

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**AVALIAÇÃO IMUNOGENÉTICA DE VARIANTES DOS RECEPTORES  
TIPO TOLL 7, 8 E 9 EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1**

**Jacqueline Maria Valverde Villegas**

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: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

**Porto Alegre, fevereiro de 2013**

## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

---

### **Agências financiadoras:**

- ❖ CNPq
- ❖ FAPERGS

### **Instituição de origem:**

- ❖ Laboratório de Imunogenética

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **Instituição colaboradora:**

- ❖ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
- ❖ Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

*Cuando alguien quiere algo debe saber que a veces corre riesgos y por eso la vida vale la pena.*



## AGRADECIMENTOS

---

Agradezco a Dios, por existir a mi manera, por cuidar de mí todas las veces que se lo pedía secretamente, en algún lugar de mi cabeza y en lo más profundo de mi corazón. En momentos cuando pensé que iba a desvanecer, saqué fuerzas para seguir adelante y no tirar la toalla.

A mi familia: William Mario y María Elena, mis amados papis, por siempre confiar en mí y apoyarme en mis decisiones. Por hacerme una buena persona (que creo soy), respetando mis ideales y guiándome por el camino correcto. Mis hermanos: William, Janet y Alexander, por el amor de sangre que siempre nos mantendrá unidos. Lucianito, mi ahijado amado, quién es una bendición y trajo más unión, sonrisas y mucha felicidad a mis papas. Muchas gracias a todos ellos por la paciencia de tenerme lejos y aguantar la inmensa nostalgia.

Quero agradecer a pessoas especiais que me acolheram desde o início desta aventura: Bruno Paiva, meu negrinho lindo que deu o início a este trabalho e logo depois eu o acompanhei quando fiz o meu TCC, sempre disposto em me ajudar, ele foi meu co-orientador que me ensinou ser autodidata e eficiente e, mas do que tudo, sempre ter um sorriso além dos momentos difíceis. Gaby, pela ajuda e disposição quando eu precisei, até parece que estou seguindo teus passos, primeiro no TCC com IBD e agora no mestrado com HIV, assim, vou ter certeza que vou chegar longe. Andressa, pela companhia e orientação em Porto Alegre quando andava perdida nos meus inícios, minha colorada! Eu espero que você também tenha sido bem acolhida lá na Argentina. Nadine, pelo excelente exemplo de pessoa, profissional e amiga que tu és para mim, adoro a idéia de que vamos continuar compartilhando mais momentos juntas no lab e fora dele também! Cíntia, pelos bons momentos compartilhados nessa etapa, você é ninja mesmo! Seguindo a lista das pessoas que me acompanharam nestes últimos dois anos: Tássia “meu amor” obrigada pela parceria desde o início do mestrado (nunca vou esquecer nosso seminário de epigenética hehehe!) e também pelas longas conversas e risadas que mesmo em momentos tristes sempre terminavam animando meus dias no lab, muito obrigada por sempre me perguntar como estou? E aprofundar. Juliana, quem

sempre está disposta para solucionar as coisas e a vida dos outros, como a minha! Muito obrigada flor por tudo àquilo que você fez para facilitar e adoçar minha vida neste período (mudanças, viagens, caronas, bolos, trufas maravilhosas, etc). Camila, uma pessoa muito parceira para vários assuntos, ela adora a ciência e esportes , pula como criança quando lê artigos, eu admiro muito isso e me inspira. Maurício Busatto, que lindo foi conhecer você numa situação de mudança de casa, uma pessoa com boa qualidade humana e científica, sempre com um sorriso e uma mensagem para nos tornar melhor cada dia (nada é por acaso, tu tem muita razão!). Francis, obrigada pela preocupação, ajuda, amabilidade e sorriso que você sempre tem para mim, e agora vamos continuar juntas com o doutorado, vamo que vamo! Priscila, pela disposição e preocupação que você sempre demonstra por mim, nunca vou esquecer aquele dia que fui para pedir socorro numa idéia solta que eu tinha para o projeto de doutorado e ela, junto comigo e com os livros na mão, tentávamos entender. Ela também teve a genial idéia de organizar, junto com o pessoal, um grande presente de aniversário para mim, minha bicicleta abençoada, pois ajudou muito a resolver vários dos meus problemas. Muito obrigada pela bicicleta pessoal!!! Pietra, pelas aventuras fora do lab, por me tirar da rotina e por me animar em conhecer mais um pouco de POA, foi e sempre será um prazer compartilhar momentos com você! Ana Karinne, também foi um prazer ter compartilhado esse último ano de mestrado com você, mas ainda teremos mais momentos pela frente, que beleza!!! Ao pessoal da bioinformática, todos eles muito inteligentes e sempre dispostos em ajudar e solucionar os problemas dos colegas: Gustavo, Dinler, Maurício e Marialva. A essas lindas ICs pela companhia no dia a dia na bancada que tornaram momentos menos estressantes: Lia e Bianca.

Nos meus últimos meses do mestrado foram imersos em adquirir novos conhecimentos sobre um assunto que no inicio do mestrado não tinha noção da complexidade, entender mais sobre o HIV e como ele atinge em nosso sistema imune. Meus sinceros agradecimentos para esse grande time que me deu a oportunidade de participar nas suas discussões: A Sabrina, Rúbia, Denis e Tiago. Se tudo der certo vou ter o grande prazer de trabalhar com vocês no doutorado.

Um especial agradecimento ao meu orientador, José Artur, quem acreditou em mim, sem me conhecer, quando eu pedi para ele a oportunidade de entrar no lab e fazer o meu TCC para logo depois continuar com o mestrado.

Vai outro especial agradecimento para o Elmo do nosso PPG, sempre amável, eficiente e disposto em solucionar a vida de todos nós.

La lista es grande pero no quiero dejar de agradecer a mis amigas de toda la vida: Mariela, Lizeth, Claudia y Evelyn. La amistad de ustedes es una de las cosas buenas que la vida me ha dado, gracias! Dos personas fueron cómplices de esta aventura: Frank y Alejandro, admirables, ejemplos de perseverancia y excelente profesionalismo, gracias por haber sido parte de mi vida. A los peruanos y de otras nacionalidades que conocí en POA y con los que compartí 2 cumpleaños, buenos momentos y muchas comidas peruanas: Omaira, Walter Elvis, Corally, Williams, Flor, Pablo, David, J. Alexander y Jessica.

Finalmente, a Jorge Lucio. Las cosas pasan por algo y sin planear nada un día apareciste frente a mi puerta. Tan suave, tan dramático, tan “danzarin”, tan chiquito, tan humano. Gran parte de la escrita de esta tesis fue menos estresante gracias a su compañía y dulce atención, siempre salvándome de los problemas técnicos de computación y tales programas, como matlab. Haces que sea mejor cada día y espero poder retribuirte de la misma forma. Love you baby!

# SUMÁRIO

---

	Pág.
ABREVIATURAS	8
RESUMO	12
ABSTRACT	14
I. INTRODUÇÃO	15
1.1 HIV/AIDS: A origem e diversidade	15
1.2 Características e ciclo de vida do HIV	16
1.3 Imunopatogênese da infecção pelo e progressão a AIDS	18
1.4 Epidemiologia do HIV-1/AIDS	20
1.4.1 No mundo	20
1.4.2 No Brasil	20
1.5 Variabilidade genética do hospedeiro frente ao HIV	23
1.6 Receptores tipo Toll (TLRs)	26
1.6.1 Transporte de TLRs intracelulares/endossomais	29
1.6.2 Envolvimento dos TLR7/8/9 na infecção do HIV	31
1.6.3 Co-infecção e TLRs	33
1.6.4 Imunogenética dos TLR7/8/9	35
II. OBJETIVOS	40
III. ARTIGO CIENTIFICO	41
Abstract	43
Introduction	44
Materials and methods	47
Results	48
Discussion	50
References	53
Tables	58
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	63
V. REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	68

## ABREVIATURAS

---

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
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 tipo 8)
cDC	<i>Conventional Dendritic Cell</i> (Célula dendrítica convencional)
CTL	<i>Cytotoxic T cell</i> Célula T citotóxica
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (Receptor de quimiocinas tipo CXC4)
DCs	<i>Dendritic Cells</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>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i> (DNA de fita dupla)
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> (Retículo endoplasmático)
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i> <i>Estudos de varredura Genômica</i>
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> (Terapia Antirretroviral Altamente Ativa)
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> (Vírus da hepatite B)
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> (Vírus da hepatite C)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística



IFN	<i>Interferon</i> (Interferon)
IL-1	<i>Interleukin-1</i> (Interleucina tipo I)
IL-6	<i>Interleukin-6</i> (Interleucina-6)
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)
KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptor</i> (Receptor de células Natural Killers )
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i> (lipopolissacarídeos)
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i> (Regiões repetidas ricas em leucinas)
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> (Regiões terminais repetidas longas)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo maior de histocompatibilidade)
mDC	<i>Myeloid Dendritic Cell</i> (Célula dendrítica mielóide)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
My-D88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response gene 88</i> (Fator mielóide de diferenciação 88)
NNRTI	<i>Non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors</i> Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa
NRTI	<i>Nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitors</i> (Nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa)
NK	<i>Natural Killer</i> (Exterminadora natural)
NF-kB	<i>Nuclear Factor -kappa Beta</i> (Fator Nuclear kappa beta)
ODN	<i>Oligodeoxynucleotide</i> (Oligodeoxinucleotídeo)
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (Padrões moleculares associados a antígenos)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pDC	<i>Plasmacytoid Dendritic Cell</i>

	(Célula dendrítica plasmocítica)
PI	<i>Protease Inhibitor</i> (Inibidores de protease)
PIC	<i>Pre-integration Complex</i> (Complexo de pré-integração)
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i> (Receptores de padrões de reconhecimento)
PVHA	Pessoas vivendo com HIV e AIDS
REV	<i>Regulator of Virion Expression</i> (Regulador da expressão do vírus )
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)
RT	<i>Reverse transcriptase</i> (Transcriptase reversa)
RNA	<i>Rybonucleic Acid</i> (Ácido ribonucléico)
SICLOM	Sistema de Controle Logístico de Medicamentos
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SIV	<i>Simian immunodeficiency vírus</i> (Vírus da Imunodeficiência de Símios)
SUS	Sistema Único de Saúde
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> (DNA fita simples)
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> (RNA fita simples)
TAR	<i>Trans-Activator Region</i> (Região Transativadora)
TAT	<i>Trans-Activator of Transcription</i> (Transativador da transcrição )
TIR	<i>Toll IL-1 Receptor</i> (Receptor de Toll tipo IL-1)
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i> (Receptores do tipo Toll)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i> (Adaptador que contém domínio TIR para indução de IFN- $\beta$ )
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i> (Molécula adaptadora relacionada a TRIF )
TRIM- $\alpha$	<i>IFN-alpha Tripartite-motif protein</i> (Motivo tripartite para indução de IFN- $\alpha$ )

UNAIDS *United Nations Programme on HIV/AIDS*  
(Programa das Nações Unidas para HIV/AIDS)

## RESUMO

---

Diferentes mecanismos envolvidos no controle da infecção pelo HIV-1 dependem, além de fatores virais, da variabilidade genética do hospedeiro. Assim, foi observado que os receptores tipo Toll (TLRs) endossomais, tais como TLR7, 8 e 9, estão envolvidos no reconhecimento de ácidos nucleicos derivados de vírus, como o HIV-1. Sendo que TLR7/8 reconhecem RNA simples fita (ssRNA) e TLR9 reconhece DNA dupla ou simples fita (ssDNA/dsDNA). Observou-se que o ssRNA derivado de HIV-1 é reconhecido pelos TLR7/8, os quais estimulam células dendríticas (DCs) e macrófagos à produção de interferons (IFNs) e citocinas pró-inflamatórias. Também foi observado que a proteína gp120 do HIV inibe a ativação das DCs plasmocitóides (pDCs), que expressam TLR9, consequentemente inibindo produção de IFN- $\alpha$ . Variantes nos genes *TLR7/8/9* já foram associadas com a infecção ao HIV-1 e outras doenças inflamatórias, autoimunes e infecciosas. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos genéticos potencialmente funcionais: rs179008 no *TLR7*, rs3764880 no *TLR8*, rs5743836 e rs352140 no *TLR9* em 366 pacientes adultos HIV+ e 415 indivíduos adultos saudáveis provenientes do sul do Brasil. O polimorfismo rs5743836 do *TLR9* foi genotipado através da técnica de PCR alelo específico BIPASA enquanto que os demais polimorfismos por PCR-RFLP. As frequências genótípicas e haplotípicas foram comparadas usando o teste de Qui-quadrado e as frequências alélicas usando o teste Exato de Fisher. As comparações foram realizadas subdividindo os indivíduos de acordo com a origem étnica e o sexo. Quando comparamos indivíduos HIV+ eurodescendentes com o grupo controle, observamos diferenças nas frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo rs5743836 no *TLR9* ( $P=0,011$  e  $P=0,028$ , respectivamente), sendo que a frequência do genótipo CC foi maior nos pacientes quando comparado com os controles (residual  $P=0,040$ ) conferindo susceptibilidade à infecção (OR=1,53; 95% IC: 1,05-2,23;  $P=0,030$ , modelo dominante). Na comparação dos indivíduos HIV+ afrodescendentes com o grupo controle, houve uma menor frequência do genótipo TC nos pacientes (residual  $P=0,006$ ), sendo que esse genótipo foi associado com proteção à infecção (OR=0,60; 95% IC: 0,36-0,99;  $P=0,049$ , modelo dominante). Na análise de haplótipos dos polimorfismos rs5743836 e rs352140 do *TLR9*, as frequências haplotípicas estimadas não foram diferentes na comparação entre

pacientes e controles. Em relação aos polimorfismos do *TLR7* e *TLR8* também não observamos diferenças nas frequências alélicas e genóticas quando comparamos pacientes e controles. Nossos resultados demonstram o papel fundamental do polimorfismo rs5743836 na infecção do HIV e a importância do *background* genético entre os grupos étnicos que influenciam na susceptibilidade frente ao vírus.

Palavras-chave: TLRs, HIV-1, etnia, polimorfismos

## ABSTRACT

---

Different mechanisms are involved in the control of HIV infection, as viral factors and genetic variability on the host. Thus, intracellular Toll-like receptors (TLRs), such as TLR7/8/9, are involved in the recognition of nucleic acids derived from viruses. TLR7/8 recognizes simple RNA strand (ssRNA) and TLR9 recognizes simple or double DNA strand (ss/dsDNA). It was showed that the ssRNA derived from HIV is recognized by TLR7/8 and stimulates DCs and macrophages to secrete IFN- $\alpha$  and proinflammatory cytokines. Also, a direct interaction of HIV gp120 with pDCs inhibits TLR9-mediated responses, including pDC activation and IFN- $\alpha$  secretion. *TLR7/8/9* polymorphisms have been associated with HIV infection and other inflammatory autoimmune and infectious diseases. The aim of this study was to evaluate the influence of the rs179008 *TLR7*, rs3764880 *TLR8* and rs5743836/rs352140 *TLR9* polymorphisms, potentially functional, in 366 HIV+ adults patients and 415 healthy adults subjects from the Southern Brazil. The rs5743836 polymorphism was genotyped by allele specific PCR-BIPASA while the other variants by PCR-RFLP. Genotypic and haplotypic frequencies were compared using the Chi-square test and allele frequencies using the Fisher's exact test. The comparisons were made by subdividing the sample according to ethnicity and gender. In European-derived individuals, differences in genotypic and allelic frequencies was observed for the rs5743836 as compared patients with controls ( $P=0.028$  and  $P=0.011$ , respectively). Also, a higher frequency for the CC genotype in patients as compared with controls (residual  $P=0.040$ ), this genotype conferring susceptibility to HIV-1 infection (OR=1,53; 95% CI: 1,05-2,23;  $P=0,030$ , dominant model). In African-derived individuals, was observed that the rs5743836 TC genotype frequency was lower in patients as compared to controls (residual  $P=0,006$ ) being associated with protection against to HIV infection (OR=0,60; 95% CI: 0,36-0,99;  $P=0,049$ ). No differences in allelic and genotypic frequencies were observed for the *TLR7/8* polymorphisms or haplotypic frequencies of *TLR9* variants, comparing patients and controls. Our results suggest that the rs5743836 *TLR9* polymorphism has an important role in HIV-1 infection since it was associated with susceptibility in Euro-derived and Afro-derived individuals. Keywords: TLRs, HIV-1, ethnicity, polymorphisms.

# I. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 HIV/AIDS: A origem e diversidade

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi primeiramente descrita nos Estados Unidos em 1981. Caracterizada por uma imunodeficiência generalizada como consequência de uma alta incidência de infecções oportunistas, foi inicialmente observada em homens homossexuais (Rambaut *et al.*, 2004). A AIDS em humanos é causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), um lentivírus da família *Retroviridae* (Levy, 1978). O sucesso evolutivo dessa família se baseia em sua simplicidade enganosa, pois o vírus pode infectar persistentemente humanos subvertendo a resposta imune inata e adaptativa, apesar de codificar apenas 15 proteínas maduras (Engelman & Cherepanov, 2012). O vírus foi inicialmente isolado em 1983 e ao longo da década de 80 dois tipos de HIV (HIV-1 e HIV-2) foram identificados, os quais circulavam na população humana com leves diferenças na estrutura de seus genomas. Estudos filogenéticos observaram que o HIV-1 e HIV-2 são o resultado de múltiplas transmissões interespecíes do Vírus da Imunodeficiência de Símios (SIV), o qual infecta naturalmente primatas africanos. Assim, acredita-se que um evento de transmissão envolvendo o SIV de chimpanzés (SIVcpz) no Centro-Oeste da África (Cameroon) deu a origem ao HIV-1 do grupo M, enquanto que o SIV de *Sooty mangabeys* (SIVsmm) deu origem ao HIV-2 (Sharp & Hahn, 2011). Ambos os tipos de vírus são caracterizados por uma ampla diversidade genética. O HIV-1 está filogeneticamente dividido em 3 grupos: M, N e O, com uma divisão mais ampla do grupo M em 9 subtipos (A,B,C,D,F,G,H,J,K) e 51 formas recombinantes circulantes (CRF). Hoje em dia o grupo M é o principal envolvido na pandemia e tem quase uma distribuição mundial, enquanto que os grupos N e O estão restritos a populações do Oeste Africano. O HIV-2 é o mais comum em indivíduos do Oeste africano e está composto por 7 subtipos (Sharma *et al.*, 2011).

