

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

A Influência de Polimorfismos de Fatores de Restrição na
Suscetibilidade ao HIV e na Progressão à Aids

Tiago Antonio Polo

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

Orientadora: Dr^a Sabrina Esteves de Matos Almeida

Porto Alegre
Maio de 2017

Este trabalho foi realizado nas instalações do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

“Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao PPGBM que possibilitou o meu crescimento científico.

À minha família que sempre está e estará comigo não importando o tamanho das dificuldades e alegrias por qual passamos.

A equipe do trabalho do HCPA que me apoiou e, com trocas de turnos ou dias, me possibilitou realizar as atividades que um mestrado exige. Um grande abraço ao Dr Tor, Dra Marlene, Cris, Marcelo e Giovana.

Aos meus amigos, que apesar de eu recusar muitos convites, devido a correria de juntar trabalho e mestrado, ainda permanecem ao meu lado.

Aos colegas da FEPPS que ajudaram de diversas formas a trilhar esse caminho, principalmente a Karine e a Jacqueline e a Marish e a Rubia, grandes responsáveis pelas coletas no GHC. Ao serviço de Infectologia deste hospital por se tornar um grande colaborador do grupo.

À UFCSPA pela parceria, fundamental, para a conclusão dos testes. Um grande abraço à Grasi e à professora Marilu.

À minha orientadora que soube me guiar com sabedoria nesta jornada.

À minha namorada que permaneceu firme ao meu lado durante esse momento.

A todas as pessoas que convivi, durante essa fase da vida, que de alguma forma me incentivaram e me motivaram com palavras, gestos ou pensamentos.

SUMÁRIO

Abreviaturas	6
Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução	9
1.1 HIV/Aids	9
1.1.1 Epidemiologia.....	9
1.2 O HIV	11
1.2.1 Suscetibilidade ao HIV	16
1.2.2 Aids – Progressão da Infecção ao HIV.....	17
1.2.3 Fatores genéticos do hospedeiro	19
1.3 Fatores de Restrição.....	19
1.3.1 TRIM5 α	20
1.3.2 APOBEC3F	23
1.3.3 CUL5	26
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. Metodologia	29
3.1 Amostras	29
3.1.1 Amostras para avaliação de suscetibilidade	29
3.1.2 Amostras para avaliação da progressão.....	30
3.1.3 Etnia.....	30
3.2 Considerações éticas.....	31
3.3 Extração de DNA.....	31
3.4 Genotipagem.....	31
3.5 Análise estatística	32
4. Resultados	33
4.1 Dados demográficos	33
4.2 Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs	33
4.3 Associação dos SNPs a suscetibilidade ao HIV	35
4.4 Associação dos SNPs a progressão a aids	36
5. Discussão	37
5.1 Perspectivas	42
Referências Bibliográficas	43
Anexo A - Questionário para coletas de dados	50
Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC	51
Anexo C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS	52
Anexo D - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS	57
Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	60

ABREVIATURAS

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

APOBEC3 – *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3*

(Polipeptídio catalítico de enzima de edição de mRNA Apolipoproteína B 3)

CBF- β - *Core binding factor beta* (fator de ligação do core – β)

CRF – *Circulating Recombinant Forms* (Formas Recombinantes Circulantes)

CXCR4 – *C-X-C chemokine receptor type 4* (Receptor de quimiocinas tipo CXC 4)

CUL5 – *Cullin 5* (Cullin 5)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

cDNA – *Complementary Desoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico complementar)

HBV – *Hepatitis B Virus* (Vírus da hepatite B)

HCV – *Hepatitis C Virus* (Vírus da hepatite C)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

LTR – *Long Terminal Repeats* (Repetições terminais longas)

MHC – *Major Complex of Histocompatibility* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

NF- κ B – *Nuclear Factor-Kappa Beta* (Fator Nuclear Kappa Beta)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PR – Progressores rápidos

PNR – Progressores não rápidos

RING – *Really Interasting New Gene* (Novo gene realmente interessante)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

SAMHDI – *Sterile alpha motif and HD-domain containing protein 1* (Forma estéril alfa e domínio HD contendo proteína 1)

SIV – *Simian immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência Símia)

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de único nucleotídeo)

TR – Transcriptase Reversa

TRIM5 – *Tripartite motif 5* (Motivo tripartido 5)

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

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

Fatores de restrição são as primeiras proteínas celulares envolvidas no combate a infecções virais, são considerados uma defesa intrínseca das células, constituindo-se em uma rápida resposta frente a invasão de patógenos. Essas moléculas são bastante diversas e são capazes de interferir em algum ponto do ciclo viral, atenuando ou bloqueando a evolução da infecção. Após a descoberta da existência desses fatores, alguns estudos têm direcionado o foco para as possíveis alterações genéticas que podem influenciar a estrutura dessas proteínas e, deste modo, interferir sobre suscetibilidade e progressão de doenças infecciosas, como a infecção pelo HIV/aids. O objetivo do presente estudo foi avaliar três SNPs de três diferentes fatores de restrição (o TRIM5 α – rs10838525, a APOBEC3F – rs2076101 e o CUL5 – rs7117111) e observar suas frequências em diferentes grupos étnicos, bem como a associação desses fatores com a suscetibilidade ao HIV e a progressão a aids, em um grupo de soronegativos e soropositivos. Foram selecionados 345 indivíduos HIV+ atendidos no setor de Infectologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição e 324 indivíduos HIV– doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os SNPs foram identificados através da técnica de PCR TaqMan™. O teste qui-quadrado foi utilizado para a análise das frequências e por regressão logística univariada foi avaliado o OR com 95% de IC entre os modelos dominantes e recessivos. Entre os SNPs estudados apenas o rs7117111 apresentou resultado estatisticamente significativo para o genótipo GG em relação a proteção ao HIV-1 (OR 0,661, IC 95% 0,449-0,974, $P=0,036$) e esse mesmo genótipo, também, parece estar relacionado aos progressores rápidos, pois apresentou uma tendência nessa relação quando ajustado pela etnia (OR ajustado 2,115, IC 95% 0,990-4,520, $P=0,053$). Tais achados demonstram que alterações genéticas, especificamente no gene CUL5, podem influenciar a suscetibilidade ao HIV-1 e podem, também, interferir na progressão a aids. Esses resultados geram questionamentos de grande valia para um maior entendimento da influência genética do sistema de defesa intrínseco celular no curso da infecção.

Palavras-chave: Fatores de restrição, polimorfismos genéticos, suscetibilidade ao HIV, progressão a aids.

ABSTRACT

Host restriction factors are the first cellular proteins engaged in antiviral response, they are considered an intrinsic cell defense with the aim to be a rapid answer against the invasion of pathogens. These molecules have a varied diversity in structure and each one acts in distinct stages of viral life cycle, however always with the same objective to attenuate or block the infection. After the discovery of these restriction factors, some researches focus on looking for genetic variation that can influence the structure of the protein and with this way interfere in HIV susceptibility or progress to AIDS. The aim of present work was evaluate three SNPs of three different restriction factors (*TRIM5 α* – rs10838525, *APOBEC3F* – rs2076101 and *CUL5* – rs7117111) and detect their frequencies in different ethnic groups, as well as, evaluate the SNPs's capacity to influence the susceptibility to HIV and progress to AIDS in a seronegative and seropositive groups. For this research was selected 345 samples of HIV+ individuals from the Infectology sector of Nossa Senhora da Conceição hospital and 324 HIV- samples from blood donors of Clinics Hospital of Porto Alegre. Through PCR TaqManTM assay the SNPs were genotyped. The chi-square test was used to analyze the frequencies and by univariate logistic regression was estimated the OR with 95% CI to dominant and recessive models. Between the three SNPs chosen only rs7117111 was statistically significant for the GG genotype with the HIV-1 protection (GG, OR: 0,661, 95% CI 0,449-0,974, $P=0.036$) and this same genotype seems to be related with rapid progress to AIDS, because the result shows a tendency when adjusted for ethnicity in the recessive model (adjusted OR 2,115, IC 95% 0,990-4,520, $P=0,053$). This finding shows that genetic alterations, specifically in the *CUL5* gene, can alter the susceptibility to HIV-1 and can interfere in the progress to AIDS. These results are also important for the understanding of the genetic alterations in the host antiviral intrinsic mechanisms anti-HIV and can bring new insights for strategies against HIV pandemic.

Keywords: Restriction factors, genetic polymorphisms, susceptibility to HIV, AIDS progression.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HIV/AIDS

1.1.1. Epidemiologia

O controle da propagação e a erradicação do vírus da imunodeficiência humana ainda são um desafio para a ciência. Grandes avanços já foram alcançados, através do desenvolvimento de antirretrovirais e com a realização de campanhas direcionadas a hábitos sociais, que levaram a uma diminuição na mortalidade e incidência do HIV (UNAIDS/WHO, 2016). Contudo, ainda há a necessidade de mais pesquisas científicas visando novas terapias e abordagens com o objetivo de conter a epidemia.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde a epidemia atingiu, aproximadamente 36,7 milhões de indivíduos infectados com o HIV, até o final do ano de 2015. Neste mesmo período, a incidência de novos casos de infecção alcançou aproximadamente 2,1 milhões de pessoas ao redor do mundo e, embora o número de mortes relacionado ao HIV em 2015 tenha diminuído em relação a 2005 (aproximadamente 2 milhões de mortes) ele atingiu 1,1 milhões de pessoas.

No Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, já foram registrados 842.710 casos de aids de 1980 a junho de 2016 e, até novembro de 2015, foram notificados aproximadamente 303 mil óbitos relacionados ao HIV (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2016). O número de novos casos de infecção viral vem aumentando anualmente, no Brasil, chegando em 2015 a uma incidência de 32.321 novos casos. Já em relação a detecção de aids no Brasil, parece haver uma certa estabilização nos últimos dez anos, com uma média de 20,7 casos/100 mil habitantes. As maiores concentrações de casos de aids se encontram na região sudeste e sul com 53% e 20,1% do total, respectivamente. Já as regiões Nordeste, Centro-oeste e Norte apresentaram 15,1%, 6% e 5,9%, respectivamente. Em relação a etnia autodeclarada pelos indivíduos notificados entre 2007 e 2015, 44% são brancos e 54,8% não brancos (pretos e pardos) (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2016).

Um item que necessita de apreciação pelas autoridades e digno de estudos mais aprofundados com o objetivo de controlar a epidemia é em relação a gestantes infectadas. Segundo dados atualizados a taxa de detecção em gestantes vem apresentando uma

tendência de aumento nos últimos nove anos, de 2006 a 2015 ocorreu um incremento de 28,6% dos casos (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2016). Esses dados indicam uma importância do comportamento heterossexual e, em consequência da infecção da gestante, a taxa de transmissão vertical aumenta (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2016).

Uma parcela da população, todavia, apresenta maior vulnerabilidade à infecção ao HIV. Essa vulnerabilidade está relacionada a fatores individuais e/ou coletivos que expõem mais ou menos a situações de risco (Ayres et al., 2003). Nesses grupos se encontram indivíduos usuários de drogas, homens que fazem sexo com homens (HSH) e mulheres profissionais do sexo. Em 2015, 45,4% dos casos de aids em homens pertenciam ao grupo de HSH (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2016).

Dentre as regiões brasileiras, a região Sul, constituída pelos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul é a que apresenta as maiores taxas de detecção de HIV em: gestantes, aids em adultos, de aids em menores de 5 anos e de mortalidade provocado pela aids (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2016). No ano de 2015 foram notificados 7.265 casos de infecção por HIV nesta região e destes 3.628 (49,9%) foram apenas no Rio Grande do Sul, o Paraná notificou 2.242 (30,9%) e Santa Catarina 1.395 (19,2%) casos (Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2016). Entre os estados brasileiros o Rio Grande do Sul, também, apresenta a maior taxa em detecção de aids por 100 mil habitantes com 34,7 casos, seguido de 31,9 casos em Santa Catarina (figura 1). Esses dados geram um alerta para essa região brasileira e mais especificamente para o estado do Rio Grande do Sul.

A capital gaúcha, Porto Alegre, apresentou 74 casos/100 mil habitantes em 2015, valor correspondente ao dobro do Rio Grande do Sul e quase quatro vezes maior à taxa nacional como demonstra o gráfico da figura 1. Com esses elevadíssimos números é a cidade com a maior concentração de indivíduos com aids nas Américas.

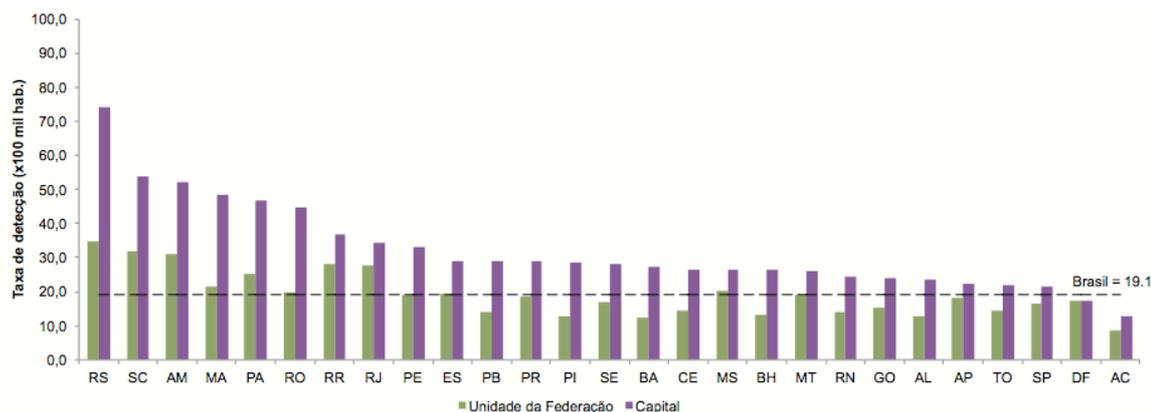


Figura 1. Taxa de detecção de aids (/100 mil habitantes) segundo UF e capital de residência. (Fonte: Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2016)

Outra peculiaridade do estado do RS frente ao resto do Brasil é a prevalência dos subtipos virais do HIV. Na maioria dos outros estados, o subtipo viral B é o que apresenta em maiores frequências, com uma pequena circulação dos subtipos F1, forma recombinante BF1 e C. Já no RS há a presença concomitante de três subtipos virais: B, C e CRF31_BC (Gräf et al., 2016). Essa característica é dificilmente observada em outras regiões do mundo em que, geralmente, apenas um subtipo viral prevalece muito mais que o outro (Simon, 2010; Almeida et al, 2012; Gräf and Pinto, 2013 e Gräf et al., 2016).

1.2. O HIV

O vírus da imunodeficiência humana é um membro do gênero lentivirus e pertence a família dos retroviridae (Chang et al., 1993). O seu material genético é composto de duas moléculas de RNA simples não-complementares e nele há nove genes que codificam 15 proteínas virais (Schwartz e Nair, 1999). Cada molécula do vírus tem um importante papel no sucesso da infecção/replicação, desde a sua entrada/ligação à célula alvo até sua saída/brotamento da mesma.

O genoma viral do HIV é formado por, aproximadamente 10.000 nucleotídeos (Muesing et al., 1985) e possui três genes principais o *gag*, o *pol* e o *env* que codificam proteínas estruturais, enzimas virais e proteínas do envelope, respectivamente. Os genes restantes codificam proteínas regulatórias e acessórias fundamentais também para a replicação viral (Frankel e Young, 1998).

O gene *gag* contém as informações para a produção das proteínas estruturais, tais proteínas são: Matrix – promove a infraestrutura básica das partículas do HIV, formando a superfície interna do vírus, logo abaixo da bicamada lipídica; Capsídeo – a estrutura hexâmera (maioria) e pentâmera promove a forma cônica do capsídeo que envolve o RNA viral (Zhao et al, 2013); Nucleocapsídeo – forma um complexo estável com o RNA viral auxiliando na sua proteção contra nucleases, em alguns processos durante a infecção na célula hospedeira (Didierleurent et al, 2011); p6 – recruta proteínas do hospedeiro para provocar o brotamento para fora da célula das novas partículas virais (Morita et al., 2004).

