding immune control of HIV. *JAMA*, 304(2), 194-201.
- Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. (2008). Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV - Brasil (pp. 01-133). Ministério da Saúde, Brasília - DF:.
- Misch, E.A., & Hawn, T.R. (2008). Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clinical science*, 114(5), 347-60.
- Montagnier, L. (2002). Historical essay: A history of HIV discovery. *Science*, 298(5599), 1727-8.
- Murphy, K., Travers, P., & Mark, W. (2010). *Imunobiologia de Janeway*. (7th ed., pp. 01-908). São Paulo, Ed Artmed.
- Moller-Larsen, S., Nyegaard, M., Haagerup, A., Vestbo, J., Kruse, T.A., & Borglum, A.D. (2008). Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax*, 63(12), 1064-9.

- Ng, M.T.H., Van't Hof, R., Crockett, J.C., Hope, M.E., Berry, S., Thomson, J., McLean, M.H., et al. (2010). Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infection and immunity*, 78(3), 1345-52.
- Novak, N., Yu, C.F., Bussmann, C., Maintz, L., Peng, W.M., Hart, J., Hagemann, T., et al. (2007). Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy*, 62(7), 766-72.
- Oh, D.Y., Baumann, K., Hamouda, O., Eckert, J. K., Neumann, K., Kücherer, C., Bartmeyer, B., et al. (2009). A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *AIDS*, 23(3), 297-307.
- Okulicz, J. F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., et al. (2009). 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*, 200(11), 1714-23.
- O'Brien SJ, & Nelson GW (2004). Human genes that limit AIDS. *Nature genetics*, 36(6), 565-74.
- O'Brien, Hartigan, D., Martin, J., Esinhart, A., Hill, S., B., Marc, R., Michael S., S., et al. (1996). Changes in plasma HIV-1 rna and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. *The New England Journal of Medicine*, 15, 426-431.
- O'Connell, K.A., Bailey, J.R., & Blankson, J.N. (2009). Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends in pharmacological sciences*, 30(12), 631-7.
- Paroli, M., Propato, A., Accapezzato, D., Francavilla, V., Schiaffella, E., & Barnaba, V. (2001). The immunology of HIV-infected long-term non-progressors a current view. *Immunology letters*, 79(1-2), 127-129.
- Pine, S.O., McElrath, J. M., & Bouchud, P.-Y. (2009). Polymorphisms in TLR4 and TLR9 influence viral load in a seroincident cohort of HIV-1infected individuals. *AIDS*, 23(18), 2387-2395.
- Prohászka, Z., Thiel, S., Ujhelyi, E., Szlávik, J., Bánhegyi, D., & Füst, G. (1997). Mannan-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of disease. *Immunology letters*, 58(3), 171-5.
- Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K. a, & Holmes, E. C. (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nature reviews. Genetics*, 5(1), 52-61.
- Reis, A.C. (2007). Mortality for AIDS in Brazil : An Exploratory Study of its Temporal Evolution. *Servico de Epidemiologia - Brasil*, 16(3), 195-205.
- Ricklin, D., & Lambris, J.D. (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nature biotechnology*, 25(11), 1265-75.

- Saarloos, M. N., Lint, T. F., & Spear, G. T. (1995). Efficacy of HIV-specific and “antibody-independent” mechanisms for complement activation by HIV-infected cells. *Clinical and experimental immunology*, 99(2), 189-95.
- Sanders, C. M., Cruse, J. M., & Lewis, R. E. (2008). Toll-like receptors, cytokines and HIV-1. *Experimental and molecular pathology*, 84(1), 31-6.
- Schechter, M., & Rachid, M. (2005). *Manual de HIV/AIDS* (8th ed., pp. 07-11). Rio de Janeiro, Revinter.
- Schwartz, S.A, & Nair, M.P. (1999). Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 6(3), 295-305.
- Seelamgari, A. (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Frontiers in Bioscience*, 9(1-3), 2388.
- Sobieszczyk M.E., Lingappa J.R., & McElrath J.M. (2011). Host genetic polymorphisms associated with innate immune factors and HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS*, 6, 426-424.
- Song, Y., Zhuang, Y., Zhai, S., Huang, D., Zhang, Y., Kang, W., Li, X., et al. (2009). Increased expression of TLR7 in CD8(+) T cells leads to TLR7-mediated activation and accessory cell-dependent IFN-gamma production in HIV type 1 infection. *AIDS research and human retroviruses*, 25(12), 1287-95.
- Soriano-Sarabia, N., Vallejo, A., Ramírez-Lorca, R., Rodríguez, M. D. M., Salinas, A., Pulido, I., Sáez, M. E., et al. (2008). Influence of the Toll-like receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 49(2), 128-35.
- Sundstrom, J.B., Little, D.M., Villinger, F., Ellis, J.E., & Ansari, A.A. (2004). Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. *Journal of immunology*, 172(7), 4391-401.
- Tan, Y., Liu, L., Luo, P., Wang, A., Jia, T., Shen, X., Wang, M., et al. (2009). Association between mannose-binding lectin and HIV infection and progression in a Chinese population. *Molecular immunology*, 47(2-3), 632-638.
- Taylor, B.S., & Hammer, S.M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *The New England journal of medicine*, 359(18), 1965-1966.
- Thiel, S., Holmskov, U., Hviid, L., Laursen, S. B., & Jensenius, J. C. (1992). The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clinical and experimental immunology*, 90(1), 31-5.
- Turner, M. (2003). The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology*, 40(7), 423-429.

- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S24-32. Elsevier Ltd.
- UNAIDS. (2010). *Global report. Unaid report on the global aids epidemic, 2010* (pp. 01-364).
- Vallinoto, A.C.R., Menezes-Costa, M.R., Alves, A.E.M., Machado, L.F.A., de Azevedo, V.N., Souza, L. L. B., Ishak, M.D.O.G., et al. (2006). Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection. *Molecular immunology*, 43(9), 1358-62.
- Vallinoto A.C.R., Freitas F.B., Guirelli I., Fernando L., Machado A., Azevedo V.N., et al. (2011). Characterization of mannose-binding lectin plasma levels and genetic polymorphisms in HIV-1-infected individuals. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(1), 1-3.
- Vicenzi E., Biswas P., Mengozzi M. (1997). Role of pro-inflammatory controlling cytokines in HIV replication. *Journal of Leukocyte Biology*, 62(July), 34-40.
- Visco-Comandini, U., Aleman, S., Yun, Z., & Sönnernborg, A. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 variability and long-term non-progression. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 15(3), 299-303.
- Wang, C.H., Eng, H.L., Lin, K.H., Chang, C.H., Hsieh, C.A., Lin, Y.L., & Lin, T.M. (2011). TLR7 and TLR8 gene variations and susceptibility to hepatitis C virus infection. *PloS one*, 6(10), e26235.
- Winkler, C.A., Hendel, H., Carrington, M., Smith, M.W., Nelson, G.W., Brien, S.J.O., Phair, J., et al. (2004). Dominant Effects of CCR2–CCR5 Haplotypes in HIV-1 Disease Progression. *Journal Acquir Defici Syndr*, 37(4), 13-15.
- Wu, L., & RamaniKewal, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews. Immunology*, 6(11), 859-68.
- da Silva, G. K., Guimarães, R., Mattevi, V.S., Lazzaretti, R.K., Sprinz, E., Kuhmmer, R., Brandão, L., et al. (2011). The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *AIDS*, 25(4), 411-8.
- van Manen, D., Delaneau, O., Kootstra, N.A, Boeser-Nunnink, B.D., Limou, S., Bol, S.M., Burger, J.A, et al. (2011). Genome-wide association scan in HIV-1-infected individuals identifying variants influencing disease course. *PloS one*, 6(7), e22208.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

PESQUISADORES: Rúbia Marília de Medeiros¹⁻², Maria Cristina Cotta Matte¹⁻², Breno Riegel Santos⁶, Sabrina Esteves de Matos Almeida¹, José Artur Bogo Chies²⁻⁴.

1. Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FEPPS	Tel: (51)3352-0336
2. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular UFRGS	Tel: (51)3308-6722
3. Aluno de Graduação Biologia - UFRGS	Tel: (51)3308-6000
4. Laboratório de Imunogenética – UFRGS	Tel: (51)3308-6737
6. Serviço de Infectologia - Hospital Nossa Senhora da Conceição	Tel: (51)3357-2126

O Estudo: Este é um projeto de pesquisa que pretende avaliar os diversos fatores imunológicos que estão envolvidos na progressão da AIDS. Dentre as doenças causadas por agentes virais, sem dúvida, a AIDS têm sido o alvo de grande preocupação das últimas décadas. A avaliação desses fatores imunológicos pode propiciar um maior entendimento sobre os mecanismos imunológicos 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 alvos para medicamentos ou desenvolvimento de vacinas. Serão selecionados para este estudo, pacientes HIV positivo maiores de 18 que concordarem em participar deste projeto.