## 1.2 Características e ciclo de vida do HIV

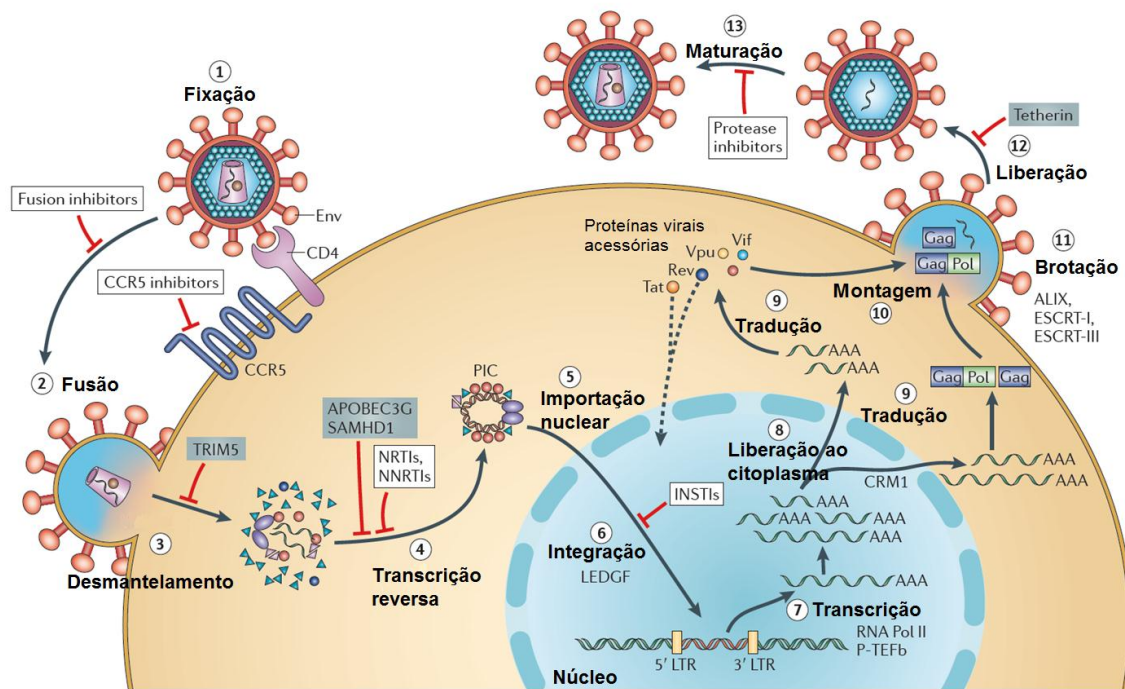
O HIV é estruturalmente formado por um envelope lipoprotéico e um nucleocapsídeo contendo duas fitas de RNA de aproximadamente 9kb, onde estão dispostas as informações genéticas. Seu genoma é composto por três regiões gênicas: ***gag*** (região codificadora de proteínas do núcleo e da matriz); ***pol*** (região que codifica as enzimas transcriptase reversa (RT) e protease integrase) e ***env*** (região que codifica proteínas do envelope: gp120/41). Existem também dois genes regulatórios (***tat*** e ***rev***) e quatro genes acessórios (***nef***, ***vif***, ***vpr***, ***vpu***) os quais modulam a replicação do vírus e são responsáveis por adaptações para a sobrevivência do vírus no hospedeiro (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Verlag, 2013).

O ciclo de replicação do HIV é similar ao de outros retrovírus estudados. Ele consta de diversas etapas, as quais dependem tanto de fatores celulares/moleculares do hospedeiro quanto de fatores virais: 1) A entrada na célula se inicia quando o vírus se liga na célula alvo, pela interação entre a glicoproteína viral gp120/41 e a molécula receptora CD4 (glicoproteínas presentes na membrana de algumas células do sistema imune). Após utilizar o CD4 como receptor primário, o vírus interage com os receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4, que agem como co-receptores virais. 2) Essas interações permitem a fusão da membrana viral com a membrana celular do hospedeiro e conseqüentemente a entrada do capsídeo viral na célula. 3) Ocorre o desmantelamento do capsídeo e a liberação do RNA viral no citoplasma. 4) O genoma RNA do vírus é convertido em DNA de dupla fita pela transcriptase reversa (RT). 5) Ocorre a formação do complexo de pré-integração (PIC) no DNA viral o qual é transportado ativamente para o núcleo. 6) O DNA viral é integrado ao genoma da célula do hospedeiro pela integrase viral, a qual está associada ao PIC. A forma do DNA integrado do vírus é chamada de provírus. 7) A transcrição do provírus é mediada pela RNA polimerase II (RNA Pol II) do hospedeiro e o fator B de alongação transcricional positiva (P-TEFb). 8) Produção de mRNA virais e exportação ao citoplasma via a proteína CRM1 do hospedeiro. 9) Os mRNA virais são traduzidos em proteínas do vírus. 10) No citoplasma, o conjunto das partículas virais e



proteínas acessórias do vírus é unido pelo encapsulamento de completos RNAs virais genômicos. 11) O processo é completado pela interação com as proteínas do capsídeo viral formando o nucleocapsídeo, dando lugar ao brotamento. 12) Liberação de novas partículas virais. 13) Finalmente se dá a maturação dessas partículas virais para formar partículas infecciosas (Engelman & Cherepanov, 2012) (Figura 1).

Em contraste a outros retrovírus, a transcrição e o *splicing* do RNA do provírus são regulados por proteínas reguladoras: TAT e REV, as quais são as primeiras a ser sintetizadas. TAT se une à região transativadora (TAR) do genoma do vírus para habilitar a alta eficiência da transcrição do provírus. REV, por outro lado, é necessária para o controle do *splicing* do RNA e o transporte de RNAs ao citoplasma (Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

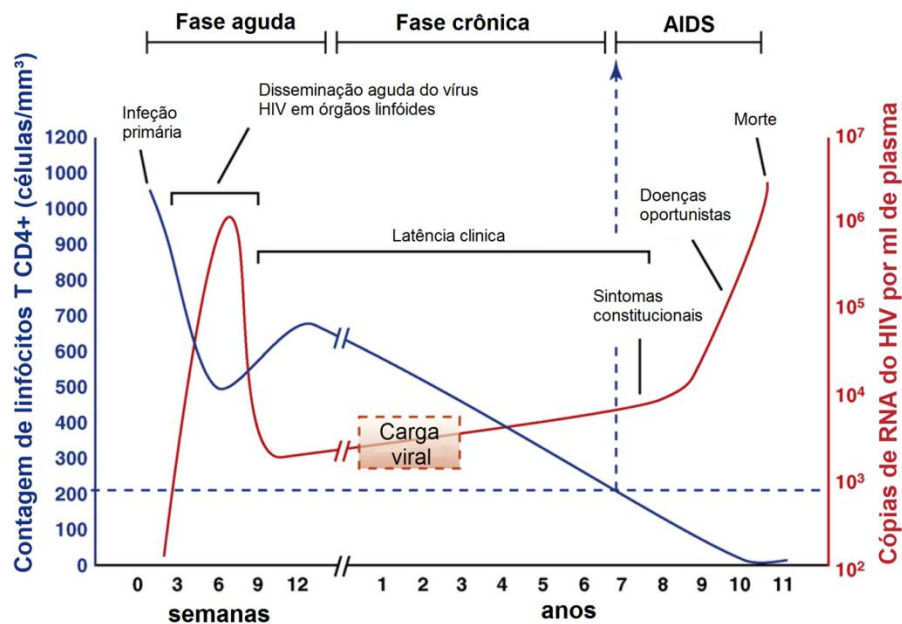


**Figura 1.** Ciclo de vida do HIV (Adaptado de Engelman & Cherepanov, 2012).

### 1.3 Imunopatogênese da infecção pelo HIV e progressão a AIDS

As primeiras células infectadas pelo vírus geralmente são as células dendríticas (DCs) encontradas em vários tecidos humanos, entre eles a mucosa do trato genital e a mucosa anal (Wu & KewalRamani, 2006). Em seguida, as células dendríticas, “conduzem” o vírus aos linfonodos onde ocorre a infecção dos linfócitos T CD4+, principais alvos celulares do HIV e fundamentais para a coordenação das defesas do organismo (Gringhuis *et al.*, 2010). As DCs agem como “Cavalos-de-Tróia”, já que são as responsáveis pela disseminação do vírus e realizam o transporte do HIV até as células T - o vírus liga-se ao receptor do tipo lectina (DC-SIGN, L-SIGN e Siglec-1) presente na membrana celular da DC e é internalizado mantendo-se intacto até a passagem para um linfócito T CD4+, nos linfonodos (da Silva *et al.*, 2011; Hijazi *et al.*, 2011; Izquierdo-Useros *et al.*, 2012).

A fase aguda, ou infecção primária, está definida como a fase inicial de infecção, caracterizada como se estendendo desde a possibilidade de detecção de RNA do HIV até a formação de anticorpos específicos contra o vírus, após 3-4 semanas (Figura 2) (McMichael *et al.*, 2010). Em estudos com modelos animais com SIV e em indivíduos HIV+ foi documentado que essa fase de infecção é caracterizada pelo declínio do número de linfócitos T CD4+ de memória predominantemente na mucosa, lugar onde se localizam um grande número de células T (Brenchley *et al.*, 2004; Mattapallil *et al.*, 2005). A carga viral no plasma aumenta até alcançar um valor máximo após 21-28 dias de infecção, com uma resposta imune intensa. Conseqüentemente os pacientes podem desenvolver sintomas da Síndrome Retroviral Aguda, incluindo influenza febril, garganta inflamada, linfadenopatia ou exantema (Kahn & Walker, 1998). Alguns estudos demonstraram uma expansão oligoclonal de linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTL) circulantes e sua associação com o controle da viremia mediado pela capacidade citotóxica dessas células contra as células infectadas (Borrow *et al.*, 1994), porém recentes estudos *in vitro* e *in vivo* questionam o papel citotóxico dos linfócitos T CD8+ neste processo (Davenport & Petravic, 2010).



**Figura 2.** Fases clínicas da infecção pelo HIV e progressão a AIDS (Adaptado de An & Winkler, 2010).

A fase crônica da doença está caracterizada por uma acentuada ativação imune e uma acelerada renovação celular, pois ocorre a queda do número de células T CD4+ circulantes até os níveis normais, também ocorrendo estabilização da viremia em níveis variáveis (*set-points virais*) e estabelecimento de uma infecção assintomática por um longo período de tempo (fase clínica de latência) (Grossman *et al.*, 2006) (Figura 2). As células B são policlonalmente ativadas com uma conseqüente hipergamaglobulinemia, também a ativação e número de células *Natural Killers* (NK) é incrementada e o número de DCs decresce no sangue periférico. Danos imunológicos no trato gastrointestinal levam ao rompimento na barreira da mucosa permitindo a translocação de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) de bactérias, tais como o LPS (lipopolissacarídeos), os quais já foram correlacionados com ativação imune (Brenchley *et al.*, 2006). Contudo, danos no tecido linfóide são observados: disfunção tímica, fibrose dependente do fator de transformação do crescimento beta e alterações na arquitetura do folículo linfóide, tais danos podem ser revertidos progressivamente com o início do tratamento (Douek *et al.*, 1998; Hardy *et al.*, 2004).

Sabe-se que uma ativação imune generalizada desencadeia uma alta supressão de células T CD4+/CD8+, a destruição de tais células leva a uma severa imunodeficiência que resulta na incapacidade de lutar frente a outros agentes infecciosos ou células tumorais (e.g. tuberculose ou pneumonia ou câncer), conseqüentemente levando a uma progressão para AIDS (Kuan-Teh, Jean 2000).

## **1.4 Epidemiologia do HIV-1/AIDS**

Apesar da associação inicial com o comportamento homossexual masculino, hoje em dia sabe-se que tanto o HIV-1 é também transmitido em relações heterossexuais, pela via intravenosa e verticalmente durante a gestação, na interface materno-fetal.

### **1.4.1 No mundo**

Na atualidade, segundo o último relato global da UNAIDS/2012, no mundo existem aproximadamente 34 milhões de pessoas que vivem com o HIV dos quais ~30 milhões são adultos (~16 milhões de mulheres) e ~3 milhões são crianças (< 15 anos). Desde o início da epidemia foram registrados aproximadamente 30 milhões de óbitos em decorrência da AIDS e só em 2011 foi registrado ~1,7 milhões de mortes por causa da AIDS (~1,5 milhões de adultos e ~230.000 crianças < 15 anos), o que representa um decréscimo de 24% nos óbitos devidos à AIDS comparando-se com os dados de 2005 (~2,3 milhões). Considerando-se todas as regiões do mundo, a maioria dos indivíduos que vivem com HIV (97%) reside em países de baixa e média renda, especialmente na África subsaariana (Global report UNAIDS, 2012).

### **1.4.2 No Brasil**

Segundo o último Boletim Epidemiológico Brasileiro (com dados do ano base de 2010), de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAM), Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (Siscel) e o Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM),

foram notificados 608.230 casos de AIDS de 1980 a 2010, sendo que 397.662 (65,4%) foram relativos a indivíduos do sexo masculino. Em 2010, foram notificados 34.218 novos casos de AIDS e sua distribuição no território Brasileiro foi: 14.142 (41,3%) na Região Sudeste; 7.888 (23,1%) na Região Sul; 6.702 (19,6%) na Região Nordeste; 3.274 (9,6%) na Região Norte e 2.211 (6,5%) na Região Centro-Oeste. Com taxa de incidência nacional de 17,9/100.000 habitantes e razão de sexo de 1,7 novos casos em homens para cada caso em mulheres, demonstrando uma diminuição desta proporção nos últimos anos. Ao longo dos últimos 12 anos observa-se uma estabilização da taxa de incidência no Brasil, concentrada em alguns subgrupos populacionais em situação de vulnerabilidade, sendo observada uma redução desta taxa apenas na Região Sudeste e aumento nas demais regiões. Em 2010 também foram notificados 482 novos casos de AIDS em menores de cinco anos, com taxa de incidência de 3,5/100.000 habitantes. No Brasil, a taxa de incidência em menores de cinco anos é utilizada como indicador de monitoramento da transmissão vertical, e ao longo dos últimos 12 anos observa-se uma redução de 40,7%. Contudo houve aumento da incidência no Norte e Nordeste, e redução nas demais regiões. Nesse ano também ocorreram 11.965 óbitos, com coeficiente bruto de mortalidade de 6,3/100.000 habitantes. Considerando o coeficiente de mortalidade padronizado (População brasileira de 2000, IBGE), nos últimos 10 anos observa-se redução de 11,1% na mortalidade por AIDS no Brasil, demonstrando variações entre as regiões do país com aumento no Norte, Nordeste e Sul, diminuição no Sudeste, e estabilização no Centro-Oeste. Também no ano de 2010 foram notificados 5.666 casos de HIV em gestantes, com taxa de detecção de 2,0 casos por 1.000 nascidos vivos, sendo que a única região com uma taxa de detecção de HIV em gestantes superior à média nacional foi a Região Sul com 4,8 casos por 1.000 nascidos vivos (Boletim Epidemiológico AIDS.DST, 2012).

Do total de casos novos na região Sul no ano de 2010 [7.888 (23,1% do total Brasileiro)], foi observado: 4.018 (50,9%) no Estado do Rio Grande do Sul, 1.984 (25,2%) no Paraná e 1.886 (23,9%) em Santa Catarina. Ao respeito das capitais da região Sul e com relação à incidência de novos casos de AIDS, observa-se a maior taxa em Porto Alegre/RS (99,8/100.000 habitantes), seguido por Florianópolis/SC (57,9) e Curitiba/PR

(41,8). Destaca-se que nesses estados da Região Sul, a taxa de incidência nesse ano foi maior do que a média nacional (17,9/100.000 habitantes). Porto Alegre e Florianópolis continuam liderando a classificação por taxa de incidência de casos de AIDS, ocupando os dois primeiros lugares entre as capitais brasileiras desde o ano de 1998 (Boletim Epidemiológico AIDS.DST, 2012). É importante salientar que todos esses números de casos notificados no Brasil correspondem só a pessoas com AIDS, pois dados de pessoas infectadas com HIV-1 e que não progrediram a AIDS ainda não estão sendo registrados pelo governo.

O cenário epidemiológico tem sido influenciado, além das políticas públicas de prevenção, pelo acesso universal a terapia anti-retroviral ou “HAART” (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), pois esses medicamentos visam impedir a multiplicação do vírus no organismo. Eles não eliminam o HIV, mas ajudam a evitar o enfraquecimento do sistema imunológico, gerando uma melhor qualidade de vida. Além disso, também já foi observado que eles ajudam a diminuir a transmissão do vírus porque baixam a carga viral. Atualmente, existem 21 medicamentos principais divididos em cinco grupos: 1) Nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa (INRT); 2) Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNRT); 3) Inibidores de protease (IP); 4) Inibidores de fusão (IF) e 5) Inibidores da integrase (II). Uma combinação típica de HAART envolve dois inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa e um inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa ou um inibidor de protease (Fauci, 2003).