O gene *pol* produz as enzimas virais tais como: Protease – enzima essencial para a maturação das partículas virais, responsável por clivar poliproteínas codificados pelos genes *gag* e *pol* produzindo proteínas estruturais e enzimas funcionais; Transcriptase reversa - importante enzima que sintetiza uma molécula de DNA a partir da fita simples de RNA viral; Integrase – terceira enzima codificada pelo gene *pol* que catalisa a reação da inserção da fita dupla de cDNA viral no cromossomo humano, desta maneira o HIV pode ficar dormente nas células até décadas (Frankel e Young, 1998).

O gene *env* produz duas proteínas: GP120 – glicoproteína da superfície viral que consiste em três moléculas GP120 e uma de GP41, ligadas por ligações não covalentes (Xue et al., 2012). A GP120 interage com receptores celulares (CD4) (Caffrey, 2011) e a GP41 é uma glicoproteína transmembrana que contém uma região rica em glicina essencial para a fusão com a membrana celular e apresenta uma cauda citoplasmática com diversas outras funções importantes para o ciclo viral (Postler et al., 2013). Essas duas últimas proteínas por terem uma concentração elevada de carboidratos dificultam o reconhecimento por anticorpos do organismo.

Além dos três genes citados acima o HIV apresenta mais cinco genes que codificam suas proteínas acessórias que são as seguintes: Vif (fator de infectividade viral) é uma proteína viral codificada por todos lentivirus exceto o vírus da anemia infecciosa equina. Essa proteína apresenta uma atividade contra moléculas antivirais da célula hospedeira como a APOBEC3 (Harris e Liddament, 2004; Jäger et al., 2011); Vpr (proteína viral R) é uma proteína acessória com múltiplas funções que aumentam a replicação viral em células que não estão se dividindo por exemplo, em macrófagos; Vpu (proteína U viral) é uma proteína acessória que têm duas principais funções, uma de provocar uma queda na quantidade de moléculas CD4 facilitando o brotamento de

partículas virais e a outra é de ser um antagonista da Teterina (proteína transmembrana do tipo II), que é um fator de restrição que impede a fase do ciclo viral brotamento (Dubé et al., 2010); Vpx é uma proteína codificada pelo HIV-2 apenas, uma de suas funções é induzir degradação do SAMHDI, que é outro fator de restrição, via ubiquitinação (Fujita et al., 2010; Zhu et al., 2013); Rev controla a exportação de RNAs do núcleo e auxilia na tradução e empacotamento dos RNAs virais durante a formação de novas partículas (Fernandes et al., 2012); Nef (fator regulatório negativo) é outra proteína acessória que aumenta a patogênese viral diminuindo a quantidade de células CD4 e promovendo o brotamento das partículas virais novas (Laguette et al., 2010).

Outra proteína que constitui a estrutura viral é a Tat (Transativador da transcrição), uma proteína regulatória importante para a replicação viral e encontrada em todos os lentivírus. A Tat interage com muitas proteínas humanas para executar múltiplas funções (Strebel et al., 2003; Brady et al., 2005) como: ativar a inicialização da transcrição e alongamento do promotor LTR - long terminal repeats - do HIV-1, prevenindo o término prematuro da transcrição e a poliadenilação; induz a apoptose das células T; e inibe a atividade da transcriptase reversa para prevenir a síntese prematura de DNA viral. O tat extracelular estimula a expressão da CXCR4 nas células T CD4+, promove a expressão de citocinas e interage com receptores de superfície celular para estimular o processo de tradução na célula (Xue et al., 2012).

Todas essas moléculas virais, citadas acima, se organizam de maneira sincronizada com o objetivo de infectar a célula alvo e utilizando, juntamente, as proteínas da célula hospedeira induz a produção de novas partículas virais.

O HIV pode-se dizer que é estruturado por camadas (Figura 2). A primeira (numa perspectiva de fora para dentro) é formada pelo envelope, onde se encontram as proteínas GP120 e GP41 e é formado por uma bicamada fosfolipídica da última célula infectada. A camada subsequente é a matrix protéica e após localiza-se o capsídeo. Entre essas estruturas se encontram as enzimas protease, integrase e transcriptase reversa. Dentro do capsídeo estão as proteínas acessórias e também, novamente, a transcriptase reversa e a integrase, mais o nucleocapsídeo que envolve a molécula de RNA (Figura 2).

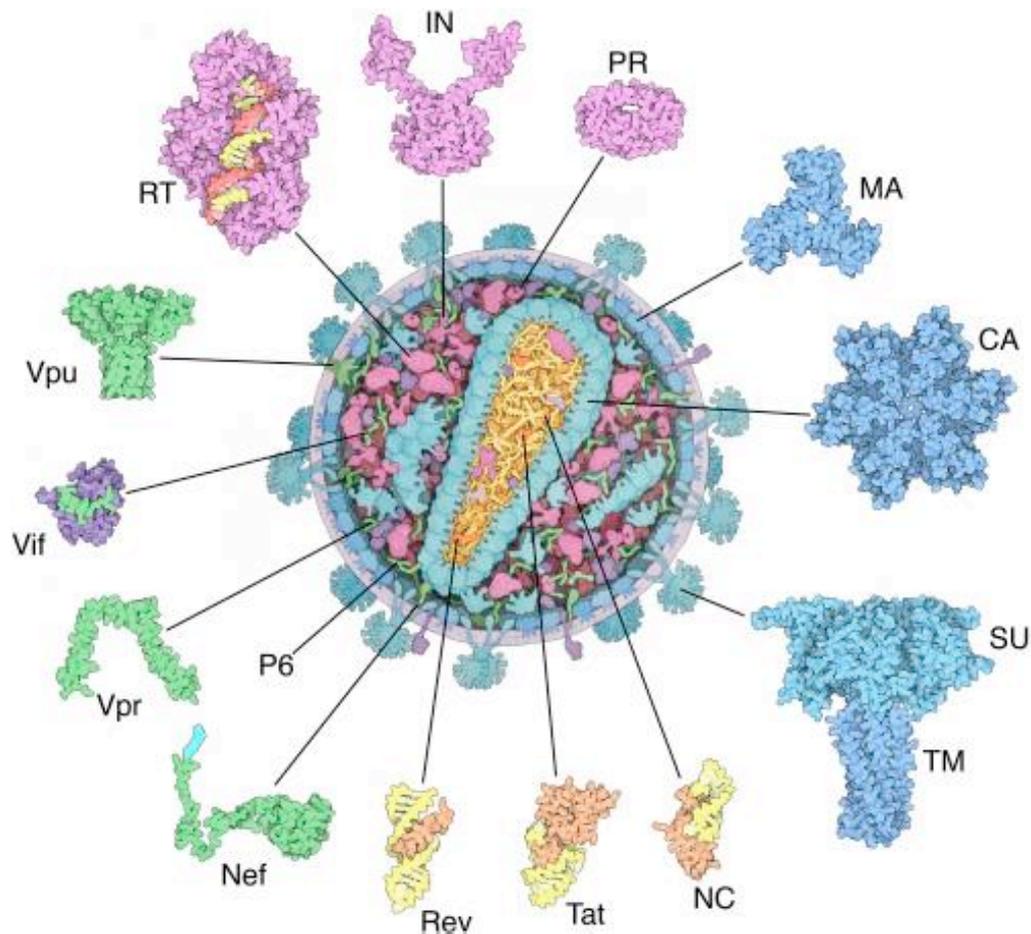


Figura 2. Estrutura viral do HIV-1 com suas respectivas proteínas. Abreviações: IN = integrase, PR = protease, MA = matrix, CA = capsídeo, SU/TM = GP120/GP41, NC = nucleocapsídeo, Tat = transativador da transcrição, Rev = regulador da expressão dos virions, Nef = fator regulatório negativo, Vpr = proteína viral R, Vif = fator de infectividade viral, Vpu = proteína viral U, RT = transcriptase reversa. (Fonte: Protein Data Bank)

O ciclo de infecção e replicação do HIV pode ser dividido didaticamente nas seguintes fases: (i) entrada, (ii) transcrição reversa, (iii) integração, (iv) transcrição/tradução, (v) montagem e brotamento e (vi) maturação. A infecção é um processo extremamente complexo, porém em 24 horas pode ocorrer a produção de 10 bilhões de virions novos que infectam mais de 100 milhões de células alvo (Coffin, 1995).

O HIV começa seu ciclo de replicação identificando, através dos seus trímeros de proteínas GP41 e GP120, receptores de membrana celulares do hospedeiro como o CD4 e outros co-receptores CCR5 e CXCR4 (Uchil e Mothes, 2009). Após a ligação dessas moléculas de superfície, tanto as virais como as celulares, ocorrem complexas mudanças conformacionais que levam o envelope viral a se fundir com a membrana plasmática

celular, possibilitando a entrada da matrix e do capsídeo viral (Uchil e Mothes, 2009). Células que contém os receptores identificados pelo HIV e, que deste modo, são passíveis de serem infectadas são as células dendríticas foliculares, os macrófagos e principalmente os linfócitos T helper.

Após o envelope viral se fundir com a membrana citoplasmática da célula alvo o capsídeo viral entra no citoplasma celular. Após a entrada do capsídeo viral no ambiente celular é ativada uma série de processos que formam o complexo da transcriptase reversa ainda dentro do capsídeo (Warrilow et al., 2009).

Dentro do capsídeo se inicia o processo de transcrição reversa, que irá sintetizar o material genético do vírus a partir do RNA em DNA. Inicialmente é formada uma fita negativa de DNA a partir do molde de RNA pela enzima transcriptase reversa. O híbrido DNA/RNA ativa a degradação da fita de RNA, porém duas regiões de RNA viral resistem à degradação realizada pela RNase H servindo como “primers” para a fita complementar de DNA. Após essa conversão se forma uma molécula de DNA dupla fita e o complexo de pré-integração direciona esse DNA viral para o núcleo celular (Fanales-Belasio et al., 2010).

No núcleo a enzima integrase realiza a integração do DNA viral ao genoma celular em uma região ativamente transcrita. Esta proteína cliva dois nucleotídeos das extremidade 3' do DNA viral, criando duas extremidades reativas que se unem ao DNA do hospedeiro (Schwartz e Nair, 1999). Proteínas virais regulatórias como Tat, Rev e Nef interagem com proteínas da maquinaria da transcrição celular e iniciam a transcrição do DNA viral. O mRNA transcrito a partir do DNA viral é exportado para o citoplasma, onde as proteínas dos novos vírions serão sintetizadas. As proteínas virais vão se organizando próximo à membrana celular e algumas, como as GP120 e GP40, já se fundem na membrana plasmática para gerar novos vírus. Dois RNAs do vírus se associam às enzimas virais, enquanto proteínas do capsídeo se associam a estes formando o nucleocapsídeo. A partir daí, iniciará o brotamento, processo de saída da partícula viral da célula (Levy, 1993; Schwartz e Nair, 1999; Fanales-Belasio et al., 2010).

O brotamento do HIV ocorre em um momento em que todas proteínas virais já foram traduzidas e se encontram próximas à membrana celular. Nesse ambiente ocorrem uma série de interações protéicas virais que provocam alterações na membrana hospedeira e que levam ao brotamento do vírion (Fanales-Belasio et al., 2010). Após o brotamento, o

virion recém formado necessita ficar maduro e esse processo é realizado pela enzima protease que quebra em locais específicos as proteínas precursoras do Gag tornando-as ativas e induzindo um rearranjo estrutural no virion que, apresenta assim potencial de infectar outras células (Fanales-Belasio et al., 2010).

1.2.1. Suscetibilidade ao HIV

O vírus, contudo, nem sempre consegue completar seu ciclo de vida. Incompetência do agente infeccioso ou efetivos mecanismos de defesa celular, em diferentes momentos do ciclo de replicação viral, acabam frustrando a infecção. O sucesso da disseminação de uma patologia infecciosa depende de uma complexa interação do agente infeccioso, do seu hospedeiro e do ambiente (Anokhin et al., 2016).

Em relação ao agente infeccioso, diferentes grupos do HIV apresentam diferenças na propagação da epidemia. Por exemplo, o HIV-2, diferente do HIV-1, é menos virulento e dificilmente sua infecção avança para a aids o que demonstra diferentes características no processo de infecção (Saleh et al., 2017). Já entre os grupos, dentro do HIV-1 há diferenças na propagação por pequenas diferenças nas proteínas produzidas por eles. Uma delas é a variação na proteína viral Vpu, enquanto que nos vírus do grupo M esta proteína, ao longo do processo evolutivo, se tornou um antagonista totalmente funcional dos fatores de restrição intracelulares humanos, especialmente de teterinas, nos demais grupos, esta proteína seria incapaz de inibir eficazmente estes fatores e criaria uma barreira para a propagação efetiva dos vírus na população humana (Sauter et al. 2009). A disseminação não uniforme dos grupos de HIV-1, ao redor do mundo, pode ter sido causada, também, por questões aleatórias que impediram a expansão da população viral por comportamentos da própria população infectada.

O grupo M provavelmente se expandiu em Kinshasa, capital da República Democrática do Congo, por volta de 1920 e além de sua competência infecciosa “pegou carona” com mudanças sociais (Faria et al. 2014). A mudança comportamental das profissionais do sexo na região, o crescimento urbano e a mobilidade humana através das ligações ferroviárias tiveram um papel fundamental na propagação inicial do vírus. O crescimento exponencial da população viral em conjunto com as altas taxas de mutação e as elevadas taxas de replicação do HIV no hospedeiro humano permitiram a geração de

extrema variabilidade genética no vírus (Vidal et al., 2000; Worobey et al., 2008). Atualmente, a epidemia do grupo M é composta por nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, e K) e mais de 65 formas circulantes recombinantes (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>).

1.2.2. AIDS – Progressão da infecção ao HIV

Indivíduos infectados com o HIV podem vir a desenvolver aids. Como o vírus infecta e provoca a morte principalmente dos linfócitos T CD4+, o organismo fica com o sistema imunológico debilitado e, conseqüentemente, vulnerável a diversas doenças oportunistas que podem evoluir ao óbito do paciente. O momento em que o sistema imunológico fica ineficiente ou seja, a contagem de células T CD4+ fica abaixo de 200 células/mm³ é o momento em que o paciente entra na fase de aids (Figura 3) e se não houver intervenção com o uso de antirretrovirais o indivíduo vai a óbito.

A infecção do HIV pode ser dividida em três fases: aguda; crônica; e aids como representado na figura 3. Cada indivíduo infectado pelo HIV, contudo, responde de diferentes maneiras a essa invasão e o período, principalmente da fase crônica, varia muito de indivíduo para indivíduo. O início da infecção é uma das fases mais similares entre diferentes organismos. Após a infecção, nas primeiras semanas, há uma elevada taxa de replicação viral e uma diminuição significativa da quantidade de linfócitos T CD4+. Após essa fase o vírus pode entrar em um período de “latência”, momento em que o sistema imunológico e as características do hospedeiro conseguem manter a carga viral “controlada” e as contagens de células CD4+ elevadas sem a utilização de antivirais. Em alguns indivíduos, porém, denominados progressores rápidos esse período de latência praticamente não ocorre. Em menos de três anos as células CD4+ atingem níveis abaixo de 350/mm³, deste modo, se faz necessário o uso de antirretrovirais na tentativa de conter as taxas de carga viral elevadas (Casado et al., 2010; Olson et al., 2014)

Outro grupo chamado de progressores crônicos representa 75% a 90% da população soropositiva e apresenta sintomas dentro de três a dez anos após a soroconversão. A concentração viral, em pelo menos três testes, sem uso de ARV encontra-se acima de 2000 cópias/mL de RNA viral nos indivíduos deste grupo. Outros pacientes podem ser considerados progressores lentos - não controladores de viremia, pois

são assintomáticos por mais de 10 anos, contudo apresentam taxas superiores a 2000 cópias de RNA viral/mL em 50% das amostras testadas. Já os progressores lentos – controladores de viremia, além de serem assintomático por mais de 10 anos, apresentam taxa igual ou abaixo de 2000 cópias de RNA viral/mL na grande maioria das amostras testadas. Um grupo que representa a minoria dos soropositivos é classificado como “controladores de elite”, pois são assintomático por mais de 10 anos e apresentam taxas de viremia indetectáveis pelos testes atuais sem o uso de ARV (Casado et al., 2010).