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. Ao final desse trabalho as amostras de DNA e serão preservadas de forma que possam eventualmente ser utilizadas em futuras pesquisas sobre o mesmo assunto.

Quais os riscos em participar? Não há riscos em participar do projeto. No entanto, poderá haver formação de um hematoma no braço em função da coleta de sangue. Além deste, não há qualquer outro risco para a paciente.

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.

Nome do Voluntário: _____

Assinatura do Voluntário: _____ Data Nasc.: ____/____/____

Pesquisador: _____ Assinatura do pesquisador: _____

Entrevistador: _____ Assinatura do Entrevistador: _____

Município: _____ Data: ____/____/____

ANEXO 2

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

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

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, a respeito dos objetivos do presente estudo e dos procedimentos e benefícios esperados, todos listados acima. Entendo que para maiores esclarecimentos eu poderei entrar em contato com a pesquisadora Sabrina Esteves de Matos Almeida pelo telefone (51) 3352-0336

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa.

Sim () Não ()

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade de meu tratamento.

Sim () Não ()

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhum tipo de remuneração financeira.

Sim () Não ()

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

Sim () Não ()

5. Permito que minha amostra de sangue seja guardada para ser utilizada em outra pesquisa, mediante novo protocolo de pesquisa autorizado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FEPPS, ficando livre para solicitar a destruição da mesma a qualquer momento se assim desejar.

() Sim, concordo com a armazenagem do que restar do meu material biológico

() Não permito que minha amostra seja utilizada em novos estudos

() Desejo que minha amostra seja destruída após o final do presente estudo

6. Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Sim () Não ()

Nome do Voluntário: _____

Assinatura do Voluntário: _____ Data Nasc.: ____/____/____

Pesquisador: _____ Assinatura do pesquisador: _____

Entrevistador: _____ Assinatura do Entrevistador: _____

Município: _____ Data: ____/____/____

ANEXO 3

QUESTIONÁRIO

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

Código de identificação do paciente no projeto: _____

Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: () Masculino () Feminino

Município de Residência: _____

Estado Civil: () Solteiro () Casado () Acompanhado

Etnia (auto-declaração): () Branco () Não-branco

Profissão: _____ Em atividade: () Sim () Não

Escolaridade: _____

Data da última sorologia negativa para HIV: ____ / ____ / ____

Data da primeira sorologia positiva para HIV: ____ / ____ / ____

Possível forma de Transmissão:

() Heterossexual () HSH () UDI () Transfusão sanguínea ou Transplante

() Transmissão vertical (Materno fetal) () Outro. Qual? _____

Gestante: () Sim () Não

Fumo: () Sim () Não

Uso de Álcool: () Sim () Não

Uso de drogas: () Sim () Não Se sim, qual? _____

Comorbidades e Coinfecções:

() Diabetes () Cardiopatia () Hemodiálise () Hepatite B () Hepatite C

() HTLV () Tuberculose () Outras DST, qual? _____

Viajou para o exterior: () Sim () Não

Continentes do Exterior:

() África () Europa () Ásia () América do Sul () América do Norte

Teve contato sexual/drogas injetáveis no exterior: () Sim () Não Onde? _____

Teve contato sexual/drogas injetáveis com estrangeiros no Brasil:

() Sim () Não Se sim, qual a origem do contato? _____

Tem alguma doença crônica ou histórico familiar deste tipo de doença? Se sim, qual? _____

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

ANEXO 4



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Trein, 595
CEP 91350-205 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.2620
CNPJ: 92.787.118/0001-20

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

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Rubbo, 20
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.4100
CNPJ: 92.787.128/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Mostardero, 17
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3314.0200
CNPJ: 92.692.134/0001-53



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

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

Projeto: 10-213

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

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

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

Documentação: Aprovados
Aspectos Metodológicos: Aprovados
Aspectos Éticos: Aprovados

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

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

Porto Alegre, 30 de novembro de 2010.

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