Desde 1996 o Brasil distribui gratuitamente o coquetel antiaids pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 200 mil pessoas recebem regularmente os remédios para tratar a doença. Segundo as diretrizes do Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério de Saúde, estabelecidas em 2008, o início de tratamento antirretroviral é recomendado para pacientes HIV+ com sintomatologia de AIDS, ou ainda, para indivíduos assintomáticos com medidas recorrentes do número de linfócitos T CD4+ entre 200 e 300 células/mm<sup>3</sup>; carga viral persistente independente dos níveis de células T-CD4+, e indivíduos com hepatite C ou B crônica. No entanto, em

agosto de 2012 foram propostas novas recomendações técnicas consensuais para adesão de terapia antirretroviral de pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) no Brasil (publicadas na página do Ministério da Saúde), as quais ainda estão em sua versão preliminar e em fase de avaliação para serem liberadas na portaria. Essas novas recomendações incluem como principais critérios para o início do tratamento antirretroviral: Pacientes assintomáticos: contagem de células T CD4+ abaixo de 500 células/mm<sup>3</sup> ou, se co-infectados com hepatite B, com células T-CD4+ acima de 500 células/mm<sup>3</sup>; pacientes com risco elevado a infecção ou com doença cardiovascular ou com neoplasias que necessitam de tratamento imunossupressor. Pacientes sintomáticos: Uso de terapia antirretroviral independente da contagem de T-CD4+. No caso de gestantes, a indicação é independente da contagem de T-CD4+. Também foi proposto um protocolo de tratamento preventivo para pessoas HIV+ que vivem em parceria com indivíduos soronegativos, como medida de prevenção da transmissão do HIV. Neste caso o tratamento deve ser oferecido independente da contagem de T-CD4+.

## **1.5 Variabilidade genética do hospedeiro frente ao HIV**

Nos últimos anos tem-se demonstrado que os diferentes mecanismos envolvidos no controle do HIV dependem, além de fatores virais, da variabilidade genética do hospedeiro. Ambos os fatores resultam na variabilidade da evolução clínica a qual tem permitido a classificação de indivíduos infectados de acordo com a progressão da doença em: 1) Progressores típicos, que representam a maioria da população soropositiva e desenvolvem uma infecção sintomática, iniciando o tratamento antirretroviral entre o 3<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> ano após a soroconversão. 2) Progressores rápidos, que demonstram um declínio muito rápido na contagem das células CD4+, normalmente de 2 a 3 anos após o contato com o vírus. A principal característica deste grupo é a elevada carga viral, que não diminui após infecção primária ou fase aguda. 3) Progressores lentos ou *long-term non-progressors* (LTNPs), correspondem entre 5 e 15% da população infectada pelo vírus. Eles parecem controlar o vírus de forma natural, permanecem assintomáticos, com contagem de células CD4+ e carga viral estáveis por mais de 10 anos, sem uso de terapia

anti-retroviral. Porém, com o tempo esses indivíduos progridem para AIDS (Casado *et al.*, 2010; O'Connell *et al.*, 2009). 4) Controladores de elite, que parecem ser capazes de controlar a replicação viral. Os indivíduos têm contato com o HIV, mas permanecem saudáveis durante muitos anos, com carga viral muito baixa ou indetectável, e geralmente não apresentam sinais clínicos de progressão da doença (Casado *et al.*, 2010; Blackson, 2010).

Desta forma, muitos estudos têm como objetivo a identificação dos fatores do hospedeiro, ou alelos, que afetam a grande heterogeneidade de resposta (proteção vs. susceptibilidade), e sua influência na infecção de HIV/transmissão/progressão da doença. Análise de genes candidatos baseados em prévios estudos em grandes coortes tem destacado a importância desses determinantes fatores do hospedeiro, entre os quais estão vários genes envolvidos no sistema imune, tais como genes que regulam a entrada viral (receptores de quimiocinas, receptores tipo lectinas, receptores alternativos), que influenciam na imunidade inata e adquirida (HLAs, KIRs, TLRs, NLRs, citocinas, etc), assim como outros fatores que afetam a replicação do vírus (e.g. TRIM-alfa e APOBEC3G) (Chatterjee K, 2010; Sharma *et al.*, 2011; Pontillo *et al.*, 2012). Evidências sugerem que todos esses fatores influenciam na carga viral, número de células T CD4+/CD8+, susceptibilidade, progressão a AIDS e resposta ao tratamento (Kaur & Mehra, 2009).

Segundo os estudos de *Genome-Wide Association* (GWAS) realizados nas diferentes populações, observou-se que a região do antígeno leucocitário humano - *Human Leukocyte Antigen* (HLA) de classe I e mais especificamente a variante HLA-B\*5701 e HLA-B27, foram associados com progressão lenta em uma população de ancestralidade europeia (Fellay *et al.*, 2009, Van Manen *et al.*, 2012). Já em populações com ancestralidade africana o alelo HLA-B\*5703 foi o maior determinante no controle viral (Pelak *et al.*, 2010). É importante salientar o papel do alelo HLA-B\*5701 na farmacogenética, pois essa variante foi associada fortemente em pacientes HIV-1 positivos com hipersensibilidade imunológica a Abacavir, medicamento utilizado na



terapia do tipo nucleosídeo inibidor de transcriptase reversa, esses achados indicam a importância dos testes farmacogenéticos para prevenir danos tóxicos (Poggi *et al.*, 2010, Crovella *et al.*, 2011).

Também já foi observado que os receptores KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*), expressos na superfície celular das células *natural Killers* (NK), regulam o estado de ativação/inibição das células NK (controlando a ativação da citotoxicidade e morte celular) podendo modular o efeito de resposta imune inata ante a infecção com HIV-1. Assim, Carrington *et al.* (2008) observaram que *KIR3DL1* e *KIR3DS1* estavam associados a um melhor controle do HIV-1 quando encontrados em pacientes com alelos HLA-Bw4. Porém, um estudo mais recente observou diferenças no controle do HIV-1 na presença de HLA-Bw4 (Fellay *et al.*, 2010). Embora se observe uma ampla heterogeneidade genética com respeito a HLA e KIR entre as populações, já foi bastante documentado que um receptor de quimiocina no cromossomo 3 (*CCR5*) está envolvido no controle da infecção por HIV-1, especificamente considerando-se indivíduos que possuem um alelo caracterizado por uma deleção de 32pb (*CCR5Δ32*) (Huang *et al.*, 1996). Além disso, variantes na região promotora do *CCR5* e uma troca não-sinônima na região codificante de outro gene de receptor de quimiocinas, o *CCR2* (V64I) também foram associados ao controle da progressão da doença (Huang *et al.*, 1996; Ioannidis *et al.*, 2001).

Outros importantes efetores do sistema imune inato também já foram associados à infecção pelo HIV-1. Um grupo deles são os *Nod-like receptors* (NLRs), a interação dessas proteínas com seus adaptadores formam complexos moleculares conhecidos como inflamossomos, levando a ativação de caspase-1 e produção de IL-1 $\beta$ . O polimorfismo rs10754558 do gene *NALP3/NLRP3* que codifica a proteína NLRP3, um tipo de inflamossomo que reconhece motivos no DNA, ssRNA e dsRNA de alguns vírus, foi associado a susceptibilidade a infecção pelo HIV-1 (Pontillo *et al.*, 2012). Já outras moléculas efetoras da imunidade inata, tais como as defensinas, também já foram associadas à transmissão do HIV-1. Foi observado que variantes da defensina-beta 1

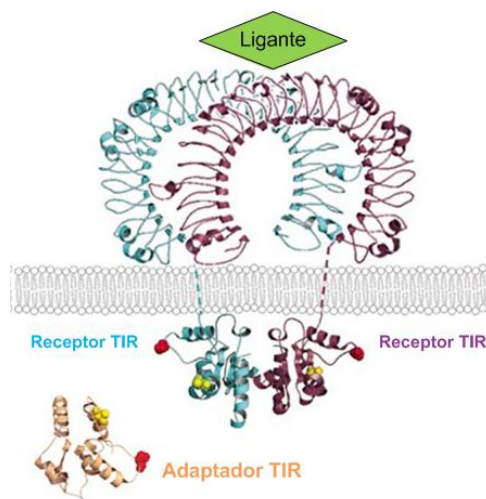
presentes em mães e crianças HIV+ influenciam na transmissão materno-fetal podendo controlar a carga viral presente nas mães infectadas (Braidia *et al.*, 2004; Freguja *et al.*, 2012; Milanese *et al.*, 2006; Ricci *et al.*, 2009). Outros polimorfismos têm sido identificados em genes que codificam citocinas e seus receptores, levando a uma produção diferencial de citocinas e que parecem também estar envolvidos nas diferenças interindividuais no curso da infecção pelo HIV. As citocinas que estão envolvidas na patogênese do HIV e com a progressão da doença podem ser classificadas de três formas: HIV-indutoras; HIV-supressoras e citocinas com ambas as capacidades (bifuncionais) (Vicenzi *et al.*, 1997).

## **1.6 Receptores tipo Toll (TLRs)**

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa contra patógenos e está constituído, entre outras moléculas e barreiras, por receptores codificados na linhagem germinativa, os quais são evolutivamente conservados e especializados para o reconhecimento de patógenos. Esses receptores são chamados também de moléculas de reconhecimento de padrão (PRRs) (Takeuchi & Akira, 2010). Os receptores tipo Toll (TLRs) são os PRRs melhor caracterizados e estudados e são conservados desde *Caenorhabditis elegans* até mamíferos (Janeway & Medzhitov, 2002). O nome deriva-se por sua similaridade a Toll, primeiro receptor descoberto na mosca da fruta (*Drosophila* sp.) Toll, foi inicialmente identificado como um produto essencial para o desenvolvimento da polaridade dorsoventral embrionária em *Drosófila* e mais tarde demonstrou-se seu papel crítico na resposta contra fungos em moscas (Lemaitre *et al.*, 1996). Um ano após esta descoberta, se identificou, em mamíferos, um homólogo do receptor Toll, o qual induzia a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (Medzhitov *et al.*, 1997).

Os TLRs são receptores glicoprotéicos integrais de membrana, do tipo I, caracterizados por um domínio extracelular composto de 550 a 950 aminoácidos que contêm motivos repetidos ricos em leucina (LRR) N-terminais, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização citoplasmática homólogo ao receptor de interleucina de tipo I (IL-1R),

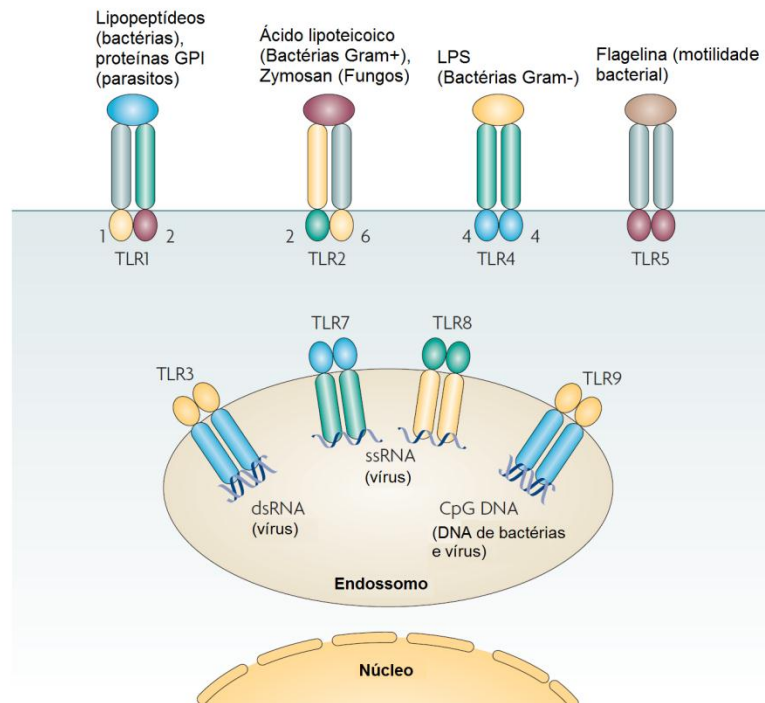
denominado domínio de homologia Toll/IL-1R (TIR) (Beutler *et al.*, 2006) (Figura 3). Apesar desta similaridade entre estes dois tipos de receptores, os domínios extracelulares não estão relacionados estruturalmente, sendo que o IL-1R possui um domínio do tipo imunoglobulina, enquanto que no TLR a estrutura do LRR consiste de uma folha beta pregada e uma alfa hélice conectadas por alças, e se postula que esta estrutura com superfície côncava esteja envolvida diretamente no reconhecimento de diversos patógenos (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2005) (Figura 3).



**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura geral de um TLR (Adaptado de Beutler *et al.*, 2006).

Foram identificados 13 TLRs em camundongos e 10 TLRs em humanos, cada um caracterizado por sua especificidade em reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (Kumar *et al.*, 2011). TLR1-TLR9 são conservados em humanos e camundongos, TLR10 é expresso em humanos, mas não em camundongos devido a um *stop-codon* no gene TLR10 murino. TLR11, TLR12 e TLR13 não estão presentes no genoma humano e no camundongo não estão bem caracterizados, pois sua função, assim como a do TLR10 humano, ainda permanece desconhecida (Kawai & Akira, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011). Os membros da família dos TLRs podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua localização celular. O grupo formado por TLR1,

TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 (este último presente em camundongos, mas não em humanos) inclui moléculas expressas exclusivamente na superfície celular e que reconhecem PAMPs derivados de bactérias, fungos e protozoários, tais como lipídios, lipoproteínas e proteínas, enquanto que TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, conhecidos como TLRs intracelulares ou endossomais, reconhecem PAMPs de ácidos nucleicos derivados de vírus e bactérias. Especificamente, TLR3 reconhece RNA dupla fita; TLR7 e TLR8 RNA simples fita (ssRNA); TLR9 DNA dupla fita ou simples (ssDNA/dsDNA) (Kawai & Akira, 2006) (Figura 4). 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. Hoje sabe-se que os motivos CpG não são obrigatórios para o reconhecimento pelo TLR9 e que esse reconhecimento depende apenas da estrutura do açúcar desoxirribose 2' fosfato do DNA, o qual parece ser o principal determinante na união TLR9-DNA (Haas *et al.*, 2008; Kawai & Akira, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Localização dos TLRs de mamíferos e seus ligantes mais conhecidos  
(Adaptado de Borden *et al.*, 2007).

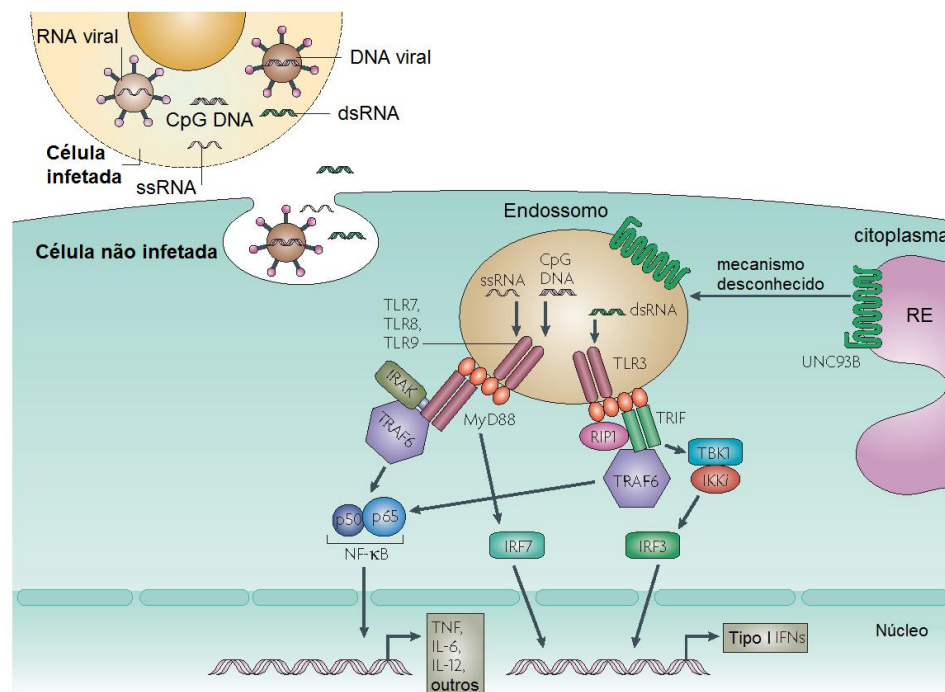
Para distinguir os ácidos nucleicos próprios e não próprios esses TLRs intracelulares são exclusivamente expressos dentro de compartimentos endocíticos, onde o DNA do hospedeiro geralmente (mas não sempre) é excluído, sendo que tudo isso acontece em um estado particular de acidificação e maturação do endossomo. É importante ressaltar que muitos vírus são detectados somente pelos TLRs endossomais (Blasius & Beutler, 2010).

As células que expressam TLRs são predominantemente células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como células dendríticas convencionais (cDCs), células dendríticas plasmocíticas (pDCs), células B e macrófagos. A via clássica de sinalização, após o TLR reconhecer seu ligante, inicia com o recrutamento da proteína adaptadora MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88), à porção citoplasmática dos TLRs através de interações homofílicas dos seus domínios TIR, que ativa os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1 (proteína ativadora-1) (Blasius & Beutler, 2010). Algumas das proteínas adaptadoras, como TRIF, TIRAP/Mal, TRAM e SARM, já foram caracterizadas (Takeuchi & Akira, 2010). Esse evento de sinalização descrito acima resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-alfa, IL-6 e IL-12, mas não IFN-1 (interferon de tipo 1). Porém, nas pDCs existe uma via alternativa, única nesse tipo de células, que resulta na produção abundante de IFN-1 através da sinalização dos TLR7/9 (Blasius & Beutler, 2010). As pDCs 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).