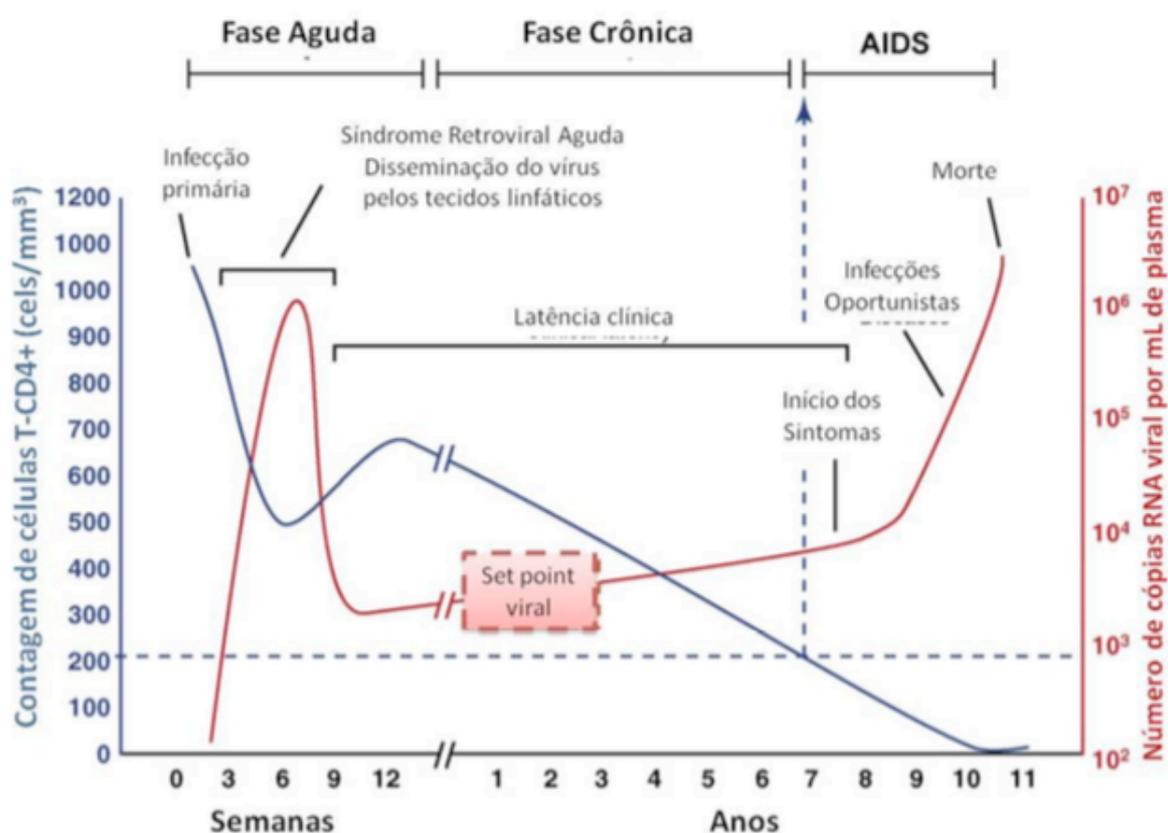


Figura 3. Fases clínicas da infecção pelo HIV (Adaptado de An e Winkler, 2010).

Alguns fatores que podem influenciar na progressão da infecção ao HIV são: o subtipo viral; estado nutricional; co-infecções com outros vírus; e o perfil genético do indivíduo. Esse último fator é o que será abordado neste estudo, mais especificamente em relação aos polimorfismos de alguns fatores de restrição que apresentam atividade anti-HIV.

Apesar de eficientes, as proteínas codificadas pelos genes dos fatores de restrição virais são extremamente polimórficas na população, o que contribui para a variabilidade do

hospedeiro em relação à susceptibilidade (citado anteriormente) e na progressão da infecção (An et al., 2007; An et al., 2010; Anokhin et al., 2016; Silva et al., 2016; Li et al., 2017; Silva et al., 2017). Como é o caso de todas as doenças infecciosas, a susceptibilidade dos indivíduos expostos e a progressão da infecção dependem da variabilidade genética do patógeno, do ambiente e do hospedeiro.

1.2.3. Fatores genéticos do hospedeiro

A diversidade genética do hospedeiro pode impedir ou dificultar a infecção ao HIV. Ao entrar em uma célula o vírus sofre diversos contra-ataques intrínsecos em vários momentos durante seu ciclo de vida e em algumas situações acaba não tendo sucesso na infecção (Samson et al., 1996; Silva et al., 2016; Silva et al., 2017).

Uma mutação que exemplifica a importância do fator genético na suscetibilidade ao HIV-1 é a deleção de 32 pares de bases, na região codificante, do gene do principal co-receptor do HIV-1, o receptor de quimiocina CCR-5. Esse co-receptor, além do CD4, é fundamental para a entrada do vírus nas células alvo, principalmente nos estágios iniciais da infecção. Tal mutação provoca um “frame shift” e assim gera uma proteína não funcional. Indivíduos homocigotos são resistentes à infecção ao HIV-1, pois a ausência da molécula CCR-5 na superfície da célula impossibilita a entrada do vírus e heterocigotos seriam parcialmente resistentes, por apresentarem menor quantidade dessas moléculas na superfície celular (Samson et al., 1996). Esse achado impulsionou a busca por outras mutações genéticas que pudessem influenciar na suscetibilidade ao HIV ou progressão a aids (Valverde-Villegas et al., 2015; Anokhin et al., 2016).

1.3. FATORES DE RESTRIÇÃO

Ao infectar uma célula, os retrovírus, com seu genoma limitado, utilizam a maquinaria do hospedeiro para completar o seu ciclo de vida fazendo uso de diversas proteínas celulares para o seu próprio benefício. Todavia, há proteínas celulares que intervêm contra o vírus tentando inibi-lo, em algum ponto, do seu complexo ciclo de vida. Essas proteínas são denominadas de fatores de restrição.

Dentre as buscas por polimorfismos com potencial anti-HIV os fatores de restrição se tornaram um grande alvo (An et al., 2007; Anokhin et al., 2016; Silva et al., 2016; An et al., 2016; Li et al., 2017; Silva et al., 2017). Os fatores de restrição são proteínas que podem combater as infecções virais formando uma defesa intrínseca celular e, desta maneira, geram um sistema de resposta rápida frente a infecção. Esses fatores atacam, em algum momento, o ciclo viral com o objetivo de interrompe-lo. Alguns exemplos dessas moléculas são: TRIM5 α , APOBEC3, Cul5, Teterinas, SAMHD1 e MicroRNAs.

Como quase todos genes os de fatores de restrição, também, estão sujeitos a trocas de uma única base nitrogenada e dentre os polimorfismos formados alguns promovem uma susceptibilidade ou não à infecção ao HIV (An et al., 2007; Anokhin et al., 2016; Silva et al., 2016; An et al., 2016; Li et al., 2017; Silva et al., 2017). Estudar esses polimorfismos em diferentes populações ajuda a entender os mecanismos de defesa celular e também possibilita o surgimento de novas abordagens para a criação de novas terapias antivirais.

1.3.1. TRIM5 α

Uma das primeira linhas de defesa contra os retrovírus é o fator de restrição TRIM5 α . Essa proteína atua na fase pós entrada e/ou pré-integração do ciclo de vida viral. Inicialmente descoberto em células de macacos rhesus, TRIM5 α apresenta uma importante atividade anti-HIV-1 e com uma importante vantagem de não ter uma proteína viral para contra atacá-lo (Jia et al., 2015).

A proteína “tripartite motif 5” é codificada pelo gene *TRIM5* localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.4) (Reymond et al., 2001). Este gene é formado por oito íntrons e nove éxons e é capaz de produzir diferentes isoformas através do splicing alternativo (Stremlau et al., 2004). As proteínas TRIM5 possuem três estruturas principais: um domínio RING N-terminal (codificado pelo éxon 2) que possui uma atividade E3 ubiquitina ligase requerida para a atividade antiviral; seguido de um ou dois domínios B-box (codificado pelo éxon 2) que influenciam a formação de dímeros de TRIM5 α ; e por uma região “coiled-coil” (codificada pelos éxons 2 a 4) que promove a formação de homodímeros e participa no reconhecimento do capsídeo (Battivelli et al., 2011). Essas três regiões RING/B-box/coiled-coil estão presentes em todas proteínas TRIM5. Já a região C-

terminal varia entre as isoformas e apenas a TRIM5 α contem a região SPRY (codificada pelos éxons 7 e 8) que lhe confere a atividade antiviral por interagir diretamente com o capsídeo (Figura 4).

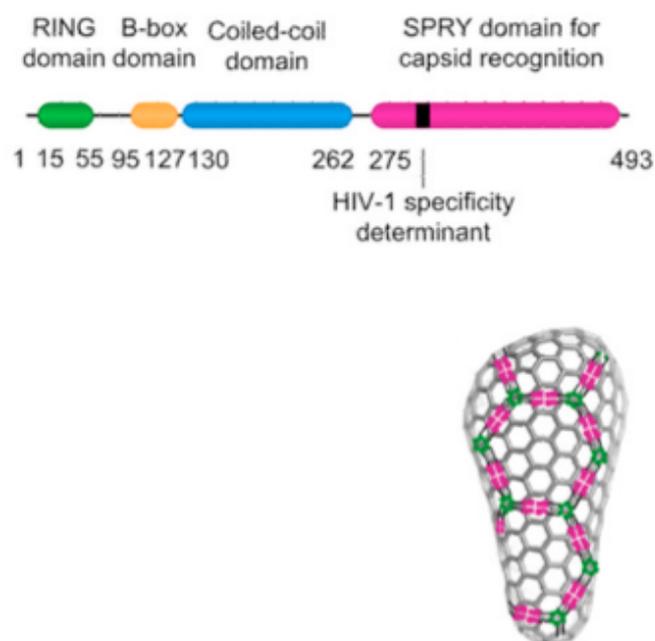


Figura 4. Representação esquemática dos domínios do TRIM5 α (parte de cima da figura). Modelo de como o TRIM5 α se organiza em hexâmeros formando uma rede ao redor do capsídeo viral. O domínio RING (em verde), domínios coiled-coil e B-Box (linhas pretas) e a região SPRY (em rosa) estão indicados no desenho. (Fonte: Blanco-Melo et al., 2012)

A isoforma TRIM5 α apresenta uma pequena efetividade anti-HIV, porém algumas mutações podem lhe conferir um ganho ou não de função antiviral (Anokhin et al., 2016; Silva et al., 2016). A molécula TRIM5 α geralmente inibe retrovírus de outras espécies e não a da própria. Por exemplo, o TRIM5 α humano tem uma atividade fraca ao HIV-1, porém inibe fortemente a propagação do vírus da leucemia murina N-trópica (N-MLV) (Nakayama e Shioda, 2015). Já o TRIM5 α de macacos rhesus não inibe linhagens do SIVmac, mas inibe fortemente o HIV-1 e o SIV de outras linhagens (Stremlau et al, 2004).

O TRIM5 α atua interagindo com o capsídeo viral e provocando seu desempacotamento precoce no citoplasma celular, deste modo permite que proteases inibam o complexo da transcriptase reversa que ocorria dentro do capsídeo (Stremla et al.,

2006). O TRIM5 α pode atuar, também, como uma molécula de sinalização que ativa a via da NF- κ B que indiretamente estimula o sistema imune contra patógenos (Tareen et al., 2011).

O capsídeo do HIV tem uma estrutura em forma de cone, sendo composto por proteínas que formam uma rede pentágona e hexágona (a maioria), onde o domínio N-terminal do capsídeo forma, tanto anéis pentâmeros como hexâmeros e o domínio C-terminal forma homodímeros simétricos que conectam os anéis dentro dessa rede (Pornillos et al., 2011) (Figura 4). O TRIM5 α apresenta uma forma de rede hexagonal que se encaixa simetricamente com a rede do capsídeo (Figura 4), deste modo a isoforma TRIM5 α consegue se encaixar e enfraquecer as ligações C-terminais entre os hexâmeros do capsídeo, desestruturando-o (Arhel, 2010).

Dos oito polimorfismos não sinônimos identificados até o momento no TRIM5 α , apenas dois demonstraram impacto na atividade antiviral que são: o H43Y (rs3740996 localizado no domínio RING); e o R136Q (rs10838525, localizado no domínio B-box) (Figura 5). De acordo com Silva e colaboradores (2016) o polimorfismo rs10838525 que é uma troca de um aminoácido arginina para uma glutamina na posição 136 é mais frequente em populações sadias do que em pacientes soropositivos para o HIV-1 (OR 0.66; CI 95% 0.49-0.90; $p=0.008$). Em outro estudo, Price e colaboradores (2010) pesquisaram um grupo de mulheres trabalhadoras do sexo, do Quênia, e observaram resultados similares de proteção ao HIV-1 com o SNP rs10838525. Contudo em outra pesquisa (Speelmon et al., 2006), com o mesmo polimorfismo, não foram observados tais resultados a respeito da suscetibilidade ao HIV-1. Essas discrepâncias de resultados sugerem mais estudos em diferentes populações, bem como, abrangendo diferentes subtipos virais (Leite et al., 2017).

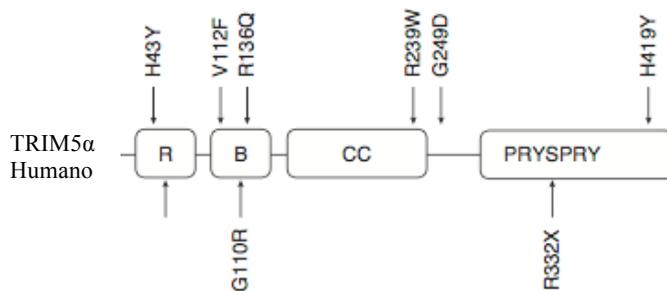


Figura 5. Polimorfismos de única base nitrogenada do TRIM5 α . Os domínios RING, B-box e coiled-coil estão indicados com as respectivas letras R, B e CC. (Fonte: Nakayama e Shioda, 2015)

1.3.2. APOBEC3F

A APOBEC3 (A3) é um fator de restrição pertencente a família das deaminases deoxicitidina que são capazes de suprimir a replicação de vírus ao induzirem hipermutações no seu material genético. As A3 foram os primeiros fatores de restrição a serem descobertos com atividade anti-HIV (Sheehy et al., 2002) dando início a mais estudos nesta área, dos fatores de restrição. O gene *APOBEC3* está localizado no braço longo do cromossomo 22 na região 13.1 (22q13.1) e contém nove exons. Em humanos há sete tipos da enzima (A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G e A3H) (Figura 6) codificadas por sete genes arranjados em tandem. Apenas as enzimas A3DE, A3F, A3G e A3H parecem ser relevantes para a restrição ao HIV-1 nos linfócitos T CD4⁺ (Chaipan et al., 2013).