### **1.6.1 Transporte de TLRs intracelulares/endossomais**

Como já foi descrito acima, TLR3/7/8/9 estão implicados na defesa anti-viral. TLR3 é expresso em células dendríticas mieloides (mDC), TLR7/9 predominantemente em células dendríticas plasmocíticas (pDC), mas também em células B e macrófagos, já o TLR8 é expresso em mDC e macrófagos (Kadowaki *et al.*, 2001). A organização dos TLRs

intracelulares 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, que requer estágios de maturação no complexo de golgi e clivagens proteolíticas, existe para assegurar que os TLRs estarão adequadamente localizados (Blasius & Beutler, 2010). Nas cDC, UNC93B1, uma proteína localizada no retículo endoplasmático (ER), tem um papel crítico no transporte de TLR7/8/9 até o endossomo (Kumar *et al.*, 2011). Em células pDCs, que utilizam uma via alternativa, MyD88 é necessário para a produção de citocinas pró-inflamatórias e IFN-1, quando essas células são ativadas por PAMPs detectados pelos TLR7 e 9. Nesse caso, MyD88 recruta várias proteínas de sinalização, tais como IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1 e IKKa, o qual fosforila e ativa IRF7 (fator regulador de interferon 7), constitutivamente expresso na célula, para iniciar a transcrição de IFN-1 e assim incluindo IFN-alfa e IFN-beta (Blasius & Beutler, 2010; Kawai & Akira, 2006; Kumar *et al.*, 2011; Takeuchi & Akira, 2010) (Figura 5).



**Figura 5.** Cascata de sinalização ativada pelos TLR7/8/9 após reconhecimento de seus ligantes (Adaptado de Beutler *et al.*, 2007).

A maturação endossomal pode, em alguns casos, facilitar a destruição de micróbios, a fim de liberar os ligantes contidos dentro deles, mas também pode contribuir para o processamento essencial dos próprios TLRs. Por exemplo, ao atingir o compartimento endolisossomal, o ectodomínio do TLR9 é proteoliticamente clivado por proteases (um TLR9 completo é encontrado unicamente no retículo endoplasmático). Várias proteases têm sido implicadas na clivagem do TLR9, como catepsinas e asparagino endopeptidase. A clivagem do TLR9 é necessária para o recrutamento do MyD88 e início da sinalização. Um processo similar de clivagem foi observado para o TLR7 (Blasius & Beutler, 2010).

### **1.6.2 Envolvimento dos TLR7/8/9 na infecção por HIV**

Como descrito anteriormente, observamos que o vírus utiliza a maquinaria de replicação do hospedeiro para sua replicação. Além disso, o vírus aproveita o reconhecimento pelo sistema imune inato, por exemplo: uma vez ativados, os TLRs (com exceção do TLR3) irão desencadear a ativação dos fatores de transcrição celulares NF- $\kappa$ B e AP-I, os quais são capazes de ativar a replicação do vírus (Báfica *et al.*, 2004). Então, ao mesmo tempo em que as células estão sinalizando uma invasão viral através da produção de citocinas pró-inflamatórias e IFN, há ativação de NF- $\kappa$ B e a replicação do HIV está sendo estimulada.

O primeiro estudo que observou uma união direta entre os PRRs e o HIV foi publicado em 2004. Heil *et al.* (2004) demonstraram que o ssRNA derivado de HIV é reconhecido pelos TLR7/8, os quais estimulam a produção de IFN- $\alpha$  e citocinas pró-inflamatórias por DCs e macrófagos. Recentemente foi sugerido que a infecção de DCs pelo vírus necessita de duas vias de transdução de sinais dependentes do HIV-1: a) O reconhecimento de ssRNA do HIV pelo TLR8 ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B e inicia a transcrição do provírus integrado ao genoma do hospedeiro; b) A interação entre a proteína gp120 do HIV com a proteína DC-SIGN (receptor de tipo lectina expresso na

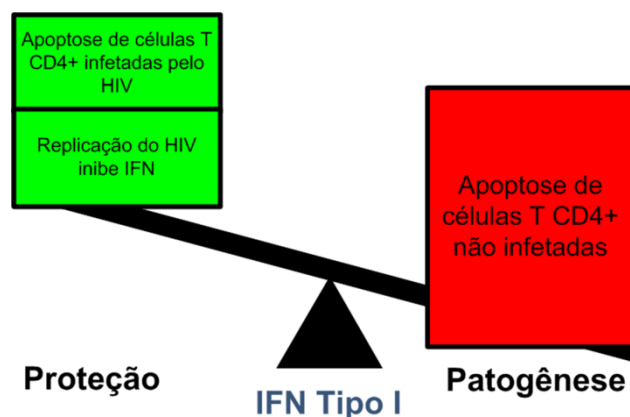
membrana das DCs) induz uma fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B dependente de Raf, a qual é necessária para sintetizar transcritos virais completos e conseqüentemente permitir uma infecção de sucesso (Gringhuis *et al.*, 2010). Outro estudo observou que a estimulação dos TLR7/8 induz mudanças não favoráveis para o microambiente do HIV, com a presença de células NK e linfócitos T CD8+, embora nenhum fator específico solúvel responsável por esses efeitos tenha sido identificado (Boasso & Shearer, 2008; Schlaepfer & Speck, 2008). Finalmente, outro estudo observou que o HIV contribui diretamente na ativação e disfunção do sistema imune após estimulação do TLR7, pois análises histopatológicas em camundongos evidenciaram destruição progressiva do sistema linfoide, caracterizada por linfopenia, abolição na produção de anticorpos, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, esplenomegalia e alterações na microarquitetura linfoide do órgão afetado após ativação de TLR7 (Baenziger *et al.*, 2009).

Apesar do HIV apresentar seu genoma na forma de RNA, acredita-se que o TLR9 seja capaz de reconhecer tanto o ssDNA quanto o dsDNA do vírus após o processo de retrotranscrição, primeiro no citoplasma e logo no núcleo da célula. Estudos vêm demonstrando uma relação deste receptor com o curso da infecção, embora os resultados ainda sejam insuficientes para a compreensão completa do mecanismo. Segundo Martinelli *et al.* (2007) a concentração de TLR9 é reduzida em células B de indivíduos infectados pelo HIV e a proteína gp120 (do envelope do vírus) inibe a ativação das células pDCs que expressam TLR9, conseqüentemente inibindo a produção de IFN-alfa. Tais processos acabam gerando respostas celulares deficientes. Porém, já foi observado que a administração de motivos CpG de DNA em camundongos ativa pDCs via TLR9, gerando patologias linfoides, tais como hiperplasia linfonodal, interrupção da microarquitetura folicular e diminuição do número de células CD4+ e CD8+ (Heikenwalder *et al.*, 2004). Por outro lado, o trabalho *ex vivo* de Brichacek *et al.* (2010) com tecido linfóide tonsilar demonstrou que a replicação do HIV sofreu redução na presença de agonistas do TLR9.

Com todos esses achados pode-se observar que a ativação da resposta imune inata ante a presença do vírus não está bem esclarecida e é ainda um assunto controverso. Como



anteriormente salientado, já foi descrito que um acontecimento importante durante a infecção é a produção de IFN-1, o qual tem atividade anti-viral, porém IFNs poderiam também prejudicar o sistema imune do hospedeiro com uma notável ativação imune crônica (Herbeuval & Shearer, 2007) (Figura 6). Esses IFNs podem ser induzidos através da sinalização de PRRs, tais como os TLRs, que reconhecem PAMPs derivados do HIV ou de patógenos oportunistas.



**Figura 6.** Mecanismo paradoxo da função do IFN tipo 1 (Adaptado de Herbeuval & Shearer, 2007).

### 1.6.3 Co-infecção e TLRs

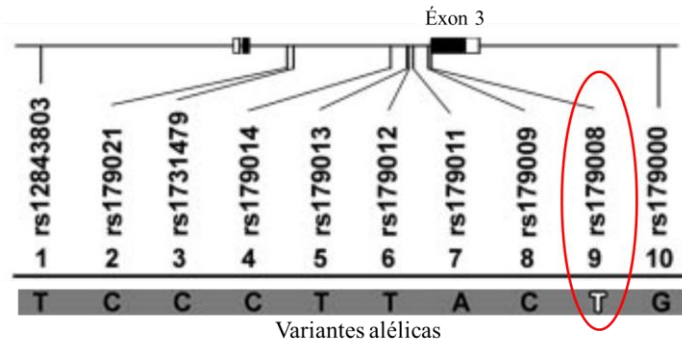
A ativação do sistema imune inato durante a infecção do HIV não somente envolve PAMPs derivados do HIV, mas também envolve PAMPs originados de patógenos oportunistas e da translocação bacteriana através da barreira mucosa gastro-intestinal (Brenchley *et al.*, 2006). A grande quantidade de bactérias patogênicas presentes durante o período da infecção do HIV é reconhecida pelos PRRs desencadeando uma ativação imune (Mogensen *et al.*, 2010). Um estudo em humanos já demonstrou que quase todos os TLRs podem induzir ativação e morte de células T CD4+ e CD8+, o que pode contribuir à patogênese da imunodeficiência durante uma infecção crônica do HIV (Funderburg *et al.*, 2008; Equils *et al.* (2001), observaram em microvasos dérmicos de células endoteliais humanas que o LPS de bactérias ativa a região LTR (*long terminal repeat*) do HIV

através de TLR4. Isso é mediado pela ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B junto ao elemento LTR do HIV, o que induz a replicação viral. Por outro lado, um estudo clínico recente com pacientes infectados pelo HIV associou níveis elevados de LPS com uma infecção crônica e observou que a tolerância de LPS foi diminuída em indivíduos HIV+, sugerindo que nesses pacientes a infecção pelo HIV desregula uma resposta natural dos TLRs e subsequentemente leva a uma endotoxemia subclínica (Lester *et al.*, 2009). Os vírus do HIV, da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) correspondem às três infecções virais crônicas mais comuns documentadas no mundo. Esses vírus têm rotas de transmissão similares, através do sangue e seus derivados, por uso comum de agulhas para injetar drogas ou através de atividade sexual, tornando a co-infecção um evento comum. Quanto a TLRs intracelulares, seu papel nas co-infecções ainda não foi esclarecido, mas já foi proposto um provável papel duplo de IFN via sinalização de TLR7 durante a co-infecção HCV/HIV-1. Por um lado, ambos os vírus gerariam uma sinalização crônica do TLR7 e por outro, esse efeito poderia neutralizar a produção deficiente de IFN nos pacientes infectados com ambos os vírus. Mas esse mecanismo não está bem esclarecido e faltam estudos que avaliem o papel do IFN na co-infecção HCV/HIV-1 (Gonzalez *et al.*, 2010). Também, observou-se que uma monoinfecção crônica com HBV está associada a baixos níveis de células T CD4+ o que é produto de uma ativação imune, tal efeito também já foi descrito em uma infecção crônica pelo HIV. Conseqüentemente a esses achados foi proposto que uma co-infecção com HBV/HIV poderia causar uma ativação imune sinérgica que promoveria um decréscimo severo de células T CD4+ (Li *et al.*, 2012). Por outro lado, já foram observados níveis elevados de ativação imune em indivíduos co-infectados com HBV/HIV-1 quando comparados com indivíduos monoinfectados com HIV-1 (Gonzalez *et al.*, 2010). Contudo, os processos pelos quais esses vírus, via interações sinérgicas e agonísticas, influenciam na resposta imune e a progressão da doença certamente são complexos e merecem melhores estudos.

#### 1.6.4 Imunogenética dos TLR7/8/9

O gene TLR7 localiza-se no cromossomo X, na região Xp22.3-p22.2 em humanos e possui 3 éxons (Figura 7). O polimorfismo rs179008, localizado no éxon3, corresponde a uma troca de uma adenina por uma timina e resulta na troca não-sinônima de um resíduo de Glutamina por um de Leucina na posição 11 da proteína (Gln11Leu). Uma análise *in silico* revelou que essa troca está localizada na sequência peptídeo sinal, o que provavelmente afeta o direcionamento do TLR7 e a sua maturação no complexo de Golgi, diminuindo, assim, a concentração desta molécula nos endossomos (Møller-Larsen *et al.*, 2008). Um estudo observou que a variante alélica T ou 11Leu está relacionada com o aumento da carga viral, progressão acelerada da infecção e aumento da susceptibilidade em mulheres em uma coorte de pacientes infectados por HIV-1 (Oh *et al.*, 2009). Além disso, o mesmo grupo de pesquisadores avaliou funcionalmente (*ex vivo*) a variante T e observou que as células mononucleares dos portadores do alelo T, as quais haviam sido previamente induzidas com imiquimod (ligante sintético do TLR7), secretavam significativamente menos IFN-alfa, porém a produção de IL-6 permanecia inalterada. Visto que a expressão da IL-6 é induzida pelo NF-κB e IFN-alfa via IRF7, o estudo demonstrou que o TLR7 tem um importante papel na sinalização IRF7/IFN (Oh *et al.*, 2009). Em contraste, um estudo mais recente em outra coorte de pacientes HIV-1+, não observou diferenças significativas na produção de IFN-alfa em pDCs ativadas pelo HIV-1 quando comparados indivíduos dos diferentes genótipos AA/A,AT, TT/T (Chang *et al.*, 2011). Tal discrepância poderia ser explicada pela diferença dos ligantes utilizados, no primeiro caso o uso de imiquimod e no segundo o ssRNA do HIV-1 inativado. Em outros estudos, essa mesma variante alélica foi associada com o aumento da susceptibilidade à infecção por HCV e com resposta não favorável à terapia baseada em IFN-alfa em mulheres infectadas por HCV (Schott *et al.*, 2008). Outro estudo, também com HCV, viu que o alelo T está associado com a presença de agregados linfóides no trato portal de pacientes infectados por HCV e com a menor expressão do mRNA de IL-29/IFN-lambda e de subunidades de IL-10R e IL-28R no fígado de mulheres homozigotas TT e homens hemizigotos T (Askar *et al.*, 2010). Com relação a outras situações patológicas, apesar dos

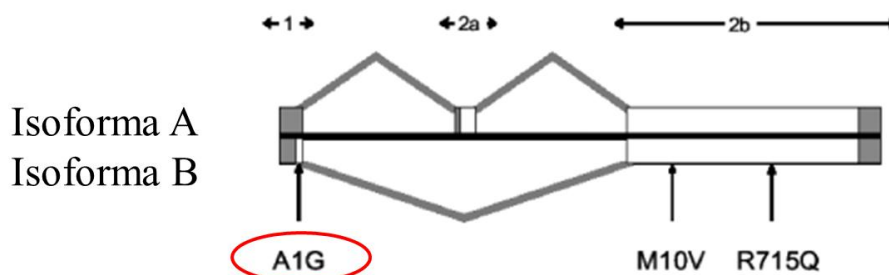
poucos estudos existentes, esse polimorfismo já foi associado com degeneração macular relacionada à idade (Edwards *et al.*, 2008) e doenças inflamatórias como a asma (Møller-Larsen *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Estrutura do gene *TLR7* e localização do polimorfismo rs179008 (Adaptado de Edwards *et al.*, 2008).

O gene *TLR8* situa-se no cromossomo X, na região Xp22.3-p22.2, aproximadamente 16kb a jusante do gene do *TLR7* e possui 3éxons (Figura 8). Estudos de ligação analisando a região dos genes *TLR7* e *TLR8* revelou um grau de desequilíbrio de ligação muito baixo entre eles, indicando que as associações observadas para quaisquer polimorfismos nestes genes devem representar sinais independentes (Cheng *et al.*, 2007; Møller-Larsen *et al.*, 2008). A transcrição de *TLR8* dá origem a duas isoformas de TLR8, denominadas TLR8v1 e TLR8v2, com sítios alternativos de início de tradução (Chuang & Ulevitch, 2000; Du *et al.*, 2000). O polimorfismo rs3764880, chamado alelo G ou A1G, cuja variante 1Val troca o códon de início traducional (Met1Val), não altera a taxa transcripcional do gene nem a função da proteína, mas controla a tradução fazendo com que o transcrito TLR8v2 seja menos traduzido que o TLR8v1 (Gantier *et al.*, 2010). A diminuição do nível traducional em TLR8v2 pela presença do alelo G pode reduzir a ativação e sinalização do TLR8. No entanto, poucos estudos avaliando essa variante já foram realizados, dentre eles, um estudo demonstrou o efeito protetivo da variante G levando à diminuição da ativação do NF-κB a qual resulta em uma ativação reduzida do

sistema imune (Oh *et al.*, 2008). Da mesma forma, (Davila *et al.*, 2008) observaram que o alelo G foi associado à proteção contra tuberculose ativa, sendo que o reconhecimento fagossomal de *M. tuberculosis* acarreta uma limitada resposta imune. Por último, essa variante também já foi associada com asma (Møller-Larsen *et al.*, 2008) e susceptibilidade à infecção pelo vírus da febre Crimean-Congo (Engin *et al.*, 2010).

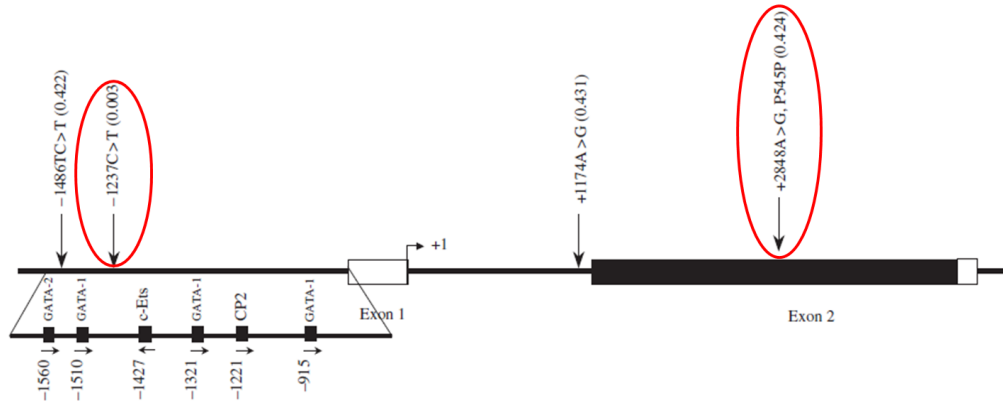


**Figura 8.** Estrutura do gene *TLR8* e localização do polimorfismo rs3764880 (Adaptado de Oh D.-Y *et al.*, 2008).

O gene *TLR9* está localizado no cromossomo 3, região 3p21.3 e tem 2 éxons, sendo que o segundo exon contém a maior proporção codificante (Du *et al.*, 2000; Hur *et al.*, 2005) (Figura 9). Diversos polimorfismos foram descritos nesse gene e, dentre eles os polimorfismos rs5743836 (T-1237C) e a rs352140 (G2848A) representam os quatro haplótipos mais frequentes em amostras populacionais de diferentes etnias (Lazarus *et al.*, 2003). O polimorfismo rs352140 (G2848A ou G1635A) corresponde à troca de uma guanina por uma adenina na posição +2848 do exon 2, mutação silenciosa. O genótipo AA foi associado com maior expressão do gene e maior frequência de células B positivas para IgM intracelular (Kikuchi *et al.*, 2005), mas não há ainda estudos funcionais considerando essa variante. Já o polimorfismo rs5743836 (T-1237C) está localizado na região promotora na posição -1237 e ele consiste na troca de uma timina para uma citosina, inserindo um potencial sítio de ligação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no promotor do gene *TLR9* (Hamann *et al.*, 2006). Diferentes estudos reportaram que esses dois polimorfismos estão associados a várias doenças inflamatórias e processos de alergia (Berghöfer *et al.*, 2005; Noguchi *et al.*, 2004), susceptibilidade a infecções (Carvalho *et*

*al.*, 2007; Peixoto-Rangel *et al.*, 2009), asma (Lachheb *et al.*, 2008; Lazarus *et al.*, 2003; Noguchi *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2009), arteriosclerose (Hamann *et al.*, 2006), lúpus eritematoso (dos Santos *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2005) e doença de Crohn (Török *et al.*, 2004; Török *et al.*, 2009). Especificamente em relação ao HIV/AIDS, o trabalho de (Bochud *et al.*, 2007) investigou a influência do polimorfismo rs352140 na progressão para AIDS, sendo que os genótipos 2848AG e GG foram associados com a progressão rápida. No entanto, (Soriano-sarabia *et al.*, 2008) encontraram um resultado oposto em uma coorte Espanhola, pois o genótipo GG foi associado a maiores níveis de células T CD4+ e uma progressão lenta. 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 circulante, e conseqüentemente, a uma progressão mais lenta. Logo depois, (Ricci *et al.*, 2010) observaram a significância do alelo C (quando combinado com outro polimorfismo, rs352139, do *TLR9*) na modulação da transmissão materno-fetal do HIV-1, confirmando a importância desses polimorfismos do *TLR9* na infecção perinatal pelo HIV-1. Da mesma forma (Freguja *et al.*, 2012) acharam que a presença da variante alélica C também em combinação com o rs352139 (haplótipo GG) foi significativamente associada com alto risco e progressão rápida em crianças infectadas pelo HIV-1. Até o momento, apenas dois estudos avaliaram a influência do outro polimorfismo, rs5743836, no curso da infecção pelo HIV. Bochud *et al.* (2007) investigaram esta variante em uma coorte europeia de pacientes HIV-1+ classificados como progressores rápidos e não-rápidos, mas não detectaram associação da variante C com progressão para AIDS, embora a frequência do alelo C tenha sido maior nos progressores não rápidos. Pouco depois, Pine *et al.* (2009), investigaram essa mesma variante em uma coorte norte americana e associaram a presença do alelo C com carga viral elevada e evolução rápida para AIDS, mas essas associações não foram significativas após correção para múltiplas comparações. Mais recentemente foi proposto um modelo de *feedback* do efeito do alelo C, os pesquisadores observaram que células mononucleares de sangue periférico com o genótipo TC expressavam altos níveis de *TLR9* levando a uma proliferação aumentada de células B e IL-6 em resposta a CpG, propondo que a troca de T por C geraria um novo elemento regulatório na região

promotora do *TLR9* aumentando sua ativação transcripcional dependente da sinalização de IL-6 (Carvalho *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Estrutura do gene *TLR9* e localização dos polimorfismos rs5743836 e rs352140 (Adaptado de Hur *et al.*, 2004).

Considerando o papel importante dos TLR7, 8 e 9 no reconhecimento do HIV-1 e as diferentes respostas interindividuais nas populações frente ao vírus, o presente estudo visa analisar as frequências dos polimorfismos rs179008 no *TLR7*, rs3764880 no *TLR8*, rs5743836 e rs352140 no *TLR9* em indivíduos HIV-1 positivos e controles saudáveis de uma amostra com ancestralidade europeia e africana do Sul do Brasil, buscando uma possível associação entre esses fatores na infecção com HIV-1.

## II.OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é verificar as frequências das variantes alélicas dos genes *TLR7*, *8* e *9* em pacientes HIV-1 positivos e comparar com indivíduos saudáveis.

### 2.2 Objetivos específicos

- Comparar as frequências alélicas e genóticas entre o grupo de pacientes e controles.
- Estimar e comprar as frequências haplotípicas dos polimorfismos do *TLR9* entre o grupo de pacientes e controles.
- Comparar as frequências destes polimorfismos entre os subgrupos de pacientes portadores do HIV sem co-infecção e co-infectados com hepatite C.



### **III. ARTIGO CIENTÍFICO**

---

Artigo em fase de preparação com formatação para ser enviado à revista científica *AIDS*

**ASSOCIATION OF *TLR7*, 8 AND 9 POLYMORPHISMS IN THE  
SUSCEPTIBILITY TO HIV-1 INFECTION IN SOUTHERN BRAZILIAN  
PATIENTS**

Running head: *TLR7*, 8 AND 9 POLYMORPHISMS IN HIV INFECTION

Jacqueline VALVERDE-VILLEGAS<sup>1</sup>, Bruno Paiva DOS SANTOS<sup>1</sup>, Vanessa Suñé  
MATTEVI<sup>2</sup>, Rosmeri Kuhmer LAZZARETTI<sup>3</sup>, Eduardo SPRINZ<sup>3</sup>, Regina KUHMMER<sup>3</sup>,  
José Artur Bogo CHIES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

<sup>3</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

This work was funded by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). CHIES, J.A.B received a CNPq grant 306349/2011-6 . VALVERDE, J.V received a CNPq grant 190760/2010-9

Total number of words: 4,524

**Corresponding author:**

Dr. José Artur Bogo Chies. Email address: [jabchies@terra.com.br](mailto:jabchies@terra.com.br)

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

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

Porto Alegre, RS-Brazil. PO BOX 15053

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

## ABSTRACT

**Objective:** This study investigates the role of *TLR7/8/9* genes in susceptibility to HIV-1 infection through the analyses of *TLR7* rs179008, *TLR8* rs3764880, *TLR9* rs5743836 and rs352140 polymorphisms.

**Materials and methods:** The frequency of the variant alleles was analyzed in 366 HIV-1 adults patients infected and 415 healthy individuals from the southernmost state of Brazil. The promoter variant from *TLR9* was genotyped using a BI-PASA technique and the others polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP. Chi-square and Fisher test was used to compare allelic and genotypic frequencies between patients and controls. All statistical analyses were conducted controlling by gender and ethnic origin.

**Results:** Among the Euro-derived individuals, statistically significant differences were observed for genotypic and allelic frequencies of the promoter variant *TLR9* rs5743836 between patients and controls ( $P=0.028$  and  $P=0.011$ , respectively). The CC genotype was observed at higher frequency in patients when compared to controls (residual  $P=0.040$ ) and conferred susceptibility (OR=1.53; 95% CI: 1.05-2.23;  $P=0.030$ , dominant model). However, among the Afro-derived individuals, the TC genotype was less represented in patients when compared with controls (residual  $P=0.006$ ) and conferred protection (OR=0.60; 95% CI: 0.36-0.99;  $P=0.049$ , dominant model). No statistical significant differences were observed for all other polymorphisms or haplotypic analyses when patients and controls were compared.

**Conclusions:** The present study reveals a fundamental role of the *TLR9* rs5743836 polymorphism against HIV-1 infection, the CC genotype confer susceptibility among Euro-derived individuals while TC genotype confer protection in the Afro-derived individuals. The difference observed when patients were stratified by ethnic origin highlights the importance of the genetic background, and specific of genes involved in immune responses, in susceptibility to virus infection, pointing to the need of studies in different human admixed populations.

Keywords: TLRs, HIV-1, polymorphisms, ethnicity

## **INTRODUCTION**

According to the last global report published by The Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS), there are around 34.0 million people living with HIV worldwide and around 1.7 million people died from AIDS-related causes in 2011. This represents a 24% decline in AIDS-related mortality compared to 2005 (when around 2.3 million deaths occurred) [1]. By 2010, in Brazil 34,218 new cases of AIDS were notified, with a national incidence rate of 17.9/100,000 inhabitants. In this year 11,965 people died, which represents an 11.1% decline in AIDS-related mortality in the last ten years [2].

The comprehension of the innate immunity role in the initial detection of HIV-1 and in an efficient response against the virus has been increased in recent years. Besides, the susceptibility to HIV-1 infection and pathogenesis has been associated to polymorphisms in involved genes in innate immune response [3].

Toll-like receptors (TLRs) are the most widely studied Pattern Recognition Receptors (PRRs) and are considered to be primary sensors of pathogens. TLRs are type I membrane glycoproteins and consist of extracellular leucine rich repeats (LRRs) that are required for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) recognition, and a cytoplasmic Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain, required for downstream signaling [4]. Their activation induces intracellular signaling pathways that result in production of inflammatory cytokines as well as type I interferons (IFNs) [5]. TLR1, 2, 4, 5 and 6 are primarily expressed on the cell surface and recognize PAMPs derived from bacteria, fungi and protozoa, whereas TLR3, 7, 8 and 9 are exclusively expressed within endocytic compartments and primarily recognize nucleic acid PAMPs derived from viruses and bacteria [5-7]. Many viruses are perceived only by TLR3, 7, 8 and 9, known as endosomal TLRs [8]. In humans, RNA from RNA viruses is sensed by TLR7 and TLR8 (the function

of murine TLR8 is not known) [4]. TLR9 was originally described as binding to bacterial DNA. Its specificity was initially thought to be directed toward CpG motifs, which are four times less abundant (and mostly methylated) in mammalian genomic DNA than in bacterial or viral DNA [7]. However, recent work has been shown that DNA recognition by TLR9 depends on the 2' deoxyribose phosphate backbone, which is necessary to induce a response [9]. TLR7 and TLR9 are expressed in both B and plasmacytoid dendritic cells (pDC), and are responsible by abundant quantities of Type I IFN. TLR8 is expressed in monocyte-derived cells, such as macrophages and myeloid DC (mDC) [10].

A study demonstrated that guanine-uridine-rich ssRNA derived from HIV is recognized by TLR7/8 and stimulates DCs and macrophages to secrete IFN-alpha and proinflammatory cytokines [11]. Also, strong evidence for the involvement of TLR7 triggering in immune activation was provided by histopathological studies in mice, which showed that activation of TLR7 leads to disruption of the lymphoid system, including lymphopenia, abolishment of antibody production, and alterations in lymphoid microarchitecture that resembles HIV-mediated pathology [12, 13]. In another hand, direct interaction of HIV gp120 with pDCs inhibits TLR9-mediated responses, including pDC activation, IFN-alpha secretion and cytolytic activity of NK cells [14]. This observation indicates that probably in certain situations, HIV inhibits innate immune activation, and that it could be advantageous for HIV to evade the innate immune system [15].

The *TLR7* gene is located on Xp22.3-p22.2. An *in silico* analysis identified an interesting polymorphism, rs179008, which is a non-synonymous change of a Gln (A allele) → Leu (T allele) at position 11 of the peptide. This polymorphism shortens the TLR7 protein N region and extends the hydrophobic region within the signal sequence, potentially affecting TLR7 processing [16]. A study showed that the presence of the Leu variant results in significantly less IFN-alpha production which was associated with accelerated disease progression and may also be associated with increased HIV susceptibility [17].

*TLR8* is located on Xp22.3-p22.2, 16 kb away from *TLR7*, with little linkage disequilibrium between them [16, 18]. This gene encodes two splice variants (*TLR8v1* and *TLR8v2*) with alternative translation start sites [19]. A study showed that the control of protein expression is fine-tuned by rs3764880, a polymorphism that leads to an A → G exchange at the first codon position, the G allele being responsible for increasing *TLR8v1* translation without changes in mRNA levels or protein function [20]. Interestingly, a study demonstrated a protective effect of the G variant, namely a slower clinical natural course of the disease in patients with HIV, through to a decreased NF-kappaB release that results in a reduced activation state of the immune system [21]. In the same way, the G allele was also associated to protection against damage from active tuberculosis [22].

The *TLR9* gene is located on 3p21.3 and polymorphisms of this gene were analyzed by Lazarus *et al.*, (2003), and a screening of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated to different diseases into three ethnics groups was performed. From the studied SNPs two, rs5743836 (T-1237C) and rs352140 (G2848A), distinguish the four commonest *TLR9* haplotypes [23]. The rs5743836 polymorphism is located in the promoter at the position -1237 and corresponds to a T → C exchange, creating a potential binding site for NF-kappaB [24]. This polymorphism has been implicated in chronic inflammatory and in infectious diseases, including asthma [23], pulmonary aspergillosis [25], systemic lupus erythematosus (SLE) [26] and even Crohn's disease [27, 28]. The rs352140 polymorphism is located at position +2848, in exon 2 and corresponds to a G → A exchange, that do not alters the amino acid sequence. Nevertheless, the AA genotype has already been associated with high *TLR9* expression and intracellular IgM in B cells in patients with primary biliary cirrhosis [29]. There are no studies reporting functional assays for this polymorphism. Besides, these two SNPs in *TLR9* have been linked to viral load, CD4+ T cell count and disease progression in HIV-infected individuals and mother-to-child HIV transmission [30-33].

Considering the potential involvement of *TLR7/8* and 9 on HIV-1 recognition and considering the existence of differences on individual immune responses against HIV it is

important to characterize the genetic variations in hosts from different populations. The present study aims to analyze the frequency of the *TLR7* rs179008, *TLR8* rs3764880, and *TLR9* rs5743836 and rs352140 polymorphisms among HIV-1 positive individuals and healthy controls from a sample with European and African ancestry from Southern Brazil, looking for a possible association between TLR genes and HIV infection.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and controls**

A total of 366 samples of HIV-infected patients from the South Brazilian HIV Cohort (SOBRHIV) [34] at the HIV/AIDS outpatient clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil, were consecutively enrolled. All patients were on HAART for at least 1 year. All were more than 18 years old, with viral load < 50 copies per milliliter (HAART prescribed according to Brazilian guidelines at that time). Exclusion criteria were pregnancy or mental illness. Of patients, 213 (58%) were men and 153 (42%) were women, with age ranging from 19-73 years, and 112 (33.3%) were diagnosed with HCV (Hepatitis C virus) co-infection. According to phenotypic characteristics of individuals and ethnicity, 212 (57.9%) were classified as European-derived and 154 (42.1%) were classified as African-derived (table 1). Issues regarding the skin color-based classification criteria that is used in Brazil are well documented [35-37] and have been already assessed by our group in previous studies [26, 38, 39]

The control group was composed by 415 healthy people from the same urban center: 191 (46%) were women and 224 (54%) were men. Of all of them, 309 (74.4%) individuals were European-derived and 106 (25.6%) were African derived (table 1). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and informed consent according to the Declaration of Helsinki was obtained from all patients.

## Genotyping

DNA was isolated using a salting-out method [40] and stored at -20°C. The *TLR7* rs179008, *TLR8* rs3764880 and *TLR9* rs352140 polymorphisms were amplified by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using *ApoI*, *NlaIII* and *BstUI* restriction endonucleases, respectively, using the protocol described by Cheng and colleagues [19]. After treatment with restriction endonucleases, *TLR7* rs179008 and *TLR9* rs352140 cleavages were visualized in a 6% polyacrylamide gel and *TLR8* rs3764880 was visualized in a 8% polyacrylamide gel, all of them stained with silver nitrate. *TLR9* rs5743836 was genotyped as described by Carvalho and colleagues [41] with modifications and visualized in a 1.8% agarose gel stained with ethidium bromide.

## Statistical analysis

A descriptive analysis of data through calculation of mean and standard deviation for quantitative variables was performed, while frequency and percentage were calculated for categorical data. We used the chi-square test or Fisher's exact test in the comparisons between allelic and genotypic frequencies. Besides, odds ratio (OR) and confidence intervals (CI) were calculated. The Hardy–Weinberg equilibrium test was performed in cases and controls using the Chi-square test. Haplotype frequencies,  $D'$  and  $r^2$  were estimated using MLocus program. A two tailed value of  $P < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

For the case-control study, we tested each of the 8 alleles with 1-degree-of-freedom (d.f) allelic test, 2-d.f. genotypic test, 1-d.f. Cochran-Armitage trend test. All statistical analyses were performed using SPSS 20.0 and WinPEPI version 11.1 softwares and were conducted controlling by gender and ethnic origin.

## RESULTS

In previous studies of our group we observed a high interethnic diversity in this cohort for other genes [39] and also for *TLRs* genes in another cohort with Systemic lupus



erythematosus (SLE) in this part of Brazil [26]. For this reason, our analyses were performed subdividing the individuals according to ethnic origin. In addition, we subdivided according to gender since *TLR7* and *TLR8* genes are located on the X chromosome. SNPs allelic and genotypic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls.