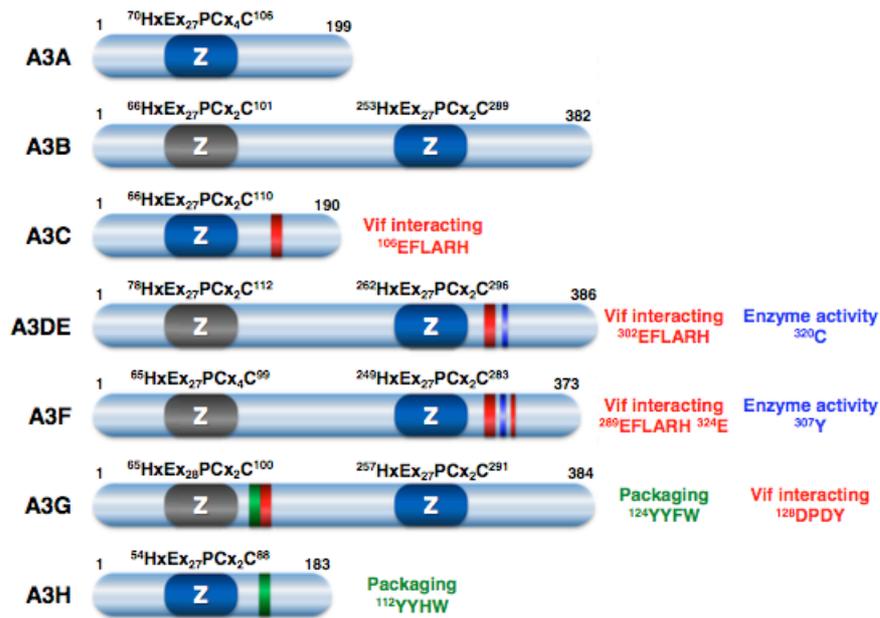


Figura 6. Ilustração esquemática das sete proteínas APOBEC3 humanas. O domínio Z com atividade enzimática está indicado em azul e o domínio Z inativo em cinza. A região de interação com o Vif está identificado em vermelho, a de empacotamento em verde e a região com resíduos críticos que afetam a atividade enzimática em azul. (Fonte: Zheng et al., 2012)

As enzimas A3, além de apresentarem uma atividade anti-HIV-1, tem como função celular inibir a replicação de retroelementos através da habilidade de ligação ao RNA ou pela atividade de deaminisar a citosina do DNA de fita simples (ssDNA). Se observou também, sua capacidade de restringir a replicação de outros retrovírus além do HIV-1 como, por exemplo, o vírus da Hepatite B (Turelli et al, 2004), HTLV-1 (Sasada et al., 2005), vírus da anemia equina infecciosa (Mageat et al., 2003) e vírus da anemia murina (Nitta et al., 2012).

As A3 para, de fato, exercerem sua atividade de restrição ao HIV-1 necessitam se ligar ao RNA viral no momento em que está ocorrendo a formação de novas partículas virais (primeira célula infectada) e assim ser empacotadas no capsídeo (Sheehy et al., 2002). Após o vírus entrar em uma nova célula a A3 que foi empacotada na primeira infecção, agora inicia sua atividade durante o processo de transcrição reversa atingindo as moléculas de cDNA viral recém formadas.

As APOBEC3 apresentam a função de citidina desaminase, que consiste em remover o grupamento amina das citidinas convertendo-as em uridinas no DNA viral, desta maneira resultando na instabilidade do novo transcrito viral. Todas proteínas A3 tem uma ou duas cópias do domínio de deaminase coordenadas pelo zinco (domínio Z). Tal

domínio é o responsável por promover a conversão da citosina (C) em uracila (U) na recente molécula de DNA que está sendo formada a partir do RNA pelo complexo da transcriptase reversa (Figura 7). Essa uracila não sendo reparada por mecanismos de reparo terá como base complementar uma Adenina (A) na molécula do DNA e essas permutações G-para-A comprometem a integridade do genoma viral. Contudo não é toda C que será alterada e cada A3 apresenta afinidades diferentes para certos tipos de sequência dinucleotídica. A A3G preferencialmente causa mutações em 5'-CC-para-CU o que induz na fita complementar 5'-GG-para-AG (Liddament MT et al., 2004). Já as A3B, A3DE, A3F e A3H causam mutações, preferencialmente, em regiões 5'-TC-para-TU e conseqüentemente fita complementar 5'-GA-para-AA (Liddament et al., 2004; Doehle et al., 2005; Dang et al., 2006; OhAinle et al., 2006) (Figura 7).

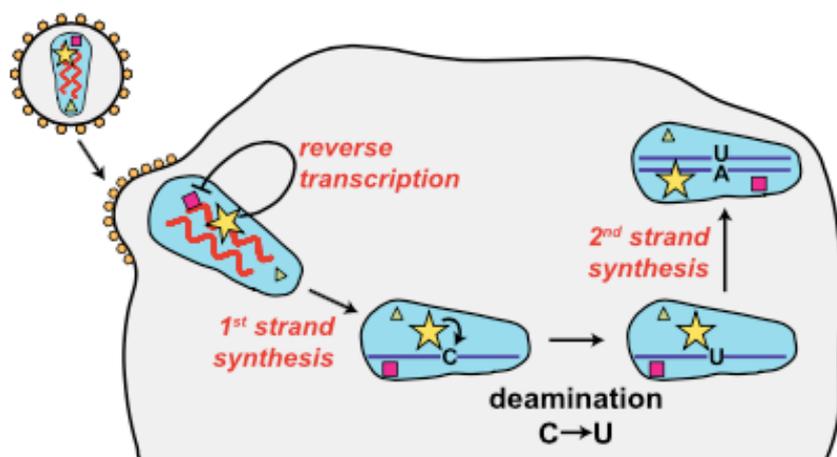


Figura 7. Ilustração resumida de como a APOBEC3 (estrela amarela) introduz mutações no cDNA viral. A3 é incorporada previamente no vírus durante o brotamento e incorporada no core. A A3 deamina a citosina em uracila na fita simples negativa do cDNA incorporando demasiadamente deoxiadenosina ao invés de deoxiguanosina durante a síntese da fita positiva. Processo denominado de hipermutação. Quadrado rosa: Transcriptase reversa; Triângulo verde: integrase. (Fonte: Rehwinkel., 2014)

Outra diferença entre as A3 é a organização da estrutura protéica. No domínio C-terminal da A3G se encontra a atividade deaminase e no domínio N-terminal é onde se liga o DNA/RNA e o nucleocapsídeo do HIV-1 para a A3G ser empacotada nos vírions. Nesta mesma região N-terminal, também, é onde se localiza o sitio alvo da Vif (proteína viral que inibe as A3s). Já na A3F essa ligação da Vif se encontra no domínio C-terminal bem como a região de atividade deaminase (Jia et al., 2015).

Em relação a atividade antiviral alguns estudos mostram que a A3F seja mais forte em relação a A3G (Bishop et al., 2004; Liddament et al., 2004; Wiegand et al., 2004), enquanto outros indicam que ela é mais fraca (Gillick et al., 2013; Chaipan et al., 2013). Uma vantagem da A3F frente a A3G é que a A3F é parcialmente resiste a degradação provocada pela Vif (Liddament et al., 2004). Tais discrepâncias de conclusões instigam mais estudos em relação as A3s.

Um polimorfismo estudado sobre a A3F é o rs2076101 uma troca de aminoácido isoleucina por uma valina na posição 231 (ATC>GTC). O genótipo GG ou AG, no estudo de An e colaboradores (2016) conferiu proteção aos indivíduos com esses genótipos em relação a progressão a aids, uma vez que é mais prevalente nos progressores lentos (OR=0,62, P=0,004). Todavia mais estudos e em diferentes populações se faz necessário para se ampliar o conhecimento sobre esse SNP.

1.3.3. CUL5

A Cullin 5 (Cul5) é uma proteína codificada pelo gene *CUL5* localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q22.3). Por ser uma proteína que contém uma atividade ubiquitinina ligase tem como alvo diversos substratos em que induz a degradação proteossomal ou compete em interações protéicas (Okumura et al., 2016).

Para entendermos a função da proteína Cul5 em limitar a proliferação da infecção do HIV-1 é necessário lembrar da proteína acessória viral denominada fator de infectividade viral (Vif). O HIV-1 Vif é essencial para a degradação dos fatores de restrição A3 (Sheehy et al., 2003; Stopak et al., 2003) porém, para exercer tal função, necessita formar um complexo que envolve a presença do Cul5.

A proteína Vif é formada por 192 aminoácidos, é altamente conservada e está presente em todos os lentivírus com exceção do vírus da anemia equina. A Vif interage com a Cul5, Elonginas B e C (Elo B/C) e RING-box 1/RING-box 2 (Kim, 2015). Esse complexo interage com as A3s e induz sua ubiquitinação e degradação ao recrutar um complexo E3 ubiquitinina (Mehle et al., 2004; Kobayashi et al., 2005) (Figura 8). O complexo ubiquitinina E3 ligase é formado pela Vif, Cul5, Elo B/C e a proteína Box-RING (Yu et al., 2003). A ligação da Elo B/C muda a conformação da Vif, facilitando sua

interação com o CBF- β (“Core binding factor beta”) e Cul5 (Wang et al., 2014). O Vif/CBF- β /EloB/C heterotetrâmero promove uma mudança de conformação que promove a ligação ao Cul5, sugerindo uma ordem na organização desse complexo E3 ligase (Fribourgh et al., 2014) para promover a ubiquitinação das A3s. Na ausência da Vif ou se sua atividade está comprometida as A3 são empacotadas sem restrições nas partículas virais promovendo hipermutações no DNA viral como já citado anteriormente (Lecossier et al., 2003). Mutações na estrutura da Cul5, também, podem trazer tal consequência, por não interagir corretamente com a Vif prejudicando seu efeito anti-A3 e consequentemente dificultar a infecção do HIV-1 (An et al., 2007).

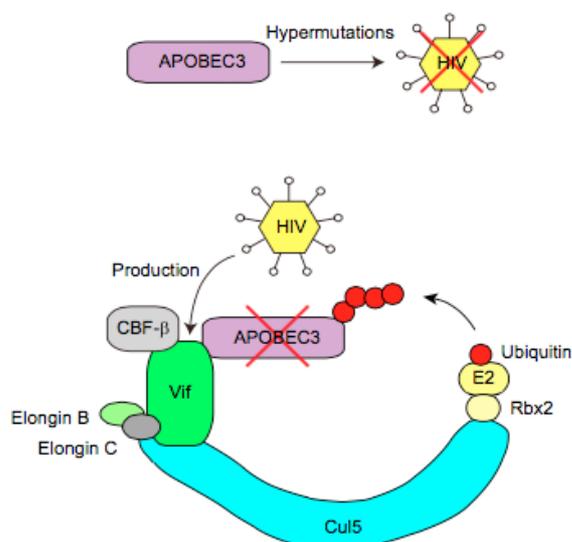


Figura 8. Degradação da APOBEC3 pela Vif. A proteína viral Vif forma um complexo com Cul5, a Elonguin B/C, Rbx2, E2, ubiquitinina e CBF- β . O objetivo do complexo formado é poliubiquitinar a A3 e induzir a degradação proteossomal. (Fonte: Okumura, 2016)

A suscetibilidade ao HIV e a progressão a aids podem ser afetados por variações nos genes humanos (An et al., 2010; Anokhin et al., 2016). Alguns SNPs no gene da *CUL5* tem sido relacionados em comprometer as taxas de células CD4+ em pacientes infectados com HIV-1 (An et al., 2007). An e colaboradores identificaram Cul5 haplótipos que podem ser agrupados em dois clusters com efeitos opostos, o cluster-1 retarda a diminuição das taxas de células CD4+ e o cluster-2 acelera essa perda em infectados pelo HIV-1. Tal estudo demonstra que diferentes alterações nessa molécula podem influenciar de maneiras opostas a progressão a aids. Um dos SNPs que provoca uma perda acelerada de células

CD4+ é o rs7117111, tal polimorfismo ocorre na terceira posição do códon 75 (CAA > CAG), mantendo a codificação do aminoácido glutamina (Q).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar as possíveis associações dos polimorfismos nos genes *TRIM5*, *APOBEC3* e *CUL5* com a suscetibilidade ao HIV-1 e a progressão a aids.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos nos genes *TRIM5*, *APOBEC3* e *CUL5*;

2.2.2. Avaliar se as frequências genotípicas mostram-se diferentes entre os grupos étnicos – brancos e não brancos;

2.2.3. Verificar a associação entre os polimorfismos dos fatores de restrição e a suscetibilidade ao HIV;

2.2.4. Verificar a associação entre os polimorfismos dos fatores de restrição e a progressão a aids;

3. METODOLOGIA

3.1. Amostras

3.1.1. Amostras para avaliação da suscetibilidade

As amostras HIV negativas foram colhidas de doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As 324 amostras coletadas foram submetidas a testes de triagem da rotina do banco de sangue. Os exames realizados foram: para Hepatite B – HbsAg, antiHBc e teste para detecção de ácido nucléico (NAT) para HBV; para Hepatite C – anti-HCV e NAT do HCV; para AIDS – anti-HIV-1, 2 e 0 e NAT do HIV; para doença de Chagas – anticorpos anti-T cruzi; para sífilis – detecção de anticorpos anti-treponêmicos; e para o HTLV I/II detecção de anti-HTLV I/II. Todos os indivíduos, além de terem suas amostras submetidas aos testes já citados, passaram por uma triagem clínica que visa excluir possíveis candidatos que se expuseram a situações de risco de contaminação por umas dessas patologias infecciosas, antes da doação de sangue. Tais medidas visam diminuir as chances de incluir candidatos em “janela imunológica”, período em que o indivíduo está infectado, porém os testes ainda não são suficientemente sensíveis para detectar.

O grupo formado por soropositivos para o HIV foi constituído de pacientes que foram atendidos no serviço de Infectologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição de Porto Alegre. O total de amostras HIV+ utilizadas neste estudo foi de 347. Tais indivíduos foram selecionados a partir de uma análise de mais de 3.500 prontuários entre os anos de 2011 a 2013 e os pacientes com os perfis clínicos desejados foram selecionados. Os critérios iniciais de seleção foram: a possibilidade de se estipular a soroconversão pelos testes negativos prévios ao teste positivo para HIV; e ter cinco ou mais anos de acompanhamento clínico após o diagnóstico sem recomendação de utilização de antirretrovirais.

3.1.2. Amostras para avaliação da progressão

Para avaliar a frequência e o impacto dos SNPs na progressão a aids o grupo de HIV+ (que tinham dados suficientes para realizar a classificação de progressores) foi dividido entre progressores rápidos (PR) e progressores não rápidos (PNR). Essa classificação foi realizada utilizando-se dados clínicos e laboratoriais, incluindo contagens de células T CD4+, carga viral plasmática, teste soronegativo para HIV, primeiro teste soropositivo, primeira contagem de células T CD4+, estágio clínico do momento da coleta e prescrição ou não de drogas antivirais. Para progressores rápidos os critérios empregados foram: tempo entre sorologia HIV- e sorologia HIV+ e diagnóstico de aids inferior a 3 anos, além de, no mínimo, duas contagens consecutivas de linfócitos T CD4+ inferior a 350 cél/mm^3 anterior a coleta. Para os progressores não rápidos foram utilizadas as seguintes informações: nove anos ou mais de sorologia positiva para o HIV sem a presença de sintomas (sem diagnóstico de aids) com, no mínimo, duas contagens consecutivas de linfócitos CD4+ maiores que 500 cél/mm^3 anteriores a coleta e sem recomendação de uso de antirretrovirais. Outro dado importante para a classificação da progressão a aids foi a inclinação da reta (*slope*) gerada a partir da queda do número de células CD4+ dos pacientes HIV+. Nos progressores rápidos se obteve um *slope* de -4,051, representando uma queda mais acentuada que o *slope* observado nos progressores não rápidos (-0,358).

3.1.3. Etnia

Os indivíduos foram classificados em brancos e não brancos conforme a cor da pele utilizando a classificação de Fitzpatrick, 1988 em que se classifica numa escala de 1 (branco) a 6 (negro) e por autodeclaração de descendência (Questionário para coleta de dados – Anexo A). Indivíduos classificados de 1 a 4, na classificação de Fitzpatrick, foram considerados brancos e os classificados de 5 a 6 de não brancos.

3.2. Considerações éticas

Os comitês de ética do Hospital Nossa Senhora da Conceição (Anexo B), bem como o da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo C) (002964-20.69/10-5 e 30491714.0.0000.5347, registros no Comitê de Ética em Pesquisa, respectivamente) e os Comitês do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e o da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) (Anexo D) aprovaram a realização do estudo. Todos participantes da pesquisa assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (Anexo E).