Table 2 shows genotypic and allelic frequencies in European-derived individuals. The *TLR9* rs5743836 minor C allele was significantly more frequent in patients than in controls (0.21 vs. 0.14,  $P=0.011$ ), suggesting a predisposing effect on HIV-1 susceptibility (OR 1.54; 95% CI: 1.10-2.16 for allele carriers). The rs5743836 genotype distribution was also significantly different between patients and controls ( $P=0.028$ ). An increased frequency of CC genotype was observed in patients as compared to controls (residual  $P=0.040$ ). The C allele behaved according to a dominant model (OR= 1.53; 95% CI: 1.05-2.23;  $P=0.030$ ) rather than to a recessive model (OR= 2.77; 95% CI: 1.01-8.21;  $P=0.034$ ) (table 3). No differences between HIV-1+ patients and controls were observed concerning the others polymorphisms in this ethnic group.

Table 3 shows genotypic and allelic frequencies in African-derived individuals. The rs5743836 genotype distribution was also significantly different between patients and controls ( $P=0.019$ ). We observed that the *TLR9* rs5743836 TC genotype frequency was lower in patients as compared to controls ( $P=0.006$ ). The C allele behaved according to a dominant model (OR= 0.60; 95% CI: 0.36-0.99;  $P=0.049$ ) rather than to a recessive model (OR= 1.96; 95% CI: 0.07-6.23;  $P=0.188$ ) (Table 5). Also, when homozygous individuals were grouped in one category and compared against the GA genotype (GA vs. GG+AA), the results suggested heterozygosity as an HIV-1 protection factor (OR= 0.49; CI 95%: 0.29-0.82;  $P=0.008$ ). No differences between HIV-1+ patients and controls were observed concerning the others polymorphisms in this ethnic group.

In the analysis of linkage disequilibrium (LD) for SNPs *TLR9*, the  $D'$  value between rs5743836 and rs352140 was 0.502 (modest disequilibrium) and the  $r^2$  was 0.057 (5.7% of correlation) in European-derived HIV-1+ patients. While the  $D'$  was 0.250 (low

disequilibrium) and the  $r^2$  was 0.028 (2.8% of correlation) in African- derived HIV-1+ patients. Table 6 shows haplotype analysis for *TLR9* polymorphisms. Comparing patients and controls, no statistical differences were observed in the haplotypic frequencies. Differences due to the ethnic origin of individuals become quite evident when European-derived and African-derived groups were compared. For instance, African-derived individuals have an overall CG haplotypic frequency higher than European-derived individuals.

Table 7 shows the comparison among HIV-infected patients co-infected with hepatitis C virus (HCV) and not co-infected. Among African-derived individuals, for *TLR7* rs179008 we observed an association with protection. The A variant allelic frequency was lower in HCV- hemizygous when compared with HCV+ hemizygous (0.09 vs. 0.28;  $P=0.047$ ), but this association was lost considering the OR associated with this allele (OR=26.0, 95% CI: 0.04-1.11). No differences among allelic and genotypic frequencies were found for the other polymorphisms.

## DISCUSSION

TLR7, 8 and 9 are intracellular receptors that primarily recognize nucleic acid PAMPs derived from bacteria and viruses. They are involved in NF-kappaB activation and in the production of inflammatory cytokines such as type I interferons (IFNs) [3]. TLR7 and TLR9 are expressed in both B and plasmacytoid dendritic cells (pDC), and are responsible for abundant quantities of Type I IFN. TLR8 is expressed in monocyte-derived cells, such as macrophages and myeloid DC (mDC) [8, 10]. Several studies have evaluated functional *TLR7/8/9* polymorphisms in different populations in the context of HIV infection, although the conclusions were somewhat conflicting.

The rs179008 *TLR7* (Gln11Leu) generates a change in the signal peptide sequence of the protein, which affects TLR7 maturation and targeting to endosomes. According to Oh *et al.*, (2009), the presence of the T variant in the *TLR7* was associated with a decline on CD4+ T cell counts and with a decreased production of IFN- $\alpha$  after stimulation of

peripheral blood mononuclear cells with imiquimod, a TLR7 ligand, in a German cohort of HIV-infected women [17]. In this same work, it was observed that the combination of limited antiretroviral IFN- $\alpha$  activity with an increase in viral load led to an accelerated progression to AIDS in HIV-infected women. Also, this variant was already associated to higher susceptibility to HCV infection and less response to an IFN- $\alpha$  based therapy in chronic HCV-infected German women [42]. In contrast, no differences were observed on genotypic or allelic frequencies between patients and controls in our study for this polymorphism.

*TLR8* encodes two splice variants (TLR8v1 and TLR8v2) with alternative translation start sites [19]. The rs3764880 (Met1Val) leads to an exchange at the first codon position, the variant G is responsible for increasing TLR8v1 translation without changes in mRNA levels or protein function [20]. According to Oh *et al.*, (2008), individuals carrying the G allele display a decrease on CD4 T cells number significantly slower, as compared to non-carriers, and were associated with slower AIDS progression. Also, the G allele was associated to protection against damage from active tuberculosis [22]. However, no association between the presence of this polymorphism with HIV-1 infection was observed in the present study when compared patients with controls.

Concerning the *TLR9* rs5743836 polymorphism, differences in both genotypic and allelic frequencies were observed among European-derived patients and controls ( $P=0.028$  and  $P=0.011$ , respectively), suggesting the C allele as a susceptibility factor for HIV-1 infection (OR 1.54; 95% CI: 1.10-2.16 for C allele carriers). Also, a higher frequency of the CC genotype was observed in patients ( $P=0.040$ ) when compared with controls. In contrast, Bouchud *et al.*, (2007) did not find an association of this variant in a European cohort of HIV-infected adults. Pine *et al.*, (2009) described an association of the C allele with high viral load and rapid AIDS progression, although these associations were not significant after corrections. In this late work, the sample was composed exclusively by Caucasian individuals, hindering comparisons with our group. With regard to the rs352140 polymorphism, no associations were observed. In the analyses comparing

African-derived patients with controls, our results showed a lower frequency of the TC genotype in patients as compared to controls ( $P=0.006$ ) suggesting the TC genotype as a protective factor in HIV-1 infection. No associations were observed concerning the rs352140 polymorphism.

*TLR9* haplotypes were also analyzed according to ethnicity and no significant differences were observed in the distribution between patients and controls. However, different haplotypic frequencies between individuals from distinct ethnic origins become evident. For instance, African-derived individuals have an overall CG haplotypic frequency higher than European-derived individuals. Indeed, a previous study had already suggested a higher frequency of the CG haplotype among African-derived individuals [23]. These different frequencies seems to be related to the ethnic origin of the studied individuals, being independent of the disease, since recently, a study from our group obtained similar results in patients with SLE [26]. Of note, this genetic heterogeneity was already observed in studies of this same HIV-1+ cohort with respect to *MBL* polymorphisms [39]. Interestingly, a study about the evolution and natural selection of TLRs in different ethnic groups, described a higher genetic diversity in *TLR9* on African populations when compared with the European and Asian populations [43]. One possible explanation may be a large prevalence of infection by intracellular pathogens in Africa, resulting in a positive pressure in *TLR9*. However, further replication studies in other Brazilian samples of HIV-1+ patients and evolutionary studies need to be done to confirm this hypothesis.

When a comparative analysis between HIV-infected patients co-infected or not with hepatitis C virus was performed, no statistical differences were found for both genotype and allele frequencies for any of the studied polymorphisms excepted for an association with protection against HCV infection observed among African-derived individuals. The A variant allelic frequency was lower in HCV- hemizygous when compared with HCV+ hemizygous patients (0.09 vs. 0.28;  $P=0.047$ ), but this association was lost considering the OR associated with this allele (OR=26.0; 95% CI: 0.04-1.11). So, our results were not

capable to corroborate previous associations of TLR molecules with susceptibility to HCV infection [42, 44]. This may be due to the low sample number when we subdivided the patients according to the presence/absence of co-infection to HCV and ethnicity (n=69 HCV+ and n=106 HCV- in Euro-derived; n= 44 HCV+ and n=86 HCV-, in Afro-derived). Also, our results can reflect the existence of other genetic factors involved in HCV/HIV-1 co-infection.

In conclusion, we suggest that the rs5743836 *TLR9* polymorphism has an important role in HIV infection since it was associated with susceptibility in Euro-derived and Afro-derived individuals. In addition, our data reinforces the fact that further research considering the genetic background of different ethnic groups should be conducted to understand the influence of genetic variability on the course of HIV-1 infection and replication studies in other Brazilian samples of HIV positive patients need to be done.

## **FUNDING**

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number 190760/2010-9]. Scholarship given to Jacqueline Valverde-Villegas by the Programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG).

## **REFERENCES**

1. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. ISBN 978-92-9173-996-7 (Printed version).
2. Boletim Epidemiológico – AIDS e DST. Ano VIII n# 01. ISSN 1517 1159. 2012, Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.
3. Kaur, G and Mehra, N. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. *Tissue Antigens* 2009, **74**: 373-385.
4. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol* 2011, **30**: 16-34.

5. Takeuchi, O and Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010, **140**:805-820.
6. Kawai, T and Akira, S. The Roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009, **21 (4)**: 317-337.
7. Takeda, K and Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005, **17(1)**: 1-14.
8. Blasius, A and Beutler, B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 2010, **32 (3)**:305-315.
9. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, Wagner H. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008, **28**: 315–323.
10. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; **168**: 4531–4537.
11. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, et al. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* 2004, **303**: 1526-1529.
12. Schlaepfer, E and Speck, R. Anti-HIV Activity Mediated by Natural Killer and CD8+ Cells after Toll-Like Receptor 7/8 Triggering. *PLoS One*, **3(4)**: e1999.
13. Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, et al. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 2009, **113**: 377-388.
14. Martinelli E, Cicala C, Ryk DV, Goode DJ, Macleod K, Arthos J, and Fauci AS. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  secretion in plasmacytoid dendritic cells. *PNAS* 2007, **104 (9)**: 3396-3401.
15. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen C and Paludan SR. Innate Immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*, 2010, **7 (54)**: 1-19.
16. Moller-Larsen S, Nyegaard M, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA, Borglum AD. Association analysis identifies *TLR7* and *TLR8* as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax* 2008, **63**: 1064-1069.

17. Oh DY, Baumanna K, Hamoudab O, Eckerta JK, Neumannc K, Küchererb C, et al. A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *AIDS* 2009, **23**:297-307.
18. Cheng PL, Eng HL, Chou MH, You HL, Lin TM. Genetic polymorphisms of viral infection-associated Toll-like receptors in Chinese population. *Transl Res* 2007, **150**: 311–318.
19. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000, **11(3)**:362-71.
20. Gantier MP, Irving AT, Kaparakis-Liaskos M, et al. Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. *Hum Mutat* 2010, **31**: 1069–1079.
21. Oh DY, Taube S, Hamouda O, et al. A functional Toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *J Infect Dis* 2008, **198**: 701–709.
22. Davila S, Hibberd ML, Hari Dass R, et al. Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. *PLoS Genet* 2008, **4**: e1000218.
23. Lazarus R, Klimecki W, Raby B, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene (TLR9): Frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three u.s. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 2003, **81(1)**: 85-91.
24. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, et al. *Toll-like receptor (TLR)-9* promotor polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2006, **364**: 303–307.
25. Carvalho A, Pasqualotto C, Pitzurra L, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 2008, **197**: 618 –21.
26. dos Santos B, Valverde J, Rohr P, et al. *TLR7/8/9* polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from southern Brazil. *Lupus* 2011, **0**: 1–8.
27. Torok H, Glass J, Endress I, et al. Epistasis between *toll-like receptor-9* polymorphism and variants in *NOD2* and *IL23R* modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009, **104**: 1723-1733.

28. Torok, H, Glas J and Tonenchi L. Crohn's disease is associated with a *Toll-like receptor-9* polymorphism. *Gastroenterology* 2004, 127(1): 365-366.
29. Kikuchi K, Lian Z, Kimura Y, et al. Genetic polymorphisms of *Toll-like receptor 9* influence the immune response to CPG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *J autoimmun.* 2005, 24: 347–352.
30. Bochud P, Hersberger M, Taffé P, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *Aids.* 2007, **21**:441–446.
31. Soriano-Sarabia N, Vallejo A, Ramírez-Lorca R, et al. Influence of the Toll-like receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression. *A Acquir Immune Defic Syndr* 2008, **49(2)**:128–35.
32. Pine SO, McElrath JM, Bouchud P-Y. Polymorphisms in TLR4 and TLR9 influence viral load in a seroincident cohort of HIV-1infected individuals. *AIDS* 2009, **23(18)**:2387–2395.
33. Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Mosconi I, Montagna M, Giaquinto C, et al. Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Transl Med* 2010, **8 (49)**:1-5.
34. Dabis F, Balestre E, Braitstein P, et al. Cohort profile: antiretroviral therapy in lower income countries (ART-LINC): international collaboration of treatment cohorts. *Int J Epidemiol* 2005, **34**: 979–986.
35. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**: 177–182.
36. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010, **31**: 184–190.
37. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz M et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. *PLoSOne* 2011, **2(2)**: e17063
38. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JA. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 2006, **39**: 321–325.



39. da Silva GK, Guimaraes R, Mattevi VS, et al. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *AIDS* 2011, **25**: 411–418.
40. Lahiri D and Nurnberger J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991, **19 (19)**: 5444.
41. Carvalho A, Marques A, Maciel P and Rodrigues F. 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(4)**: 316-320.
42. Schott E, Witt H, Neumann K, Bergk A, Halangk J, Weich V, et al. Association of *TLR7* single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon-a-based therapy. *J Viral Hepat* 2008, **15(1)**:71-8.
43. Barreiro LB, Ben-Ali M, Quach H, Laval Guillaume, Patin E et al. Evolutionary Dynamics of Human Toll-Like Receptors and their Different Contribution to Host Defense. *PLoS Genetics* 2009, **5(7)**:e1000562.
44. Gonzalez VD, Landay AL and Sandberg JK. Innate immunity and chronic immune activation in HCV/HIV-1 co-infection. *Clin Immunol* 2010, **135 (1)**:12-25.

**Table 1. Demographic characteristics of the sample studied**

<b>Characteristics</b>	<b>HIV- infected individuals</b>	<b>Control group</b>
Gender (males/females)	213 (58%)/153 (42%)	224 (54%)/191 (46%)
Age (years $\pm$ S.D and min-max)	42.98 $\pm$ 9.42 (19-73)	43.43 $\pm$ 7.78 (20-62)
Ethnicity (European/African-derived)	212 (57.9)/154 (42.1%)	309 (74.4%)/106 (25.6%)
HCV co-infection	112 (33.3%)	NA
HBV co-infection	17 (4.6%)	NA
NA - Not apply		

**Table 2. Genotypic and allelic frequencies in HIV-1 Euro-derived patients and controls.**

Protein, polymorphism, genotype or allele	HIV-1 patients	Controls	OR	P-value
	N (freq.)	N (freq.)	(95% CI)	
<b>TLR9</b>				
<b>T-1237C</b>				
TT	136 (0.64)	227 (0.73)		
TC	65 (0.31)	77 (0.25)		<b>0.028<sup>a</sup></b>
CC	11 (0.05)	6 (0.02)		
T	337 (0.79)	531 (0.86)	1.54 (1.10-2.16)	<b>0.011<sup>b</sup></b>
C	87 (0.21)	89 (0.14)		
<b>G2848A</b>				
GG	51 (0.26)	74 (0.24)		
GA	87 (0.44)	151 (0.49)	...	0.561
AA	59 (0.30)	83 (0.27)		
G	189 (0.48)	299 (0.49)		0.897
A	205 (0.52)	317 (0.51)	...	
<b>TLR8</b>				
<b>A1G</b>				
AA ♀	47 (0.49)	69 (0.47)		
AG ♀	35 (0.37)	56 (0.38)	...	0.945
GG ♀	13 (0.14)	21 (0.14)		
A ♀	129 (0.68)	194 (0.66)		0.767
G ♀	61 (0.32)	98 (0.34)	...	
A ♂	52 (0.55)	98 (0.65)	...	0.137
G ♂	42 (0.45)	52 (0.35)	...	
<b>TLR7</b>				
<b>A32T</b>				
AA ♀	70 (0.69)	102 (0.71)		
AT ♀	25 (0.25)	37 (0.26)	...	0.655
TT ♀	6 (0.06)	5 (0.03)		
A ♀	165 (0.82)	241 (0.84)		0.626
T ♀	37 (0.18)	47 (0.16)	...	
A ♂	91 (0.86)	137 (0.86)	...	1.000
T ♂	15 (0.14)	23 (0.14)	...	

<sup>a</sup>: Pearson  $\chi^2$  ; <sup>b</sup>: Fisher's test

**residual: CC: P = 0.040 (T-1237C)**

Absolute frequency and (relative frequency) are shown for genotypes and alleles.

The P value for allelic and genotypic frequencies comparisons; CI, confidence interval; OR, odds ratio; P values < 0.05 are indicated in bold.

**Table 3. Genetic models in HIV-1 Euro-derived patients and controls.**

TLR9 SNP	Model	Genotype	HIV-1 patients		Controls		OR (CI 95%)	P-value
			N	Freq	N	Freq		
T-1237C	Dominant	TT	136	0.64	227	0.73	1	<b>0.030</b>
		TC+CC	76	0.36	83	0.27	1.53 (1.05-2.23)	
	Recessive	TC+TT	201	0.95	304	0.98	1	0.034
		CC	11	0.05	6	0.02	2.77 (1.01-8.21)	

**Table 4. Genotypic and allelic frequencies in HIV-1 Afro-derived patients and controls.**

Protein, polymorphism, genotype or allele	HIV-1 patients		Controls		OR (95% CI)	P -value
	N	(freq.)	N	(freq.)		
<b>TLR9</b>						
<b>T-1237C</b>						
TT	90	(0.58)	47	(0.46)		<b>0.019<sup>a</sup></b>
TC	50	(0.32)	51	(0.50)		
CC	14	(0.10)	5	(0.04)		
T	230	(0.75)	145	(0.70)		0.311 <sup>b</sup>
C	78	(0.25)	61	(0.30)	...	
<b>G2848A</b>						
GG	45	(0.32)	43	(0.41)		0.223
GA	72	(0.50)	49	(0.47)	...	
AA	26	(0.18)	13	(0.12)		
G	162	(0.57)	135	(0.64)		0.095
A	124	(0.43)	75	(0.36)	...	
<b>TLR8</b>						
<b>A1G</b>						
AA ♀	24	(0.41)	21	(0.48)		0.796
AG ♀	26	(0.45)	17	(0.39)	...	
GG ♀	8	(0.14)	6	(0.13)		
A ♀	74	(0.64)	59	(0.67)		0.659
G ♀	42	(0.36)	29	(0.33)	...	
A ♂	57	(0.68)	44	(0.72)		0.715
G ♂	27	(0.32)	17	(0.28)	...	
<b>TLR7</b>						
<b>A32T</b>						
AA ♀	46	(0.71)	29	(0.67)		0.380
AT ♀	17	(0.26)	10	(0.23)	...	
TT ♀	2	(0.03)	4	(0.10)		
A ♀	109	(0.84)	68	(0.79)		0.374
T ♀	21	(0.16)	18	(0.21)	...	
A ♂	78	(0.80)	53	(0.85)		0.523
T ♂	19	(0.20)	9	(0.15)	...	

<sup>a</sup>: Pearson  $\chi^2$  ; <sup>b</sup>: Fisher's test

**residual: TC: P = 0.006 (T-1237C)**

Absolute frequency and (relative frequency) are shown for genotypes and alleles.

The P value for allelic and genotypic frequencies comparisons; CI, confidence interval; OR, odds ratio; P values < 0.05 are indicated in bold.

**Table 5. Genetic models in HIV-1 Afro-derived patients and controls.**

TLR9 SNP	Model	Genotype	HIV-1 patients		Controls		OR (CI 95%)	P -value
			N	Freq	N	Freq		
T-1237C	Dominant	TT	90	0.58	47	0.46	1	<b>0.049</b>
		TC+CC	64	0.42	56	0.54	0.60 (0.36-0.99)	
	Recessive	TC+TT	140	0.90	98	0.96	1	0.188
		CC	14	0.10	60	5	0.04	

**Table 6. Haplotypic frequencies estimated of *TLR9* polymorphisms and number chromosomes(n) in European- and African-Derived patients and controls.**

	<i>Haplotype</i>		<i>European-derived</i>		<i>African-derived</i>	
	<b>G2848A</b>	<b>T-1237C</b>	<i>freq</i>	<i>n</i>	<i>freq</i>	<i>n</i>
Patients ( n =386/278 )	G	T	0.43225 <sup>a</sup>	167	0.459519 <sup>c</sup>	128
	G	C	0.047024 <sup>a</sup>	18	0.108826 <sup>c</sup>	30
	A	T	0.370859 <sup>a</sup>	143	0.285085 <sup>c</sup>	79
	A	C	0.149867 <sup>a</sup>	58	0.146569 <sup>c</sup>	41
Controls ( n = 614/196 )	G	T	0.462699 <sup>b</sup>	284	0.463805 <sup>d</sup>	91
	G	C	0.021014 <sup>b</sup>	13	0.179052 <sup>d</sup>	35
	A	T	0.39235 <sup>b</sup>	241	0.235175 <sup>d</sup>	46
	A	C	0.123937 <sup>b</sup>	76	0.121968 <sup>d</sup>	24

a x b ( $\chi^2$ ): p = 0.073

c x d ( $\chi^2$ ): p = 0.123

a x c ( $\chi^2$ ): p = **0.0065**

**residual: GC: p = 0.0026, AT: p = 0.020**

b x d ( $\chi^2$ ): p = **1.2E-15**

**residual: GC: p = 4.4E-16, AT: p = 0.000058**

**Table 7. Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms in HIV + individuals with or without HCV co-infection, according to ethnicity.**

Protein, polymorphism, genotypes or alleles	European-derived		African-derived	
	HIV + HCV -	HIV + HCV +	HIV + HCV -	HIV + HCV +
	Freq (n)	Freq (n)	Freq (n)	Freq (n)
<b>TLR9</b>				
<b>T-1237C</b>				
TT	68(0.64)	42(0.61)	47(0.55)	29(0.67)
TC	34(0.32)	22(0.32)	31(0.36)	10(0.23)
CC	4(0.04)	5(0.07)	8(0.09)	4(0.1)
T	170(0.80)	106(0.77)	125(0.73)	68(0.79)
C	42(0.20)	32(0.23)	47(0.27)	18(0.21)
<b>G2848A</b>				
GG	28 (0.28)	14(0.22)	21(0.27)	15(0.34)
GA	44(0.43)	27(0.44)	40(0.51)	21(0.48)
AA	29(0.29)	21(0.34)	17(0.22)	8(0.18)
G	100(0.50)	55(0.44)	82(0.53)	51(0.58)
A	102(0.50)	69(0.56)	74(0.47)	37(0.42)
<b>TLR8</b>				
<b>A1G</b>				
AA ♀	25(0.46)	9(0.41)	19(0.48)	4(0.29)
AG ♀	22(0.41)	9(0.41)	14(0.35)	9(0.64)
GG ♀	7(0.13)	4(0.18)	7(0.17)	1(0.07)
A ♀	72(0.67)	27(0.61)	52(0.65)	17(0.61)
G ♀	36(0.33)	17(0.39)	28(0.35)	11(0.39)
A ♂	20(0.51)	21(0.57)	26(0.79)	18(0.58)
G ♂	19(0.49)	16(0.43)	7(0.21)	13(0.42)
<b>TLR7</b>				
<b>A32T</b>				
AA ♀	39(0.66)	17(0.74)	31(0.69)	11(0.73)
AT ♀	16(0.27)	4(0.17)	13(0.29)	3(0.2)
TT ♀	4(0.07)	2(0.09)	1(0.02)	1(0.07)
A ♀	94(0.80)	38(0.83)	75(0.83)	25(0.83)
T ♀	24(0.20)	8(0.17)	15(0.17)	5(0.17)
A ♂	38(0.86)	38(0.84)	<b>31(0.72)<sup>a</sup></b>	<b>30(0.91)<sup>b</sup></b>
T ♂	6(0.14)	7(0.16)	<b>12(0.28)<sup>a</sup></b>	<b>3(0.09)<sup>b</sup></b>

a x b (Fisher):  $P = 0.047$ ; OR: 26; CI 95%: 0.04-1.11

Absolute frequency and (relative frequency) are shown for genotypes and alleles

The  $\chi^2$  and Fisher's test was used to determine differences between genotypic and allelic frequencies, respectively. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

## IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

---

Muitos estudos vêm sendo gerados para um melhor entendimento da patogênese do HIV-1 e de seu reconhecimento pelo sistema imune, o qual é muito complexo, pois essa relação depende tanto da variabilidade genética do hospedeiro como da ampla diversidade do vírus, conseqüentemente desencadeando diferentes respostas entre os indivíduos.

O sistema imune conta com as primeiras barreiras de defesa frente ao vírus, dentre elas os TLRs endossômicos. Como já descrito, os TLRs endossômicos tem a capacidade de reconhecer ácidos nucleicos, tais como ss/dsDNA ou ssRNA de bactérias ou vírus. Vários estudos demonstraram que polimorfismos nos genes que codificam estes TLRs influenciam no curso da infecção de HIV-1. Assim, analisamos polimorfismos já descritos na literatura nos genes *TLR7/8/9* em pacientes HIV-1 positivos e em indivíduos saudáveis, ambas as amostras provenientes do sul do Brasil. Nossos achados indicam resultados interessantes para o *TLR9*, especificamente em relação ao polimorfismo no promotor rs5743836 *TLR9* o qual foi associado com susceptibilidade e proteção à infecção nos indivíduos eurodescendentes e afrodescendentes, respectivamente.

Um papel importante do TLR9 está relacionado à maturação das células dendríticas e à ativação de células B, as quais produzem citocinas pro-inflamatórias via ativação por NF-kappaB. A ativação das células B de memória pelo TLR9, após reconhecimento de seu ligante, é fundamental para a homeostase das células B e uma produção adequada de anticorpos (Jiang *et al.*, 2008; Krieg M. 2002). As diferenças genéticas no hospedeiro, para *TLR9*, geram potencialmente diferentes respostas no reconhecimento de seus ligantes (motivos CpG). O polimorfismo rs5743836 está sendo cada vez mais estudado, pois observou-se ter um papel fundamental na susceptibilidade a doenças inflamatórias e infecciosas tais como a asma (Lazarus *et al.*, 2003), arteriosclerose (Hamann *et al.*, 2006), lúpus eritematoso (dos Santos *et al.*, 2011), doença de Crohn (Torok *et al.*, 2004; Torok *et al.*, 2009) e hepatite B (Wu *et al.*, 2012). Porém, em relação ao HIV-1, Bouchud *et al.* (2007) não encontraram associação da variante alélica C com a progressão da infecção. Pine *et al.*, (2009), apesar de inicialmente haverem observado uma associação

deste alelo com a progressão rápida da infecção, esta associação foi perdida após correções estatísticas.

Um estudo *in silico* avaliando o polimorfismo rs5743836 demonstrou que o alelo C insere um potencial sítio de ligação do fator de transcrição NF-kappaB, o qual está relacionado com o aumento da expressão do promotor em resposta a seus ativadores (Hamann *et al.*, 2006). Outro estudo funcional avaliando essa variante foi realizado em uma amostra de pacientes com doença gástrica induzida por *Helicobacter pylori* e observou-se uma elevada atividade transcripcional do *TLR9* nos pacientes com o alelo C quando comparados com um grupo controle de indivíduos saudáveis. A possível explicação é que uma elevada expressão do TLR9 aumente a sensibilidade do hospedeiro em reconhecer CpG-DNA do *H. pylori* o que, pelo menos em parte aumentaria o efeito inflamatório Th-1 observado durante a infecção (Ng *et al.*, 2010). Mais recentemente, outro estudo funcional identificou um novo elemento regulatório na região promotora do *TLR9*, o qual aumentaria sua ativação transcripcional dependente da sinalização de IL-6. Os pesquisadores propuseram um modelo de *feedback* do efeito do alelo C, pois eles observaram que as células mononucleares de sangue periférico com o genótipo TC expressavam altos níveis de TLR9 levando a uma proliferação aumentada de células B e IL-6 em resposta a motivos CpG oligodeoxinucleotídeos sintético (Carvalho *et al.*, 2011). Em relação ao HIV, ainda não foi realizado um estudo funcional avaliando essa variante frente ao vírus, mas já foi descrito o comportamento da proteína durante a infecção em células B. Jiang *et al.* (2008) observaram que as células B tiveram uma expressão do TLR9 diminuída levando a uma baixa ativação dessas células. Esse efeito poderia ter sido consequência de um mal funcionamento observado nas células B em indivíduos infectados por HIV-1, tal como alta susceptibilidade à apoptose ou alta produção de anticorpos (Moir *et al.*, 2001; De Milito *et al.*, 2004) (Figura 10). Essa expressão diminuída do TLR9 poderia contribuir para o declínio no número de células B de memória e uma consequente curta duração da resposta de anticorpos após imunização, tais desfechos foram observados no curso da infecção pelo HIV (Titanji *et al.*, 2006).

Com base nesses achados descritos acima, podemos supor que a variante alélica C de rs5743836 no promotor do *TLR9* desencadearia uma elevada expressão do TLR9,



incrementando a ativação não só das células B, mas também das células dendríticas plasmocitóides (principalmente ativadas pelo TLR7 e 9) conseqüentemente aumentando a proliferação de citocinas pró-inflamatórias, IFN-1 e IL-6 (Figura 11). Isso influenciaria no curso da infecção e podendo levar a uma infecção crônica.

Em nossos resultados, quando comparamos indivíduos euro-descendentes infectados pelo HIV-1 com o grupo controle, observamos diferenças nas frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo rs5743836 no *TLR9* ( $P=0,011$  e  $P=0,028$ , respectivamente), sendo que a variante alélica C confere susceptibilidade à infecção (OR= 1,54; 95% CI: 1,10-2,16). A frequência do genótipo CC foi maior nos pacientes quando comparado aos controles (residual  $P=0,040$ ) conferindo susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 (OR=1,53; 95% CI: 1,05-2,23;  $P=0,030$ , modelo dominante). Em contraste, quando comparamos indivíduos afrodescendentes infectados pelo HIV-1 com o grupo controle, se observou uma menor frequência do genótipo TC nos pacientes (residual  $P=0,006$ ) sendo que esse genótipo foi associado com proteção à infecção (OR=0,60; 95% CI: 0,36-0,99;  $P=0,049$ , modelo dominante). Mais recentemente Medeiros *et al.* (2012) observaram uma associação do alelo C do polimorfismo rs5743836 no *TLR9* com uma progressão lenta no curso da infecção pelo HIV entre os indivíduos afrodescendentes (comunicação pessoal).

Já na análise de haplótipos para os polimorfismos rs5743836 e rs352140 do *TLR9*, as quatro combinações foram encontradas, mas as frequências haplotípicas não diferiram entre pacientes e controles. Porém, quando comparamos os grupos étnicos entre eles observamos marcada diferença nas frequências dos haplótipos GC e AT, o que sugere que haja uma marcada diferença genética entre os grupos étnicos, independente da doença. Por exemplo, na comparação entre os controles, as frequências dos haplótipos foram significativamente diferentes ( $P=1,2 \times 10^{-15}$ ) e na análise dos resíduos dois haplótipos tiveram uma distribuição bem diferente entre os grupos étnicos (residual: GC:  $P = 4,4 \times 10^{-16}$ , AT:  $P = 0,000058$ ), sendo que o haplótipo GC foi super-representado nos indivíduos afrodescendentes (tabela 6 do artigo). Essa mesma diferença em termos de frequências haplotípicas do *TLR9*, considerando-se a etnia, também foi observada por nosso grupo em uma amostra de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e controles provenientes da

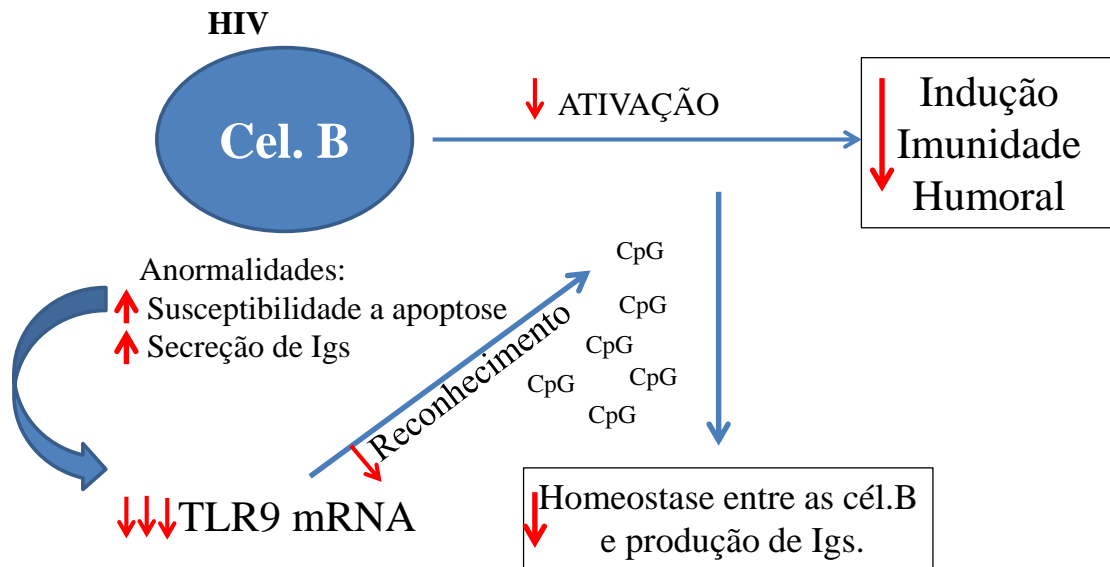
região sul do Brasil (dos Santos *et al.*, 2012). Também da Silva *et al.* (2010) observaram essa heterogeneidade genética entre os grupos étnicos quando se analisaram polimorfismos do *MBL* na mesma amostra de indivíduos infectados pelo HIV que nós também avaliamos.

Um estudo da evolução e seleção natural dos TLRs em diferentes grupos étnicos, observou que o *TLR9* apresenta maior diversidade genética na população africana quando comparado com a diversidade existente em populações europeias e asiáticas. Com base neste estudo, os pesquisadores propuseram que isso tenha ocorrido em resposta a uma pressão seletiva maior na população africana (Barreiro *et al.*, 2009). Uma explicação pode ser a grande prevalência de infecções por patógenos intracelulares na África, sugerida como resultando em uma pressão positiva, que no *TLR9*, o genótipo TC do polimorfismo rs5743836, neste contexto, teria sido selecionado positivamente, atuando como fator protetor contra essas infecções. Porém, temos que salientar que nossos resultados só representam uma amostra da população desta parte do Sul do Brasil e que mais estudos de replicações em outras populações poderiam confirmar a hipótese.