3.3. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue periférico coletadas em tubos de EDTA foi realizada manualmente pela técnica modificada de precipitação de DNA por altas concentrações de sal (técnica de “salting out”) (Lahiri e Nurenberger, 1991). As amostras foram previamente centrifugadas em 1500 rpm por 10 minutos com o objetivo de separar a camada de leucócitos e plaquetas (“buffycoat”). Essa camada rica em células mononucleadas do sangue periférico foi utilizada na técnica de extração. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de extração do laboratório. Após as extrações o DNA foi quantificado e diluído com água ultra pura para se obter uma concentração final entre 08 a 20 ng/μL de DNA. Estas amostras, de material genético, diluídas em água ultra pura foram armazenadas em freezer (-20° C) até a genotipagem. Todas estas etapas foram realizadas no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico na FEPPS.

3.4. Genotipagem

Três polimorfismos localizados em genes de fatores de restrição foram selecionados devido a suas atividades no ciclo do HIV-1. Os polimorfismos genotipados

foram para o *TRIM5α* (rs10838525); para *APOBEC3F* (rs2076101) e para o *Cul5* (rs7117111).

Todos os genes foram genotipados utilizando sondas fluorogênicas alelo específicas (TaqMan®). As sondas utilizadas (Thermo Fisher Scientific®) para identificar os SNPs foram: para o *TRIM5α* a sonda C_1452187_20 (ATCCCAGTCTCTTACT TGGTACTCC[C/T]GGGCAACCTCCTCTGTGAGGAACGT); para a *APOBEC3F* a C_2189617_10 (GGAAGTTGTAAAGCACCCTCACCT[A/G]TCTCCTGGAAGAGG GCGTCTTCG); e para o *Cul5* a C_1345426_10 (AAGATATTCTTGAGTTTATTAA GCA[A/G]GCACAGGCAGTAAGTTCTACATGCT). A genotipagem foi realizada em uma plataforma de PCR de tempo real com o equipamento StepOnePlus™.

O programa de amplificação utilizado na PCR foi o seguinte: ativação da enzima Taq DNA HotStart polimerase por 10 minutos à 95°C; desnaturação à 95°C por 15 segundos; e Anelamento/extensão à 60°C por um minuto. Repetidos 40 ciclos com exceção da fase de ativação enzimática. Após a genotipagem pelo PCR em tempo-real o *software* traduz as emissões de fluorescência para cada alelo identificado e gera gráficos para interpretação dos resultados.

3.5. Análise estatística

A análise dos dados demográficos dos grupos investigados foi realizada utilizando-se o teste “t de Student”. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado entre os indivíduos HIV positivo e HIV negativo usando o teste qui-quadrado (χ^2). Uma tabela de contingência 2x2 foi utilizada para o teste exato de Fisher para investigar as diferentes frequências genotípicas e alélicas entre os grupos. Modelos codominante, dominante e recessivo foram avaliados e associações genotípicas e “odds ratios” (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) foram estimados por regressão logística univariada. Para análise da suscetibilidade foi realizada regressão logística comparando os indivíduos HIV positivo e HIV negativo separados pela variável etnia e para a progressão a aids foram comparados progressores rápidos e não rápidos ajustados com a variável etnia. Os resultados foram considerados significativos com um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Dados demográficos

A tabela 1 apresenta algumas características demográficas das populações estudadas. Os indivíduos HIV negativos têm uma média de idade de $36,9 \pm 12,1$ anos, 48,5% são do sexo feminino e 80,9% são considerados brancos. Esses dados são estatisticamente diferentes do grupo formado por soropositivos que tem uma média de $40,7 \pm 10,2$ anos de idade, 59,6% do sexo feminino e 57,6% brancos. Dos 347 indivíduos HIV positivos, foi possível a classificação entre progressores rápidos e não rápidos de 177 pacientes, em que 39 foram considerados progressores rápidos (PR) e 138 progressores não rápidos (PNR). Entre esses grupos nota-se uma maior semelhança quanto aos dados demográficos. A idade média, gênero e etnia dos PR e PNR foi de $40,5 \pm 11,6$ anos, 69,2% feminino e 63,9% brancos e $40 \pm 9,7$ anos, 71,8% femininos e 61,6% brancos respectivamente. Entre esses grupos as variáveis comparadas não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos HIV positivo e HIV negativo.

Características	HIV- (n=324)	HIV+ (n=347)	HIV- vs HIV+	HIV+		PR vs PNR
			Valor de p	PR (n=39)	PNR (n=138)	Valor de p
Idade média \pm DP	$36,9 \pm 12,1$	$40,7 \pm 10,2$	<0,001	$40,5 \pm 11,6$	$40,9 \pm 9,7$	NS
Sexo n (%)						
Feminino	157 (48,5)	207 (59,6)	0,036	27 (69,2)	102 (71,8)	NS
Masculino	147 (45,3)	139 (40)		12 (30,8)	36 (28,2)	
Etnia n (%)						
Branco	262 (80,9)	200 (57,6)	<0,001	23 (63,9)	85 (61,6)	NS
Não brancos	62 (19,1)	94 (27,1)		12 (36,1)	51 (36,9)	

NS = não significativo

4.2. Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs

Na tabela 2 observam-se as frequências genotípicas e alélicas dos três SNPs estudados nos grupos HIV-, HIV+ e progressores rápidos e não rápidos. Ao se comparar

esses dados de frequência com os do projeto HapMap nota-se uma grande similaridade entre o grupo de brancos do estudo e o de europeus do projeto. Todas frequências genóticas do presente estudo encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (HIV+ e HIV-) e nem entre os progressores. Separando-se os indivíduos em brancos e não brancos encontramos diferenças de frequências genóticas e alélicas significativas para os SNPs avaliados (Tabela 3).

Tabela 2. Frequências genóticas e alélicas dos três SNPs nos grupos estudados e análise do qui-quadrado.

GENE	SNP	HIV+ n (%)	HIV- n (%)	P	PR n (%)	PNR n (%)	P
<i>TRIM5</i>	rs10838525	n= 345	n= 324		n= 38	n= 137	
	CC	171 (49,6)	151 (46,6)	0,521	23 (60,5)	70 (51,1)	0,128
	CT	144 (41,7)	137 (42,3)		15 (39,5)	54 (39,4)	
	TT	30 (8,7)	36 (11,1)		0	13 (9,5)	
	C	486 (70,4)	439 (67,7)	0,287	61 (80,3)	194 (70,8)	0,101
T	204 (29,6)	209 (32,3)	15 (19,7)		80 (29,2)		
<i>APOBEC3F</i>	rs2076101	n= 342	n= 324		n= 38	n= 138	
	AA	98 (28,7)	100 (30,9)	0,547	11(28,9)	34 (24,6)	0,828
	AG	176 (51,5)	153 (47,2)		21 (55,2)	78 (56,5)	
	GG	68 (19,9)	71 (21,9)		6 (15,8)	26 (18,8)	
	A	372 (54,4)	353 (54,5)	0,974	43 (56,6)	146 (52,9)	0,569
G	312 (45,6)	295 (45,5)	33 (43,4)		130 (47,1)		
<i>CUL5</i>	rs7117111	n= 343	n= 323		n= 39	n=137	
	AA	61 (17,8)	45 (13,9)	0,200	3 (7,8)	16 (11,7)	0,112
	AG	172 (50,1)	156 (48,3)		18 (46,1)	82 (59,8)	
	GG	110 (32,1)	122 (37,8)		18 (46,1)	39 (28,5)	
	A	294 (42,8)	246 (38,1)	0,076	24 (30,8)	114 (41,6)	0,084
G	392 (57,2)	400 (61,9)	54 (69,2)		160 (58,4)		

Tabela 3. Frequências genotípicas e alélicas de todos os três SNPs nos grupos separados por etnia e análise do qui-quadrado.

GENE	SNP	HIV+ Brancos n (%)	HIV+ Não brancos n (%)	p	HIV- Brancos n (%)	HIV- Não brancos n (%)	p
<i>TRIM5</i>	rs10838525	n= 198	n= 94		n= 262	n= 62	
	CC	92 (46,5)	59 (62,8)	0,022	115 (43,9)	36 (58,1)	0,099
	CT	86 (43,4)	31 (33,0)		118 (45,0)	19 (30,6)	
	TT	20 (10,1)	4 (4,3)		29 (11,1)	7 (11,3)	
	C	270 (68,2)	149 (79,2)	0,005	348 (66,4)	91 (73,4)	0,135
	T	126 (31,8)	39 (20,8)		176 (33,6)	33 (26,6)	
<i>APOBEC3F</i>	rs2076101	n= 198	n= 92		n= 262	n= 62	
	AA	58 (29,3)	18 (19,6)	0,210	85 (32,4)	15 (24,2)	0,237
	AG	104 (52,5)	54 (58,7)		124 (47,3)	29 (46,8)	
	GG	36 (18,2)	20 (21,7)		53 (20,2)	18 (29,0)	
	A	220 (55,5)	90 (48,9)	0,136	294 (56,1)	59 (47,6)	0,086
	G	176 (44,5)	94 (51,1)		230 (43,9)	65 (52,4)	
<i>CUL5</i>	rs7117111	n= 198	n= 93		n= 261	n= 62	
	AA	35 (17,7)	14 (15,1)	0,294	35 (13,4)	10 (16,1)	0,022
	AG	100 (50,5)	56 (60,2)		118 (45,2)	38 (61,3)	
	GG	63 (31,8)	23 (24,7)		108 (41,4)	14 (22,6)	
	A	170 (42,9)	84 (45,2)	0,613	188 (36,0)	58 (46,8)	0,027
	G	226 (57,1)	102 (54,8)		334 (64,0)	66 (53,2)	

4.3. Associação dos SNPs à suscetibilidade a infecção ao HIV

A análise χ^2 dos modelos codominante, dominante e recessivo entre o grupo geral de HIV positivo e HIV negativo não apresentou resultados significativos para os três SNPs em questão (Tabela 2). Contudo quando indivíduos HIV positivos e HIV negativos são analisados separadamente de acordo com a etnia, o modelo recessivo do SNP rs7117111, em brancos, apresentou uma diferença significativa ($p=0,041$). A partir da análise de regressão logística univariada neste mesmo grupo se manteve um resultado significativo no modelo recessivo (modelo recessivo, genótipo GG, OR ajustado: 0,661, 95% IC 0,449-0,974, $P=0,036$) (Tabela 4). Nos demais SNPs não se encontrou diferenças significativas entre as frequências, mesmo após o ajuste com a variável etnia.

Tabela 4. Qui-quadrado e regressão logística univariada entre indivíduos brancos HIV+ e HIV-.

Gene	SNP	Modelo	Genótipos	HIV+	HIV-	χ^2	Regressão logística univariada	
				(n=198)	(n=261)		Valor de OR (95% CI)	Valor de p
				n (%)	n (%)	p		
<i>CUL5</i>	rs7117111	Codominante	AA	35 (17,7)	35 (13,4)	0,092	-	
			AG	100 (50,5)	118 (45,2)			
			GG	63 (0,318)	108 (41,4)			
		Dominante	AA	35 (17,7)	35 (13,4)	0,238	-	
			AG+GG	163 (82,3)	226 (86,6)			
		Recessivo	AA+AG	135 (68,2)	153 (58,6)	0,041	1	0,661 (0,449-0,974)
GG	63 (31,8)		108 (41,4)					

4.4. Associação dos SNPs com a progressão a aids

Quando realizadas as análises estatísticas (χ^2 e regressão logística univariada com modelos codominantes, dominantes e recessivos mesmo ajustados por etnia) para se determinar a influencia dos SNPs na progressão a aids nenhum resultado foi estatisticamente significativo, com exceção da análise de qui-quadrado no modelo recessivo do SNP7117111 ($p=0,037$). Contudo ao se aplicar um teste estatístico mais robusto, a regressão logística univariada, a diferença entre as frequências perdeu a significância estatística. Todavia o valor encontrado ficou próximo a significância (modelo recessivo, genótipo GG, OR ajustado: 2,115, 95% IC 0,990-4,521, $P=0,053$) (Tabela 5).

Tabela 5. Falta de associação do gene *CUL5* com a progressão a aids

Gene	SNP	Modelo	Genótipos	PR (n=39)	PNR (n=137)	χ^2	Regressão logística multivariada*		
				n (%)	n (%)		OR (95% CI)	Valor de p	
<i>CUL5</i>	rs7117111	Dominante	AA	3 (7,8)	16 (11,7)	0,479	1	1,467 (0,40-5,377)	0,563
			AG+GG	36 (93,2)	121 (88,3)				
		Recessivo	AA+AG	21 (53,9)	98 (71,5)	0,037	1	2,115 (0,990-4,520)	0,053
			GG	18 (46,1)	39 (28,5)				

*Ajustado por etnia

5. DISCUSSÃO

Desde a descoberta de indivíduos resistentes ao HIV-1, homocigotos da deleção de 32 pares de base do gene *CCR-5* (Samson et al., 1996), tem crescido a busca por fatores genéticos que pudessem trazer informações para reduzir a epidemia provocada por esse vírus. Em 2002, Sheehy e colaboradores identificaram uma proteína com capacidade de restringir a infecção do HIV-1. Essa proteína foi o primeiro fator de restrição relatado, a APOBEC3G, e assim abriu novos questionamentos quanto ao sistema de defesa intrínseco celular. O presente estudo foi desenhado com o propósito de avaliar a frequência de três SNPs em diferentes genes de fatores de restrição, que poderiam estar influenciando a suscetibilidade à infecção ao HIV-1 e a progressão a aids.

O grupo de indivíduos HIV+ foi subclassificado em progressores rápidos e não rápidos de acordo com critérios já bem definidos na literatura (An e Winkler, 2010; Casado et al., 2010). O grupo controle foi formado com o objetivo de parear com as características demográficas do grupo HIV+ e deste modo, diminuir os efeitos de possíveis diferenças. Contudo, como o grupo de indivíduos HIV negativos foi constituído a partir de doadores de sangue, a idade média dessas pessoas é mais baixa que a observada nos pacientes HIV. Em relação ao sexo, o número de mulheres doadoras é pequeno e, em contrapartida, o número de mulheres HIV+ é mais alto em função da maior procura delas pelos serviços de saúde e os programas de monitoramento das gestantes. Outra questão que chama a atenção é fato de termos um número mais elevado de indivíduos não brancos no grupo de pessoas HIV positivo. A população do estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se por uma origem principalmente européia, mas o recorte da população HIV reflete claramente a baixa condição sócio-econômica desse grupo, onde se concentram indivíduos afrodescendentes.

Embora o grupo controle tenha sido formado por indivíduos, teoricamente, menos propensos a se exporem a situações de risco de infecção pelo HIV, tal fato não diminui as descobertas do estudo. Comparando-se o grupo controle utilizado com um grupo controle altamente exposto a possível infecção ao HIV, este segundo apresenta características mais homogêneas. Deste modo, encontrar alguma diferença alélica em um grupo mais heterogêneo seria mais dificultoso, enriquecendo os achados.

Os genes dos fatores de restrição são bem polimórficos e, às vezes, essa diversidade é observada na variabilidade da resposta à infecção pelo HIV. O SNP rs10838525 presente

no gene *TRIM5α*, que promove uma alteração de aminoácidos, na posição 136, de uma arginina (R) para uma glutamina (Q) tem sido considerado potencial candidato. Um estudo de Speelman e colaboradores de 2006 identificou 48 SNPs no *TRIM5α* e observou que ocorria um alto grau de desequilíbrio de ligação. Este fato levou a fazerem inferências com haplótipos. Quando analisados separadamente, no trabalho acima citado, os SNPs (incluindo o rs10838525) não revelaram associações significativas com a suscetibilidade, variação da carga viral e com a contagem de células CD4+ num grupo predominantemente de euro-americanos. Porém quando analisaram um haplótipo, contendo a mutação 136Q, encontram mais frequente no grupo HIV+ (OR: 5,49, 95% IC 1,83-16,45, $P=0,002$). Tal achado sugeriu que a sequência genética, realmente responsável por esse resultado, estaria em desequilíbrio de ligação com este haplótipo, podendo estar no próprio gene *TRIM5* ou em genes adjacentes.