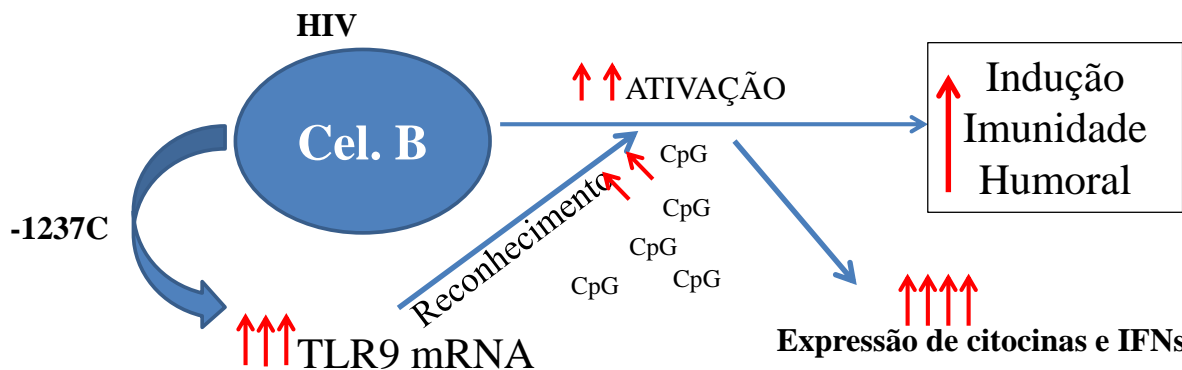
Na análise comparativa entre pacientes infectados pelo HIV co-infectados e não co-infectados com o vírus da hepatite C (HCV) não foram encontradas diferenças nas frequências alélicas e genotípicas para qualquer dos polimorfismos estudados. Assim, apesar desses TLRs já terem sido associados com susceptibilidade à infecção pelo HCV (Gonzales *et al.*, 2010; Schott *et al.*, 2008) esses resultados podem estar refletindo o baixo número amostral quando subdividimos os pacientes de acordo com a presença/ausência de co-infecção e com a etnia (n=69 HCV+ e n= 106 HCV- nos eurodescendentes; n= 44 HCV+ e n= 86 HCV-, nos afrodescendentes), além de ter controlado por sexo no caso dos polimorfismos nos *TLR7* e *TLR8*. Porém, também esses resultados podem refletir a existência de outros fatores genéticos envolvidos na co-infecção pelo HIV-1/HCV.

Concluimos que o polimorfismo rs5743836 no *TLR9* tem importante papel na infecção pelo HIV-1, pois foi associado com a susceptibilidade e proteção nos indivíduos eurodescendentes e afrodescendentes, respectivamente. Além disso, nossos resultados reforçam o papel do *background* genético na infecção pelo vírus e, visto que o Brasil é um país com altas taxas de miscigenação, novas investigações devem ser realizadas para

compreendermos a influência desta variabilidade genética no curso da infecção pelo HIV. Além disso, avaliações funcionais frente ao HIV-1 precisam ser realizadas nas células alvo com esse polimorfismo.



**Figura 10.** Diminuição da ativação das células B pelo ligando TLR9 no contexto do HIV (Adaptado de Moir *et al.*, 2001; De Milito *et al.*, 2004 e Jiang *et al.* 2008).



**Figura 11.** Modelo sugerido da ativação das células B pelo ligando TLR9 afetado pelo polimorfismo T-1237C, no contexto do HIV.

## REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

---

- Akira S and Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 4:499-511.
- An P and Winkler Ca (2010) Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics* 26:119-131.
- Askar E, Ramadori G and Mihm S (2010) *Toll-Like Receptor 7* rs179008 / Gln11Leu Gene Variants in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Journal of medical virology* 1868:1859-1868.
- Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, Miller RC, Diemand S, Honda K, Kundig TM, Aguzzi A *et al.* (2009) Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 113:377-388.
- Báfica A, Scanga CA, Schito M, Chaussabel D and Sher A (2004) Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: Evidence for a role of Toll-like receptors. *Journal of immunology* 172:7229-7234.
- Berghöfer B, Frommer T, König IR, Ziegler a, Chakraborty T, Bein G and Hackstein H (2005) Common human *Toll-like receptor 9* polymorphisms and haplotypes: Association with atopy and functional relevance. *Clinical and experimental allergy* 35:1147-1154.
- Beutler B, Eidenschenk C, Crozat K, Imler J-L, Takeuchi O, Hoffmann Ja and Akira S (2007) Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nature reviews. Immunology* 7:753-766.
- Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X and Hoebe K (2006) Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annual review of immunology* 24:353-389.
- Blankson JN (2010) Control of HIV-1 replication in elite suppressors. *Discovery medicine* 9 (46):261-266.
- Blasius AL and Beutler B (2010) Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 32:305-315.
- Boasso A and Shearer GM (2008) Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clinical immunology* 126:235-242.

- Bochud P-y, Hersberger M, Taffé P, Bochud M, Stein CM, Rodrigues SD, Calandra T, Francioli P, Telenti A, Speck RF *et al.* (2007) Polymorphisms in *Toll-like receptor 9* influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 21:441-446.
- Boletim Epidemiológico – AIDS e DST. Ano VIII n# 01. ISSN 1517 1159 (2012) Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.
- Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR and Stark GR (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery* 6:975-990.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM and Oldstone MB (1994) Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 68:6103-6110.
- Braida L, Boniotto M, Pontillo A, Tovo PA, Amoroso A and Crovella S (2004) A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. *AIDS* 18:1598-1600.
- Brenchley JM, Price Da, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D *et al.* (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine* 12:1365-1371.
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price Da, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT *et al.* (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The journal of experimental medicine* 200:749-759.
- Brichacek B, Vanpouille C, Kiselyeva Y, Biancotto A, Merbah M, Hirsch I, Lisco A, Grivel JC and Margolis L (2010) Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis. *PloS one* 5 (9):e12831.
- Carrington M, Martin MP and van Bergen J (2008) KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends in microbiology* 16:620-627.
- Carvalho A, Marques A, Maciel P and Rodrigues F (2007) Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: A novel method applied to the analysis of the Portuguese population. *Molecular and cellular probes* 21:316-320.
- Carvalho A, Osório NS, Saraiva M, Cunha C, Almeida AJ, Teixeira-Coelho M, Ludovico P, Pedrosa J, Pitzurra L, Aversa F *et al.* (2011) The C allele of rs5743836 polymorphism in the human TLR9 promoter links IL-6 and TLR9 up-regulation and confers increased B-cell proliferation. *PloS one* 6:e28256.

- Casado C, Colombo S, Rauch A, Martínez R, Günthard HF, Garcia S, Rodríguez C, Del Romero J, Telenti A and López-Galíndez C (2010) Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PloS one* 5:e11079.
- Chang J, Lindsay RJ, Kulkarni S, Lifson JD, Carrington M and Altfeld M (2011) Polymorphisms in interferon regulatory factor 7 reduce interferon- $\alpha$  responses of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *AIDS* 25:715-717.
- Chatterjee K (2010) Host genetic factors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. *Journal of Genetics* 89(1):109-116.
- Cheng P-L, Eng H-L, Chou M-H, You H-L and Lin T-M (2007) Genetic polymorphisms of viral infection-associated Toll-like receptors in Chinese population. *Translational research : The journal of Laboratory and Clinical Medicine* 150:311-318.
- Chuang TH and Ulevitch RJ (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *European cytokine network* 11:372-378.
- Crovella S, Biller L, Santos S, Salustiano A, Brandao L, Guimaraes R, Segat L, de Lima Filho JL, Arraes LC (2010) Frequency of HLA B\*5701 allele carriers in abacavir treated-HIV infected patients and controls from northeastern Brazil. *CLINICS* 66(8):1485-1487.
- da Silva RC, Segat L and Crovella S (2011) Role of DC-SIGN and L-SIGN receptors in HIV-1 vertical transmission. *Human immunology* 72:305-311.
- Davenport MP and Petravic J (2010) CD8+ T cell control of HIV--a known unknown. *PLoS pathogens* 6:e1000728.
- Davila S, Hibberd ML, Hari Dass R, Wong HEE, Sahiratmadja E, Bonnard C, Alisjahbana B, Szeszko JS, Balabanova Y, Drobniewski F *et al.* (2008) Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. *PLoS genetics* 4:e1000218.
- Dos Santos BP, Valverde JV, Rohr P, Monticielo Oa, Brenol JCT, Xavier RM and Chies JaB (2012) TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from southern Brazil. *Lupus* 21:302-309.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage Ea, Massey JM, Haynes BF, Polis Ma, Haase aT, Feinberg MB, Sullivan JL *et al.* (1998) Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396:690-695.

- Du X, Poltorak a, Wei Y and Beutler B (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *European cytokine network* 11:362-371.
- Edwards AO, Chen D, Fridley BL, James KM, Wu Y, Abecasis G, Swaroop A, Othman M, Branham K, Iyengar SK *et al.* (2008) Toll-like receptor polymorphisms and age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:1652-1659.
- Engelman A and Cherepanov P (2012) The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews. Microbiology* 10:279-290.
- Engin A, Arslan S, Kizildag S, Oztürk H, Elaldi N, Dökmetas I and Bakir M (2010) Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Microbes and infection* 12:1071-1078.
- Equils O, Faure E, Thomas L, Bulut Y, Trushin S and Arditi M (2001) Bacterial lipopolysaccharide activates HIV long terminal repeat through Toll-like receptor 4. *Journal of immunology* 166:2342-2347.
- Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B and Buttò S (2010) HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di sanità* 46:5-14.
- Fauci AS (2003) HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature medicine* 9:839-843.
- Fellay J, Ge D, Shianna KV, Colombo S, Ledergerber B, Cirulli ET, Urban TJ, Zhang K, Gumbs CE, Smith JP *et al.* (2009) Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS genetics* 5:e1000791.
- Fellay J, Shianna KV, Telenti A and Goldstein DB (2010) Host genetics and HIV-1: the final phase? *PLoS pathogens* 6:e1001033.
- Freguja R, Giancesin K, Del Bianco P, Malacrida S, Rampon O, Zanchetta M, Giaquinto C and De Rossi A (2012) Polymorphisms of innate immunity genes influence disease progression in HIV-1-infected children. *AIDS* 26:765-768.
- Funderburg N, Luciano Aa, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF and Lederman MM (2008) Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PloS one* 3:e1915.
- Gantier MP, Irving AT, Kaparakis-Liaskos M, Xu D, Evans Va, Cameron PU, Bourne Ja, Ferrero RL, John M, Behlke Ma *et al.* (2010) Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. *Human mutation* 31:1069-1079.

- Gonzalez VD, Landay AL and Sandberg JK (2010) Innate immunity and chronic immune activation in HCV/HIV-1 co-infection. *Clinical immunology* 135:12-25.
- Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic (2012). ISBN 978-92-9173-996-7 (Printed version).
- Gringhuis SI, van der Vlist M, van den Berg LM, den Dunnen J, Litjens M and Geijtenbeek TBH (2010) HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nature immunology* 11:419-426.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE and Picker LJ (2006) Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nature medicine* 12:289-295.
- Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E and Wagner H (2008) The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 28:315-323.
- Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A and Schumann RR (2006) Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 364:303-307.
- Hardy G, Worrell S, Hayes P, Barnett CM, Glass D, Pido-Lopez J, Imami N, Aspinall R, Dutton J, Gazzard B *et al.* (2004) Evidence of thymic reconstitution after highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *HIV medicine* 5:67-73.
- Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, Zinkernagel R and Aguzzi A (2004) Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nature medicine* 10:187-192.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H and Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.
- Herbeuval J-P and Shearer GM (2007) HIV-1 immunopathogenesis: How good interferon turns bad. *Clinical immunology* 123:121-128.
- Hijazi K, Wang Y, Scala C, Jeffs S, Longstaff C, Stieh D, Haggarty B, Vanham G, Schols D, Balzarini J *et al.* (2011) DC-SIGN increases the affinity of HIV-1 envelope glycoprotein interaction with CD4. *PloS one* 6:e28307.
- Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K *et al.* (1996) The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature medicine* 2:1240-1243.



- Hur J-W, Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim S-Y and Bae S-C (2005) Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens* 65:266-270.
- Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Buchbinder SP, Coutinho RA, Eugen-Olsen J, Gallart T, Katzenstein TL *et al.* (2001) Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Annals of internal medicine* 135:782-795.
- Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, Rodriguez-Plata MT, Zangger N, Erikson E, Pino M, Erkizia I, Glass B, Clotet B *et al.* (2012) Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biology* 10:e1001448.
- Janeway Ca and Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20:197-216.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein Ra, Bazan F and Liu YJ (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine* 194:863-869.
- Kahn JO and Walker BD (1998) Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine* 339:33-39.
- Kaur G and Mehra N (2009) Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. *Tissue antigens* 74:373-385.
- Kawai T and Akira S (2006) TLR signaling. *Cell death and differentiation* 13:816-825.
- Kawai T and Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology* 21:317-337.
- Kikuchi K, Lian Z-X, Kimura Y, Selmi C, Yang G-X, Gordon SC, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Ansari Aa *et al.* (2005) Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity* 24:347-352.
- Kumar H, Kawai T and Akira S (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical journal* 420:1-16.
- Kumar H, Kawai T and Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30:16-34.

- Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, Hamzaoui K and Hamzaoui A (2008) Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue antigens* 71:417-425.
- Lazarus R, Klimecki WT, Raby Ba, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F and Weiss ST (2003) Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 81:85-91.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM and Hoffmann Ja (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Lester RT, Yao X-D, Ball TB, McKinnon LR, Omange WR, Kaul R, Wachihi C, Jaoko W, Rosenthal KL and Plummer Fa (2009) HIV-1 RNA dysregulates the natural TLR response to subclinical endotoxemia in Kenyan female sex-workers. *PloS one* 4:e5644.
- Levy JA (1978) pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Pathology annual* 13 Pt 2:35-67.
- Li Y-J, Wang H-L and Li T-S (2012) Hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection: interaction among human immunodeficiency virus infection, chronic hepatitis B virus infection, and host immunity. *Chinese medical journal* 125:2371-2377.
- Martinelli E, Cicala C, Ryk DV, Goode DJ, Macleod K, Arthos J, Fauci AS and Van Ryk D (2007) HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:3396-3401.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M and Roederer M (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434:1093-1097.
- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N and Haynes BF (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature reviews. Immunology* 10:11-23.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P and Janeway CA (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.

- Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, de Lima Filho JL and Crovella S (2006) DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. *AIDS* 20:1673-1675.
- Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS and Paludan SR (2010) Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 7:54.
- Møller-Larsen S, Nyegaard M, Haagerup a, Vestbo J, Kruse Ta and Børghlum aD (2008) Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax* 63:1064-1069.
- Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M and Arinami T (2004) An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 34:177-183.
- O'Connell Ka, Bailey JR and Blankson JN (2009) Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends in pharmacological sciences* 30:631-637.
- Oh D-Y, Baumann K, Hamouda O, Eckert JK, Neumann K, Kücherer C, Bartmeyer B, Poggensee G, Oh N, Pruss A *et al.* (2009) A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *AIDS* 23:297-307.
- Oh D-Y, Taube S, Hamouda O, Kücherer C, Poggensee G, Jessen H, Eckert JK, Neumann K, Storek a, Pouliot M *et al.* (2008) A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *The Journal of infectious diseases* 198:701-709.
- Peixoto-Rangel AL, Miller EN, Castellucci L, Jamieson SE, Peixe RG, Elias LDS, Correa-Oliveira R, Bahia-Oliveira LM and Blackwell JM (2009) Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:1187-1190.
- Pelak K, Goldstein DB, Walley NM, Fellay J, Ge D, Shianna KV, Gumbs C, Gao X, Maia JM, Cronin KD *et al.* (2010) Host determinants of HIV-1 control in African Americans. *The Journal of infectious diseases* 201:1141-1149.
- Pine SO, McElrath MJ and Bochud P-y (2009) Polymorphisms in toll-like receptor 4 and toll-like receptor 9 influence viral load in a seroincident cohort of HIV-1-infected individuals. *AIDS* 23:2387-2395.

- Poggi H, Vera A, Lagos M, Solari S, Rodríguez L, Pérez CM (2010) HLA-B\*5701 frequency in Chilean HIV-infected patients and in general population. *Brazilian journal infection diseases* 14(5):510-512
- Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte A (2012) Polymorphisms in Inflammation Genes and Susceptibility to HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 59(2): 121-125.
- Rambaut A, Posada D, Crandall KA and Holmes EC (2004) The causes and consequences of HIV evolution. *Nature reviews. Genetics* 5:52-61.
- Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Montagna M, Giaquinto C and De Rossi A (2009) Role of beta-defensin-1 polymorphisms in mother-to-child transmission of HIV-1. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 51:13-19.
- Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Mosconi I, Montagna M, Giaquinto C and De Rossi A (2010) Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of translational medicine* 8:49.
- Schlaepfer E and Speck RF (2008) Anti-HIV activity mediated by natural killer and CD8+ cells after toll-like receptor 7/8 triggering. *PloS one* 3:e1999.
- Schott E, Witt H, Neumann K, Bergk a, Halangk J, Weich V, Müller T, Puhl G, Wiedenmann B and Berg T (2008) Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- $\alpha$ -based therapy. *Journal of viral hepatitis* 15:71-78.
- Sharma G, Kaur G and Mehra N (2011) Genetic correlates influencing immunopathogenesis of HIV infection. *The Indian journal of medical research* 134:749-768.
- Sharp PM and Hahn BH (2011) Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1: a006841.
- Smit LaM, Siroux V, Bouzigon E, Oryszczyn M-P, Lathrop M, Demenais F and Kauffmann F (2009) CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179:363-368.
- Soriano-sarabia N, Vallejo A, Ramı R, Rodrı M, Salinas A, Pulido I and Sa E (2008) Influence of the Toll-Like Receptor 9 1635A/G Polymorphism on the CD4 Count , HIV Viral Load , and Clinical Progression. *AIDS* 49:128-135.

- Takeda K and Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 17:1-14.
- Takeuchi O and Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
- Török H-P, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M and Folwaczny C (2004) Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 127:365-366.
- Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkühn T, Folwaczny M *et al.* (2009) Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 104:1723-1733.
- Turvey SE and Broide DH (2010) Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:S24-32.
- Van Manen D, Wout A, Schuitemaker H (2012) Genome-wide association studies on HIV susceptibility, pathogenesis and pharmacogenomics. *Retrovirology* 9:70.
- Verlag MF (2013) HIV Book 2012/2013 (Online Edition).
- Vicenzi E, Biswas P, Mengozzi M and Poli G (1997) Role of pro-inflammatory cytokines and beta-chemokines in controlling HIV replication. *Journal of leukocyte biology* 62:34-40.
- Wu L and KewalRamani VN (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews. Immunology* 6:859-868.