Uma pesquisa de 2010 realizada por Price e colaboradores, verificou a frequência dos haplótipos e SNPs localizados no éxon dois do *TRIM5α* em um grupo de mulheres trabalhadoras do sexo do Quênia (soropositivas e soronegativas). A mutação 136Q foi fortemente relacionada com a resistência a infecção ao HIV-1 no grupo analisado (OR: 2,991, 95% IC 1,806-4,953, $P<0,0001$). Esse resultado é contrário ao do primeiro estudo, contudo o grupo estudado era formado por indivíduos negros e os HIV negativos eram “altamente expostos” (trabalhadoras do sexo). Em relação a progressão a aids, neste mesmo estudo, nenhuma correlação foi encontrada entre os SNPs individualmente ou haplótipos e a progressão da doença.

Corroborando com este achado de proteção a infecção pelo HIV-1 do SNP rs10838525, um estudo foi realizado com um grupo de indivíduos do nordeste brasileiro por Silva e colaboradores (2016). Essa pesquisa investigou a influência de três SNPs (rs3740996, rs10838525 e rs16934386) e o rs10838525 isoladamente apresentou uma frequência maior do alelo T (glutamina) e do genótipo TT na população saudável (Alelo T: OR: 0,66, 95% CI 0,49-0,90, $P=0,008$ / Genótipo TT: OR: 0,33, 95% CI 0,13-0,79, $P=0,008$).

Alguns resultados discrepantes podem estar ocorrendo devido a outras isoformas do TRIM5, entre elas a TRIM₁, TRIM_γ, TRIM_δ e TRIM_κ. De acordo com Battivelli e colaboradores (2011), a isoforma TRIM5_α representa de 37 a 52% de todos mRNA da TRIM5. As outras isoformas menos abundantes, por não apresentarem o domínio SPRY

não apresentam atividade anti-HIV, contudo podem se ligar ao TRIM5 α e inibi-lo. Deste modo, cogita-se que diferentes concentrações de diferentes isoformas do TRIM5 podem modular a atividade do TRIM5 α e influenciar a suscetibilidade a infecção ao HIV-1. O códon 136 é localizado dentro do domínio B-box do TRIM5 α , que é requerido para a dimerização do TRIM5, fundamental para se criar a estrutura em forma de rede e reconhecer e se ligar ao capsídeo do HIV-1. Assim a alteração de uma arginina para uma glutamina, nesse ponto, pode estar tornando a proteína mais ativa contra o HIV-1 em certos indivíduos.

No presente estudo ao se avaliar a influência desse SNP na suscetibilidade ao HIV-1 e progressão a aids não foram observados resultados que determinassem sua relevância na amostra estudada. Embora tenha sido identificada uma diferença significativa das frequências desses polimorfismos entre brancos e não brancos, quando a análise foi feita nesses grupos em separado ou ajustando pela etnia, os resultados não foram significativos.

O SNP rs2076101 da isoforma APOBEC3F leva a uma alteração do aminoácido isoleucina (I) por uma valina (V) na códon 231. No presente grupo estudado não foi evidenciado a associação desse polimorfismo com a suscetibilidade ao HIV-1 ou com progressão a aids. Já num grupo de 707 indivíduos euro-americanos e 281 Afro-americanos um estudo realizado por An e colaboradores (2016), demonstrou que a variante 231V da A3F está relacionada com uma progressão mais lenta a aids (modelo dominante, RH = 0,68, CI 95%, 0,54-0,87, $P=0,002$). Tal alteração também mostrou ser protetiva no grupo de euro-americanos quanto ao desenvolvimento de pneumonia pneumocística, complicação comum em imunodeprimidos. Uma meta análise de 13 coortes totalizando 10.395 soropositivos demonstrou uma associação consistente do rs2076101 com uma baixa carga viral em euro-americanos ($P=0,01$). Já em relação a suscetibilidade não foram encontradas diferenças entre soronegativos e soropositivos.

Há vários estudos propondo uma importante atividade anti-HIV da APOBEC3F (Linddament et al., 2004; Desimme et al., 2014; Krisko et al., 2016) e uma moderada influencia na infecção ao HIV-1 (Mulder et al., 2010), contudo há uma carência de pesquisas relacionando polimorfismos dessa proteína com a suscetibilidade ao HIV-1 e a progressão a aids. Um dos objetivos, inclusive do trabalho de An e colaboradores (2016) era trazer informações a respeito da variabilidade genética da A3F neste contexto. Por ser

parcialmente mais resistente ao Vif do que a A3G, é interessante compreender melhor a A3F e sua influência na infecção *in vivo* do HIV-1.

O nosso trabalho obteve o mesmo resultado, em relação a suscetibilidade, do de An e colaboradores (2006), contudo não encontramos associação com a progressão a aids. São necessários mais estudos em diferentes populações para compreendermos melhor a influencia desse SNP na progressão da doença. As outras isoformas das A3s, podem trazer respostas a tais resultados discrepantes, por exemplo, na infecção pelo HBV observa-se que a A3DE antagoniza as atividades antivirais da A3F e da A3G (com menor intensidade) e deste modo facilita a replicação do vírus (Bouzidi et al., 2016). Tais achados geram ainda mais questionamentos ficando claro que há muito a se desvendar sobre esse sistema de defesa intrínseco celular.

Nossos resultados em relação ao polimorfismo rs7117111 do gene *CUL5* demonstrou uma associação do genótipo GG com proteção a infecção pelo HIV-1, em indivíduos eurodescendentes. Nesse genótipo também se observou uma tendência em relação a progressão a aids, estando associado aos progressores rápidos.

Esse SNP é uma mutação sinônima numa região codificante do gene, na terceira posição do códon 75 (CAA > CAG), mantendo o aminoácido glutamina (Q). Essa alteração sinônima, mesmo não alterando a sequência de aminoácidos, traz significantes consequências na tradução da proteína, pelo fato de cada diferente códon necessitar de um tRNA diferente (Brule e Grayhack, 2017). Todas as implicações da troca de um códon sinônimo ainda não são totalmente esclarecidas. Algumas das consequências que essa alteração pode gerar são: a velocidade de produção da proteína, por diminuir a velocidade de alongamento do ribossomo; tRNA (específico para o códon) se encontrar em concentrações baixas; a estabilidade do mRNA, tornando-o menos estável e assim gerando menos proteínas; e a estrutura da própria proteína durante a formação da sua estrutura secundária e terciária (Brule e Grayhack, 2017).

An e colaboradores (2007) realizaram uma pesquisa com amostras de cinco coortes dos Estados Unidos e avaliaram 12 SNPs e haplótipos do *CUL5* em relação a suscetibilidade ao HIV-1 e progressão a aids. Neste estudo, não encontraram associação clara com nenhum SNP ou haplótipo, tanto em afro-americanos como em euro-americanos, e a suscetibilidade ao HIV-1. Já em relação a progressão foi encontrada uma associação dos haplótipos do cluster II (separado pelo estudo) que contém o alelo G (rs7117111) com

uma rápida queda de células CD4⁺ (RH=1,47 e p=0,009). No nosso estudo encontramos resultado limítrofes que apontavam uma relação do genótipo GG com progressores rápidos (modelo recessivo, genótipo GG, OR ajustado: 2,115, 95% IC 0,990-4,521, P=0,053).

Silva e colaboradores (2017) estudando uma população do Nordeste brasileiro identificaram que o haplótipo do *CUL5*, rs7103534-rs7117111 CG, estava em maior frequência em indivíduos soronegativos em relação aos soropositivos, sugerindo uma proteção ao risco de infecção ao HIV-1. Esse achado está em consonância com os resultados encontrados no presente estudo. Um ponto importante, contudo, a se destacar é que, em ambos os estudos o grupo controle foi formado por doadores de sangue, diferente do trabalho de An e colaboradores (2007) em que o grupo estudado foi de não infectados, porém altamente expostos e neste caso não foi encontrada relação com a suscetibilidade ao HIV-1.

As duas pesquisas citadas acima trouxeram, separadamente, dados que confirmaram nossos resultados em relação ao rs7117111, porém esses dados em uma primeira análise parecem ser contraditórios. O genótipo GG, ao mesmo tempo que parece estar relacionado a proteção a infecção ao HIV-1, está possivelmente envolvido na progressão rápida a aids. Esses achados, contudo, não necessariamente são contraditórios, mecanismos ainda não completamente elucidados podem estar envolvidos nesse processo. O Cul5 é uma proteína fundamental para a formação de um complexo, formado por outras proteínas como as Elo B/C, a CBF- β e RBx2 que com a proteína viral Vif inativa as APOBEC3 (Figura 8). Qualquer alteração em uma dessas proteínas envolvidas no complexo pode afetar o processo. Por exemplo, Vif é fosforilado em vários resíduos dos aminoácidos serinas e treoninas e entre essas, a serina 144 tem um importante papel na regulação da replicação do HIV-1. A fosforilação no aminoácido serina 144 regula negativamente a ligação do Vif a Elo C (Mehle et al., 2004). Mutações na própria Vif (H27A, M29A e Y30A), podem enfraquecer a interação entre a região N-terminal e o Cul5, também trazendo consequências negativas para a formação do complexo (Evans et al., 2014).

A região na qual se encontra o códon 75 do *CUL5* faz parte do domínio em que ocorre a ligação com a Vif (Evans et al., 2014). Na tentativa de entender os resultados encontrados no rs7117111 podemos sugerir que o genótipo GG não favorece a ligação com Vif, deste modo as A3G e A3F, principalmente, conseguem atuar inibindo o ciclo de vida

do HIV-1, num primeiro momento. Todavia as mutações induzidas pelas A3 podem provocar alterações na Vif e, possivelmente, restabelecer a ligação com o Cul5 assim, consequentemente inibindo as A3 e deste modo, ocorrer uma progressão rápida a aids.

Concluí-se que os SNPs estudados podem provocar alterações na infecção ao HIV-1 ou afetar a progressão a aids, porém na população estudada encontramos apenas uma influência de proteção ao HIV-1 em relação ao genótipo GG do Cul5 em indivíduos eurodescendentes. A epidemia do HIV não é homogênea em relação aos subtipos virais e somado a própria variabilidade genética entre as diferentes populações humanas se agrava a dificuldade de se identificar alterações isoladas no genoma com forte impacto na infecção pelo HIV. Além disso, esses achados devem ser interpretados com cautela para um grande grupo populacional. Contudo cada descoberta é importante para se compreender as estratégias tanto dos vírus de “atacar/contra-atacar” quanto das células de “se defender/contra-atacar” e assim gerar conhecimento que possa auxiliar no combate da epidemia no futuro.

5.1 Perspectivas

Com o objetivo de melhorar as análises desses importantes achados e consequentemente enriquecer a discussão sobre o assunto, pretende-se submetê-los a testes estatísticos mais robustos, como, por exemplo, a análise de redução dimensionada multifatorial. Com essa abordagem pode-se combinar diferentes SNPs e assim será possível analisá-los em conjunto frente a suscetibilidade ao HIV e a progressão a aids. Deste modo poderão ser feitas inferências sobre como diferentes alterações genéticas em diferentes genes de fatores de restrição estão se relacionando e influenciando os desfechos citados.

Da mesma forma, para analisar de maneira mais ampla os fatores de restrição, outro trabalho do nosso grupo de pesquisa analisou polimorfismos na APOBEC3G, importante proteína anti-HIV, na mesma população do presente trabalho. Assim, o curso natural será a união desses resultados para ampliar as abordagens estatísticas como a já citada. Além dos fatores de restrição outros trabalhos do grupo focando alterações genômicas que podem influenciar na susceptibilidade ao HIV e progressão a aids já foram realizados com

interessantes resultados sobre a suscetibilidade. Juntando-se esses inúmeros achados sobre alterações no genoma pode-se ter uma visão muito mais ampla sobre o papel da genética do hospedeiro frente a infecção ao HIV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S. E., de Medeiros, R. M., Junqueira, D. M., Gräf, T., Passaes, C. P., Bello, G., Morgado, M. G., & L. Guimarães, M. (2012). Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil. *Virol J*, 9, 306. doi:10.1186/1743-422X-9-306
- An, P., Duggal, P., Wang, L. H., O'Brien, S. J., Donfield, S., Goedert, J. J., Phair, J., Buchbinder, S., Kirk, G. D., & Winkler, C. A. (2007). Polymorphisms of CUL5 are associated with CD4+ T cell loss in HIV-1 infected individuals. *PLoS Genet*, 3(1), e19. doi:10.1371/journal.pgen.0030019
- An, P., Penugonda, S., Thorball, C. W., Bartha, I., Goedert, J. J., Donfield, S., Buchbinder, S., Binns-Roemer, E., Kirk, G. D., Zhang, W., Fellay, J., et al. (2016). Role of APOBEC3F Gene Variation in HIV-1 Disease Progression and Pneumocystis Pneumonia. *PLoS Genet*, 12(3), e1005921. doi:10.1371/journal.pgen.1005921
- An, P., & Winkler, C. A. (2010). Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet*, 26(3), 119-131. doi:10.1016/j.tig.2010.01.002
- Anokhin, V. V., Bakhteeva, L. B., Khasanova, G. R., Khaiboullina, S. F., Martynova, E. V., Tillett, R. L., Schlauch, K. A., Lombardi, V. C., & Rizvanov, A. A. (2016). Previously Unidentified Single Nucleotide Polymorphisms in HIV/AIDS Cases Associate with Clinical Parameters and Disease Progression. *Biomed Res Int*, 2016, 2742648. doi:10.1155/2016/2742648
- Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, 7, 96. doi:10.1186/1742-4690-7-96
- Ayres, J.R.C.M., Júnior I.F., Calazans, G.J., Filho, H.C.S. (2003). O conceito de vulnerabilidade e as práticas de saúde: novas perspectivas e desafios. Promoção da saúde concenitos, reflexões, tendências, pp. 117-129. Rio de Janeiro, BR.
- Battivelli, E., Migraine, J., Lecossier, D., Matsuoka, S., Perez-Bercoff, D., Saragosti, S., Clavel, F., & Hance, A. J. (2011). Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. *J Virol*, 85(15), 7828-7835. doi:10.1128/JVI.00648-11
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., Davidson, N. O., Cho, S. J., & Malim, M. H. (2004). Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol*, 14(15), 1392-1396. doi:10.1016/j.cub.2004.06.057
- Boletim Epidemiológico HIV/Aids. Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. Ministério da Saúde (2016). Brasília - DF.
- Blanco-Melo, D., Venkatesh, S., & Bieniasz, P. D. (2012). Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. *Immunity*, 37(3), 399-411. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.013

- Brady, J., & Kashanchi, F. (2005). Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology*, 2, 69. doi:10.1186/1742-4690-2-69
- Brule, C. E., & Grayhack, E. J. (2017). Synonymous Codons: Choose Wisely for Expression. *Trends Genet*, 33(4), 283-297. doi:10.1016/j.tig.2017.02.001
- Caffrey, M. (2011). HIV envelope: challenges and opportunities for development of entry inhibitors. *Trends Microbiol*, 19(4), 191-197. doi:10.1016/j.tim.2011.02.001
- Casado, C., Colombo, S., Rauch, A., Martínez, R., Günthard, H. F., Garcia, S., Rodríguez, C., Del Romero, J., Telenti, A., & López-Galíndez, C. (2010). Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One*, 5(6), e11079. doi:10.1371/journal.pone.0011079
- Chaipan, C., Smith, J. L., Hu, W. S., & Pathak, V. K. (2013). APOBEC3G restricts HIV-1 to a greater extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in human primary CD4+ T cells and macrophages. *J Virol*, 87(1), 444-453. doi:10.1128/JVI.00676-12
- Chang, R., Wong, G., Gold, J., & Armstrong, D. (1993). HIV-related emergencies: frequency, diagnoses, and outcome. *J Gen Intern Med*, 8(9), 465-469.
- Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, 267(5197), 483-489.
- Dang, Y., Wang, X., Esselman, W. J., & Zheng, Y. H. (2006). Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol*, 80(21), 10522-10533. doi:10.1128/JVI.01123-06
- Desimmie, B. A., Smith, J. L., Matsuo, H., Hu, W. S., & Pathak, V. K. (2017). Identification of a tripartite interaction between the N-terminus of HIV-1 Vif and CBF β that is critical for Vif function. *Retrovirology*, 14(1), 19. doi:10.1186/s12977-017-0346-5
- Didierlaurent, L., Racine, P. J., Houzet, L., Chamontin, C., Berkhout, B., & Mougél, M. (2011). Role of HIV-1 RNA and protein determinants for the selective packaging of spliced and unspliced viral RNA and host U6 and 7SL RNA in virus particles. *Nucleic Acids Res*, 39(20), 8915-8927. doi:10.1093/nar/gkr577
- Doehle, B. P., Schäfer, A., & Cullen, B. R. (2005). Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. *Virology*, 339(2), 281-288. doi:10.1016/j.virol.2005.06.005
- Dubé, M., Bego, M. G., Paquay, C., & Cohen, É. (2010). Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology*, 7, 114. doi:10.1186/1742-4690-7-114
- Evans, S. L., Schön, A., Gao, Q., Han, X., Zhou, X., Freire, E., & Yu, X. F. (2014). HIV-1 Vif N-terminal motif is required for recruitment of Cul5 to suppress APOBEC3. *Retrovirology*, 11, 4. doi:10.1186/1742-4690-11-4

- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligo, B., & Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, 46(1), 5-14. doi:10.4415/ANN_10_01_02
- Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., Tatem, A. J., Sousa, J. D., Arinaminpathy, N., Pèpin, J., et al (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, 346(6205), 56-61. doi:10.1126/science.1256739
- Fernandes, J., Jayaraman, B., & Frankel, A. (2012). The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA Biol*, 9(1), 6-11. doi:10.4161/rna.9.1.18178
- Fitzpatrick, T. B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*, 124(6), 869-871.
- Frankel, A. D., & Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, 67, 1-25. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.1
- Fribourgh, J. L., Nguyen, H. C., Wolfe, L. S., Dewitt, D. C., Zhang, W., Yu, X. F., Rhoades, E., & Xiong, Y. (2014). Core binding factor beta plays a critical role by facilitating the assembly of the Vif-cullin 5 E3 ubiquitin ligase. *J Virol*, 88(6), 3309-3319. doi:10.1128/JVI.03824-13
- Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., & Adachi, A. (2010). Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Rev Med Virol*, 20(2), 68-76. doi:10.1002/rmv.636
- Gillick, K., Pollpeter, D., Phalora, P., Kim, E. Y., Wolinsky, S. M., & Malim, M. H. (2013). Suppression of HIV-1 infection by APOBEC3 proteins in primary human CD4(+) T cells is associated with inhibition of processive reverse transcription as well as excessive cytidine deamination. *J Virol*, 87(3), 1508-1517. doi:10.1128/JVI.02587-12
- Gräf, T., Machado Fritsch, H., de Medeiros, R. M., Maletich Junqueira, D., Esteves de Matos Almeida, S., & Pinto, A. R. (2016). Comprehensive Characterization of HIV-1 Molecular Epidemiology and Demographic History in the Brazilian Region Most Heavily Affected by AIDS. *J Virol*, 90(18), 8160-8168. doi:10.1128/JVI.00363-16
- Gräf, T., & Pinto, A. R. (2013). The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology*, 435(1), 170-178. doi:10.1016/j.virol.2012.08.048
- Harris, R. S., & Liddament, M. T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol*, 4(11), 868-877. doi:10.1038/nri1489
- Jia, X., Zhao, Q., & Xiong, Y. (2015). HIV suppression by host restriction factors and viral immune evasion. *Curr Opin Struct Biol*, 31, 106-114. doi:10.1016/j.sbi.2015.04.004

- Jäger, S., Kim, D. Y., Hultquist, J. F., Shindo, K., LaRue, R. S., Kwon, E., Li, M., Anderson, B. D., Yen, L., & Stanley, D., et al (2011). Vif hijacks CBF- β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature*, *481*(7381), 371-375. doi:10.1038/nature10693
- Kim, D. Y. (2015). The assembly of Vif ubiquitin E3 ligase for APOBEC3 degradation. *Arch Pharm Res*, *38*(4), 435-445. doi:10.1007/s12272-014-0519-x
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Miyauchi, Y., Iwai, K., & Uchiyama, T. (2005). Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem*, *280*(19), 18573-18578. doi:10.1074/jbc.C500082200
- Krisko, J. F., Begum, N., Baker, C. E., Foster, J. L., & Garcia, J. V. (2016). APOBEC3G and APOBEC3F Act in Concert To Extinguish HIV-1 Replication. *J Virol*, *90*(9), 4681-4695. doi:10.1128/JVI.03275-15
- Laguette, N., Brégnard, C., Benichou, S., & Basmaciogullari, S. (2010). Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med*, *31*(5), 418-433. doi:10.1016/j.mam.2010.05.003
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, *19*(19), 5444.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., & Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*, *300*(5622), 1112. doi:10.1126/science.1083338
- Leite, T. C., Campos, D. P., Coelho, A. B., Teixeira, S. L., Veloso, V., Morgado, M. G., & Guimarães, M. L. (2017). Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *33*(1), 41-48. doi:10.1089/AID.2016.0126
- Levy, J. A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*, *57*(1), 183-289.
- Li, Q., Qiao, Y., Zhang, G., He, N., Zhang, X., Jia, X., Sun, H., Wang, C., & Xu, L. (2017). Association of single nucleotide polymorphisms of APOBEC3G with susceptibility to HIV-1 infection and disease progression among men engaging in homosexual activity in northern China. *Arch Virol*, *162*(1), 259-268. doi:10.1007/s00705-016-3080-8
- Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J., & Harris, R. S. (2004). APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol*, *14*(15), 1385-1391. doi:10.1016/j.cub.2004.06.050
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., & Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, *424*(6944), 99-103. doi:10.1038/nature01709

- Mehle, A., Goncalves, J., Santa-Marta, M., McPike, M., & Gabuzda, D. (2004). Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev*, *18*(23), 2861-2866. doi:10.1101/gad.1249904
- Morita, E., & Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *20*, 395-425. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.102350
- Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A., & Capon, D. J. (1985). Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*, *313*(6002), 450-458.
- Mulder, L. C., Ooms, M., Majdak, S., Smedresman, J., Linscheid, C., Harari, A., Kunz, A., & Simon, V. (2010). Moderate influence of human APOBEC3F on HIV-1 replication in primary lymphocytes. *J Virol*, *84*(18), 9613-9617. doi:10.1128/JVI.02630-09
- Nakayama, E. E., & Shioda, T. (2015). Impact of TRIM5 α in vivo. *AIDS*, *29*(14), 1733-1743. doi:10.1097/QAD.0000000000000812
- Nitta, T., Lee, S., Ha, D., Arias, M., Kozak, C. A., & Fan, H. (2012). Moloney murine leukemia virus glyco-gag facilitates xenotropic murine leukemia virus-related virus replication through human APOBEC3-independent mechanisms. *Retrovirology*, *9*, 58. doi:10.1186/1742-4690-9-58
- OhAinle, M., Kerns, J. A., Malik, H. S., & Emerman, M. (2006). Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. *J Virol*, *80*(8), 3853-3862. doi:10.1128/JVI.80.8.3853-3862.2006
- Okumura, F., Joo-Okumura, A., Nakatsukasa, K., & Kamura, T. (2016). The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases. *Cell Div*, *11*, 1. doi:10.1186/s13008-016-0016-3
- Olson, A. D., Guiguet, M., Zangerle, R., Gill, J., Perez-Hoyos, S., Lodi, S., Ghosn, J., Dorruci, M., Johnson, A., Sannes, M., et al. (2014). Evaluation of rapid progressors in HIV infection as an extreme phenotype. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *67*(1), 15-21. doi:10.1097/QAI.0000000000000240
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., & Yeager, M. (2011). Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature*, *469*(7330), 424-427. doi:10.1038/nature09640
- Postler, T. S., & Desrosiers, R. C. (2013). The tale of the long tail: the cytoplasmic domain of HIV-1 gp41. *J Virol*, *87*(1), 2-15. doi:10.1128/JVI.02053-12
- Price, H., Lacap, P., Tuff, J., Wachihhi, C., Kimani, J., Ball, T. B., Luo, M., & Plummer, F. A. (2010). A TRIM5 α exon 2 polymorphism is associated with protection from HIV-1 infection in the Pumwani sex worker cohort. *AIDS*, *24*(12), 1813-1821. doi:10.1097/QAD.0b013e32833b5256
- Rehwinkel, J. (2014). Mouse knockout models for HIV-1 restriction factors. *Cell Mol Life Sci*, *71*(19), 3749-3766. doi:10.1007/s00018-014-1646-8

- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., et al. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J*, 20(9), 2140-2151. doi:10.1093/emboj/20.9.2140
- Saleh, S., Vranckx, L., Gijssbers, R., Christ, F., & Debyser, Z. (2017). Insight into HIV-2 latency may disclose strategies for a cure for HIV-1 infection. *J Virus Erad*, 3(1), 7-14.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroullie, C., Cognaux, J., Forceille, C., et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382(6593), 722-725. doi:10.1038/382722a0
- Sasada, A., Takaori-Kondo, A., Shirakawa, K., Kobayashi, M., Abudu, A., Hishizawa, M., Imada, K., Tanaka, Y., & Uchiyama, T. (2005). APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology*, 2, 32. doi:10.1186/1742-4690-2-32
- Sauter, D., Schindler, M., Specht, A., Landford, W. N., Münch, J., Kim, K. A., Votteler, J., Schubert, U., Bibollet-Ruche, F., Keele, B. F., et al. (2009). Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe*, 6(5), 409-421. doi:10.1016/j.chom.2009.10.004
- Schwartz, S. A., & Nair, M. P. (1999). Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6(3), 295-305.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418(6898), 646-650. doi:10.1038/nature00939
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., & Malim, M. H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*, 9(11), 1404-1407. doi:10.1038/nm945
- Silva, R. C., Coelho, A. V., Arraes, L. C., Brandão, L. A., Crovella, S., & Guimarães, R. L. (2016). TRIM5 gene polymorphisms in HIV-1-infected patients and healthy controls from Northeastern Brazil. *Immunol Res*, 64(5-6), 1237-1242. doi:10.1007/s12026-016-8810-1
- Silva, R. C., Coelho, A. V., Moura, R. R., Arraes, L. C., Brandão, L. A., Guimarães, R. L., & Crovella, S. (2017). CUL5 and APOBEC3G polymorphisms are partially implicated in HIV-1 infection and antiretroviral therapy in a Brazilian population. *Curr HIV Res*. doi:10.2174/1570162X15666170315114900
- Simon, D., Béria, J. U., Tietzmann, D. C., Carli, R., Stein, A. T., & Lunge, V. R. (2010). [Prevalence of HIV-1 subtypes in patients of an urban center in Southern Brazil]. *Rev Saude Publica*, 44(6), 1094-1101.

- Speelmon, E. C., Livingston-Rosanoff, D., Li, S. S., Vu, Q., Bui, J., Geraghty, D. E., Zhao, L., & McElrath, M. J. (2006). Genetic association of the antiviral restriction factor TRIM5alpha with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, *80*(5), 2463-2471. doi:10.1128/JVI.80.5.2463-2471.2006
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W., & Greene, W. C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*, *12*(3), 591-601.
- Strebel, K. (2013). HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr Opin Virol*, *3*(6), 692-699. doi:10.1016/j.coviro.2013.08.004
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P., & Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, *427*(6977), 848-853. doi:10.1038/nature02343
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D. J., Sundquist, W. I., & Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(14), 5514-5519. doi:10.1073/pnas.0509996103
- Tareen, S. U., & Emerman, M. (2011). Human Trim5 α has additional activities that are uncoupled from retroviral capsid recognition. *Virology*, *409*(1), 113-120. doi:10.1016/j.virol.2010.09.018
- Turelli, P., Mangeat, B., Jost, S., Vianin, S., & Trono, D. (2004). Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science*, *303*(5665), 1829. doi:10.1126/science.1092066
- Uchil, P. D., & Mothes, W. (2009). HIV Entry Revisited. *Cell*, *137*(3), 402-404. doi:10.1016/j.cell.2009.04.033
- UNAIDS/WHO: HIV Progress Report 2016. (Acessado em abril de 2016) <http://www.who.int/hiv/data/en/>
- Valverde-Villegas, J. M., Matte, M. C., de Medeiros, R. M., & Chies, J. A. (2015). New Insights about Treg and Th17 Cells in HIV Infection and Disease Progression. *J Immunol Res*, *2015*, 647916. doi:10.1155/2015/647916
- Vidal, N., Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., Sema, H., Tshimanga, K., Bongo, B., & Delaporte, E. (2000). Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol*, *74*(22), 10498-10507.
- Wang, H., Lv, G., Zhou, X., Li, Z., Liu, X., Yu, X. F., & Zhang, W. (2014). Requirement of HIV-1 Vif C-terminus for Vif-CBF- β interaction and assembly of CUL5-containing E3 ligase. *BMC Microbiol*, *14*, 290. doi:10.1186/s12866-014-0290-7

- Warrilow, D., Tachedjian, G., & Harrich, D. (2009). Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together. *Rev Med Virol*, *19*(6), 324-337. doi:10.1002/rmv.627
- Wiegand, H. L., Doehle, B. P., Bogerd, H. P., & Cullen, B. R. (2004). A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J*, *23*(12), 2451-2458. doi:10.1038/sj.emboj.7600246
- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J. J., Kabongo, J. M., Kelangayi, R. M., Van Marck, E., et al. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, *455*(7213), 661-664. doi:10.1038/nature07390
- Xue, B., Mizianty, M. J., Kurgan, L., & Uversky, V. N. (2012). Protein intrinsic disorder as a flexible armor and a weapon of HIV-1. *Cell Mol Life Sci*, *69*(8), 1211-1259. doi:10.1007/s00018-011-0859-3
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., & Yu, X. F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, *302*(5647), 1056-1060. doi:10.1126/science.1089591
- Zhao, G., Perilla, J. R., Yufenyuy, E. L., Meng, X., Chen, B., Ning, J., Ahn, J., Gronenborn, A. M., Schulten, K., Aiken, C., et al. (2013). Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature*, *497*(7451), 643-646. doi:10.1038/nature12162
- Zheng, Y. H., Jeang, K. T., & Tokunaga, K. (2012). Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology*, *9*, 112. doi:10.1186/1742-4690-9-112
- Zhu, C., Gao, W., Zhao, K., Qin, X., Zhang, Y., Peng, X., Zhang, L., Dong, Y., Zhang, W., Li, P., et al. (2013). Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nat Commun*, *4*, 2722. doi:10.1038/ncomms3722

ANEXO A – Questionário para Coleta de Dados

QUESTIONÁRIO

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

Código de identificação do paciente no projeto: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Sexo: () Masculino () Feminino

Município de Residência: _____

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

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

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

Escolaridade: _____

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

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

Possível forma de Transmissão:

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

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

Gestante: () Sim () Não

Fumo: () Sim () Não

Uso de Álcool: () Sim () Não

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

Comorbidades e Coinfeccções:

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

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

Viajou para o exterior: () Sim () Não

Continentes do Exterior:

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

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

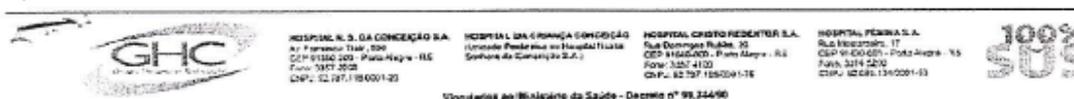
Teve contato sexual/drogas injetáveis com estrangeiros no Brasil:

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

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

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

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Nossa Senhora da Conceição de Porto Alegre/RS (GHC)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

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

Projeto: 10-213

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

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

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

Documentação: Aprovados
Aspectos Metodológicos: Aprovados
Aspectos Éticos: Aprovados

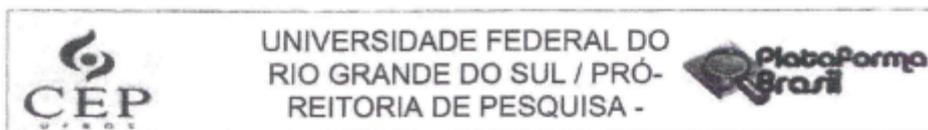
Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

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


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

Porto Alegre, 30 de novembro de 2010.

ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Abordagem imunogenética de receptores de quimiocinas e sua correlação com a diversidade do gene Env do HIV-1: Fatores que influenciam a progressão para AIDS

Pesquisador: José Artur Bogo Chies

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 30491714.0.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 727.085

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa de doutorado a ser realizado no Laboratório de Imunogenética da UFRGS, tendo como centros coparticipantes o Hospital Nossa Senhora da Conceição/Grupo Hospitalar Conceição (HNSC/GHC) e a Fundação Estadual de Pesquisa em Saúde/Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FEPPS-CDCT). O projeto de pesquisa foi avaliado pelo CONEP e, em anexo, se encontra carta resposta.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da pesquisa é "Descrever a frequência e caracterizar o perfil de expressão imunológico e genético de quatro subpopulações de células T CD4+: CCR4+CCR6+CXCR3-, CCR4+CCR6-CXCR3-, CXCR3+CCR6-CCR4- e CXCR3+CCR6+CCR4- nos progressores rápidos e lentos. Assim também analisar polimorfismos genéticos de CCR3, CCR6 e CXCR6 junto com a diversidade genética do gene viral Env na progressão à AIDS". Os objetivos específicos são: - Caracterizar e comparar a frequência das subpopulações CCR4+CCR6+CXCR3-, CCR4+CCR6-CXCR3-, CXCR3+CCR6-CCR4- e CXCR3+CCR6+CCR4- em pacientes com progressão rápida, lenta e controles saudáveis. - Analisar o padrão qualitativo e quantitativo de citocinas TH1, TH2, TH17 e TH1TH17 no plasma e correlacionar com a frequência das subpopulações de T CD4+ dos indivíduos progressores e comparar com controles saudáveis. - Estudar a frequência de variantes

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 727.085

polimórficas dos genes que codificam os receptores CCR6, CCR4, CXCR3, CCR3, CXCR6 e CCR8, nos grupos de pacientes comparados com controles. - Identificar polimorfismos no gene Env e analisar essa diversidade junto com a combinação das variantes nos receptores de quimiocinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O texto dos riscos e dos benefícios da pesquisa está adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em atendimento à solicitação, os pesquisadores informaram mais detalhadamente os critérios de inclusão e exclusão de pacientes, assim como o plano de recrutamento. Em atendimento à solicitação, os pesquisadores anexaram TCLE das pesquisas anteriormente aprovadas, uma vez que a pesquisa atual utilizará amostras das pesquisas em andamento. Ainda, os pesquisadores informaram que "Nesta oportunidade esclarecemos que esta abordagem de variantes de genes (receptores de quimiocinas) do sistema imune está sendo realizada no contexto do projeto anteriormente aprovado que não foi inteiramente concluído, sendo incluído no atual trabalho. O TCLE (anexo I) e os pareceres (anexo II) de aprovação do projeto anterior do nosso grupo informam que a utilização das amostras desses pacientes será para análises de variações genéticas referentes ao sistema imune. O atual projeto, que constituirá uma tese de doutoramento junto ao PPG Genética e Biologia Molecular da UFRGS, está sendo submetido com o intuito de permitir a realização de uma segunda coleta de pacientes com um perfil clínico já conhecido e que já foram cadastrados e coletados no projeto anterior para fins de análises genéticas. Assim, o intuito é dar continuidade às nossas pesquisas, dentro da mesma coorte de pacientes, incluindo, portanto dados clínicos e de seguimento, além de dados de citometria e perfil de citocinas em pacientes cujo DNA encontra-se em genotipagem". Em atendimento à solicitação "esclarecimentos quanto a se o pesquisador irá comparar os dados obtidos no estudo anterior com os dados desses novos participantes ou se os mesmos participantes serão contatados para fazer nova coleta de sangue. Além disso, o grupo controle da pesquisa anterior é referente a um estudo de Lupus. Sendo assim, solicitam-se esclarecimentos quanto a se o pesquisador pretende comparar o grupo controle com os dados de pacientes portadores desta referida doença", os pesquisadores responderam: "um subgrupo dos pacientes que participaram de um estudo anterior envolvendo fatores genéticos será convidado a participar desta nova etapa da pesquisa e, caso concorde, será feita coleta de sangue para avaliação de dados laboratoriais (citometria e perfil de subpopulações celulares do sistema imune). Quanto ao grupo controle, os resultados presentes em nosso banco de dados representam indivíduos saudáveis e estes dados podem ser comparados (por já estarem devidamente publicados) com diferentes patologias. A idéia é simplesmente comparar dados disponíveis de

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-080
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: ofica@propesq.ufrgs.br



indivíduos saudáveis com pacientes, os indivíduos saudáveis representando a população geral, pareados com os casos de acordo a idade, sexo e etnia em este novo estudo". Em atendimento à solicitação, os pesquisadores substituíram nos TCLEs paciente e controle a palavra "cópia" por "via", e incluíram a informação de garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Ainda, no TCLE paciente foi incluída a seguinte informação: "A sua participação no presente projeto envolve uma coleta de sangue, onde serão avaliados fatores imunológicos, para que possamos ter uma maior compreensão do perfil imunológico das pessoas HIV+. Independente de sua participação no estudo, o tratamento que você recebe não será alterado e, você poderá retirar sua autorização a qualquer momento, apenas comunicando sua nova decisão a um participante do grupo de pesquisa". No TCLE controle houve inclusão da informação "A sua participação no presente projeto envolve uma coleta de sangue, onde serão avaliados fatores imunológicos, para que possamos ter uma maior compreensão do perfil imunológico de pessoas saudáveis HIV negativos. Você poderá retirar sua autorização a qualquer momento, apenas comunicando sua nova decisão a um participante do grupo de pesquisa". No projeto de pesquisa foi substituída "Resolução 196/1996" por "Resolução 466/2012". Em atendimento à solicitação "solicitam-se esclarecimentos sobre quais dados individuais obtidos foram ou serão utilizados, bem como solicita-se o envio do TCLE prévio que contenha esta autorização ou um novo TCLE a ser submetido", os pesquisadores responderam: "Novamente esclarecemos que esta abordagem de variantes de genes (receptores de quimiocinas) do sistema imune está sendo realizada no contexto de projeto anteriormente aprovado e ainda não concluído. O TCLE (anexo I) e os pareceres (anexo II) de aprovação do projeto anterior do nosso grupo informam que a utilização das amostras desses pacientes será para análises de variações genéticas referentes ao sistema imune". Em atendimento à solicitação "solicita-se que a garantia de ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo seja apresentada de modo claro e afirmativo, assim como garantia de ressarcimento ao acompanhante, caso necessário", os pesquisadores responderam: "As entrevistas e coletas ocorrerão durante consultas agendadas pelos médicos para o acompanhamento dos pacientes, não sendo realizadas consultas extras ou vinculadas unicamente às pesquisas. Não estará ocorrendo chamamento específico para a pesquisa, os pacientes serão convidados a participar do estudo durante suas consultas de rotina. Assim, não é previsto pagamento de transporte para aqueles que concordarem, voluntariamente em participar do estudo até mesmo pelo fato que isto poderia ser interpretado como uma forma de "pressão" para a participação". Em atendimento à solicitação "solicita-se que a garantia de ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo seja apresentada de modo claro e afirmativo, assim como garantia de

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farrowilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: eéca@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 727.085

ressarcimento ao acompanhante, caso necessário”, os pesquisadores responderam: “Será feito chamamento de indivíduos HIV- no Campus da Universidade Federal do Rio Grande do Sul através de cartazes divulgando o projeto. Assim, apenas voluntários já presentes no Campus serão incluídos, o que dispensa o ressarcimento de despesas decorrentes de transporte (os voluntários não terão gastos adicionais com deslocamento)”.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios estavam anexados à documentação do projeto de pesquisa. Os TCLEs, como informado no item anterior, tiveram algumas adequações, como substituição de palavras e inclusão de informação mais detalhada (ver item anterior desse parecer para melhor detalhamento).

Recomendações:

Recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa quanto aos aspectos éticos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa está adequado quanto aos aspectos éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_262964.pdf	06/07/2015 21:07:47		Aceito
Outros	Resposta ao parecer_CONEP Julho 2015.doc	06/07/2015 20:32:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO PLATAFORMA BRASIL versão em Julho 2015.pdf	06/07/2015 20:23:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo viii_TCLE_controles.doc	06/07/2015 20:22:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo v_TCLE_pacientes.doc	06/07/2015 20:22:39		Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	05/03/2015		Aceito

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farróupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 727.085

Básicas do Projeto	ETO_262964.pdf	19:10:09		Aceito
Outros	carta emenda assinada para CONEP marco 2015.pdf	05/03/2015 18:36:17		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_262964.pdf	14/07/2014 19:41:26		Aceito
Outros	Carta Projeto CEP 2014.pdf	14/07/2014 19:27:26		Aceito
Outros	Anexo vii_Cartaz_Coleta de controles.docx	14/07/2014 19:04:36		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_262964.pdf	25/05/2014 19:07:09		Aceito
Parecer Anterior	Pareceres_controles 2012.pdf	25/05/2014 18:56:07		Aceito
Parecer Anterior	Pareceres_HIV 2010.pdf	25/05/2014 18:55:33		Aceito
Outros	Carta Dra. Sabrina CDCT-FEPPS 2014 assinada.pdf	25/05/2014 18:54:34		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_262964.pdf	17/04/2014 14:50:45		Aceito
Outros	Parecer COMPESQ.docx	17/04/2014 14:19:24		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto assinada.pdf	17/04/2014 13:39:15		Aceito
Outros	Carta Dr. Breno GHC 2013 assinada.pdf	22/12/2013 19:55:51		Aceito

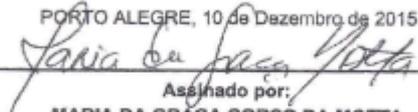
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 10 de Dezembro de 2015


Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-080
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefons: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4065 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO D – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde



FEPPS

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

Av Ipiranga 5400, Prédio Administrativo

CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS

e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br



AVALIAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
2º PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO
13/2010 – CEP-FEPPS/RS – 12/2010 PADCT

IDENTIFICAÇÃO: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PACIENTES INFECTADOS COM HIV-1.

I)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sabrina Esteves de Matos Almeida

CURRÍCULO LATTES DO PESQUISADOR : Adequado

GERENTE OU ORIENTADOR: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

INSTITUIÇÃO DE ORIGEM: CDCT/FEPPS.

LOCAL DE EXECUÇÃO: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

ÁREA TEMÁTICA: Diagnóstico e Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

PATROCINADOR: PADCT/FEPPS

DATA /ENTRADA CEP: 25/08/2010.

DATA /APROVAÇÃO CEP: 27/10 / 2010

II) AVALIAÇÃO DOS DOCUMENTOS E DA FOLHA DE ROSTO:

Termo de Compromisso está de acordo.

Folha de Rosto contém a assinatura do Projeto como Pesquisador Responsável, de acordo.

III) CARACTERIZAÇÃO DO TEMA E JUSTIFICATIVA: Este projeto de pesquisa pretende avaliar, utilizando técnicas de biologia molecular, os polimorfismos humanos em genes do sistema imunológico (IL-2, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ e CCR5) em pacientes com diferentes progressões para AIDS.

Os resultados obtidos nesse projeto poderão proporcionar um maior entendimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos nessa infecção, auxiliando na identificação, acompanhamento e tratamento adequado para os pacientes soropositivo os quais apresentam progressões diferenciadas à AIDS. Além disso, pode propiciar novos estudos que tenham como objetivo o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e de vacinas.

IV) OBJETIVOS PRINCIPAL E ESPECÍFICOS: Este projeto tem como objetivo avaliar os polimorfismos de genes do sistema imunológico (IL-2, IL-10, IL-12, CCR5, TNF- α e IFN- γ) que estão envolvidos na resposta imune contra o HIV e sua possível associação com a progressão da doença em pacientes soropositivos de Porto Alegre, RS.

Objetivos específicos:



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

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



* Verificar a frequência de cada um dos polimorfismos em diferentes grupos (progressão lenta, progressão normal e progressão rápida) de indivíduos infectados pelo HIV da cidade de Porto Alegre, RS;

* Verificar a possível associação entre os genótipos dos diferentes polimorfismos estudados com os tipos de progressão da doença.

V) METODOLOGIA:

a) AMOSTRA: Foram adequados

b) CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO:

Todos deverão ser maiores de 18 anos de idade, portadores de HIV, aceitar participar da pesquisa, assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) e concordar em doar amostra sanguínea para extração de DNA. De acordo.

c) MÉTODOS ESTATÍSTICOS:

Há menção quanto , através da contagem dos genótipos, e a concordância das frequências genotípicas avaliadas através do equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o teste qui-quadrado (χ^2).

Todas as análises estatísticas serão realizadas no programa SPSS v.16.0.

De acordo

d) ADEQUAÇÃO AOS OBJETIVOS:

A Metodologia está de acordo com os objetivos propostos, os parâmetros da PCR Convencional, da PCR em Tempo Real, e como será feita a análise dos resultados do equipamento, foram adequados.

e) FORMA DE DESCARTE E/OU ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA:

Todo material biológico utilizado neste projeto (sangue periférico), assim como todos os demais materiais que entrarem em contato com o sangue (ponteiras e microtubos, por exemplo) serão descartados em locais apropriados, autoclavados e posteriormente recolhidos pela empresa *Ambientus*[®], a qual dará um destino adequado para esses resíduos. De acordo.

VI) EXEQUIBILIDADE DO PROJETO:

a) ORÇAMENTO:

O orçamento proposto está centrado na aquisição do material e aplicação da metodologia proposta e os objetivos do Projeto.

b) CRONOGRAMA:

O cronograma enfatiza a execução dos objetivos de forma exequível e objetiva.

VII) RELEVÂNCIA DO PROJETO: Conforme arrolado em sua Introdução e seus Objetivos o Projeto pretende avaliar, utilizando técnicas de biologia molecular, os polimorfismos humanos em genes do sistema em pacientes com diferentes progressões para AIDS.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

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



VIII) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: Deixa clara a necessidade do respectivo "Termo de Livre Consentimento e Esclarecimento", o qual foi adequado.

IX) COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Somos favoráveis à aprovação deste Projeto, Trata-se de tema com grande impactação para saúde pública no RS e no nosso município.

Pode-se inferir que contribui com metodologias aplicáveis em outras regiões do Brasil para acometidas de SIDA.

X) PARECER DO CEP/FEPPS: Aprovado

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

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

Porto Alegre, 27 de setembro de 2010.


Maria da Graça Boucinha Marques
Coordenadora CEP-FEPPS/RS

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

PESQUISADORES: Rúbia Marília de Medeiros¹⁻², Maria Cristina Cotta Mattei¹⁻², Breno Riegel Santos⁶, Sabrina Esteves de Matos Almeida¹, José Artur Bogo Chies²⁻⁴.

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

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

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

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

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

Quais são os seus direitos? Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo só poderão ser usados para fins científicos, e você não será identificado por nome. Sua participação no estudo é voluntária, caso você decida não participar, isto não afetará no tratamento normal que você tem direito.

Nome do Voluntário: _____

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

Pesquisador: _____ Assinatura do pesquisador: _____

Entrevistador: _____ Assinatura do Entrevistador: _____

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

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

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

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

Sim () Não ()

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

Sim () Não ()

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

Sim () Não ()

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

Sim () Não ()

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

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

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

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

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

Sim () Não ()

Nome do Voluntário: _____

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

Pesquisador: _____ Assinatura do pesquisador: _____

Entrevistador: _____ Assinatura do Entrevistador: _____

Município: _____ Data: ____/____/____

