

ALBERTO CARDOSO MARTINS LIMA

**POLIMORFISMO DOS GENES *HLA* DE CLASSE I EM  
PACIENTES HIV POSITIVOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS -  
UFPR, DE CURITIBA, ESTADO DO PARANÁ**

CURITIBA  
2012

ALBERTO CARDOSO MARTINS LIMA

**POLIMORFISMO DOS GENES *HLA* DE CLASSE I EM  
PACIENTES HIV POSITIVOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS -  
UFPR, DE CURITIBA, ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara José Taborda de Messias-Reason

CURITIBA  
2012

Lima, Alberto Cardoso Martins

Polimorfismo dos genes HLA de classe I em pacientes HIV positivos do Hospital de Clínicas de Curitiba, Estado do Paraná / Alberto Cardoso Martins Lima – Curitiba, 2012.

86 f.: il. (color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2012.

Inclui bibliografia

1. Antígenos HLA. 2. Complexo principal de Histocompatibilidade. 3. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 4. HIV. 5. Reação em cadeia da Polimerase. I. Messias-Reason, Iara José Taborda de. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.979 2

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ALBERTO CARDOSO MARTINS DE LIMA**

**Título: POLIMORFISMOS DOS GENES HLA DE CLASSE I EM PACIENTES HIV POSITIVOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR, DE CURITIBA, ESTADO DO PARANÁ**


Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Profª. Drª. Iara José de Messias Reason  
Orientadora



Profª. Drª. Danielle Malheiros Ferreira  
Universidade Positivo



Profª. Drª. Sônia Mara Raboni  
Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de junho de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Iara J. T. Messias-Reason, pela orientação, confiança e paciência, fundamentais em todos os momentos deste estudo.

À Dra. Angélica B. W. Boldt pela ajuda imprescindível nas análises e interpretação dos dados da pesquisa.

Ao Dr. Renato Nisihara, pelas contribuições e sugestões em cada etapa deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Imunopatologia Molecular, grandes incentivadores na realização deste estudo: Prof<sup>a</sup> Dra. Shirley Utiyama, Valmir Mocelin, Ery Pedro, Sandra Catarino, Fádua Queiroz, Janir e Marcos.

Aos estudantes de iniciação científica, mestrado e doutorado do Laboratório de Imunopatologia Molecular, que me ajudaram, direta e indiretamente, na realização da minha dissertação, especialmente às minhas amigas Paola Rosa Luz, Caroline Grisbach e Regina Tizzot.

À Dr<sup>a</sup>. Noemi Farah Pereira e a todos os queridos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR, pelo apoio, estímulo e compreensão, em especial à Luciana Nasser Dornelles, Joselito Getz e Bruno Zagonel.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Nunes Lima pela orientação e competência na análise estatística dos dados da pesquisa.

À minha família, especialmente, por todo carinho, incentivo e paciência, sem os quais esse estudo nunca teria se concretizado.

## RESUMO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é considerada um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, afetando cerca de 40 milhões de pessoas. O estágio final da infecção pelo HIV, conhecido como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), está associado com grande morbidade e mortalidade. Vários genes humanos têm sido apontados como genes de suscetibilidade ou proteção na infecção pelo HIV e progressão para AIDS, com destaque para os genes do sistema *HLA*. Os genes *HLA* estão localizados no braço curto do cromossomo 6, sendo o conjunto de genes mais polimórficos do genoma humano. Inúmeros relatos indicam que os genes do *HLA* de classe I (-A, -B e -C) apresentam associações significativas com o controle da infecção pelo HIV e progressão para AIDS. Neste estudo foi realizada a tipificação *HLA* dos genes de classe I por PCR-SSO LABType, em 286 pacientes HIV positivos, que foram classificados em dois grupos, AIDS (n=183) e NÃO AIDS (n=103), segundo critério do CDC. Os dados de manifestação de doenças oportunistas, início da terapia antirretroviral, carga viral e contagens de CD4<sup>+</sup> foram obtidas através da análise retrospectiva de prontuários. As frequências alélicas, haplotípicas e as taxas de homozigose foram obtidas, e análise multivariada por regressão logística foi realizada para verificar a existência de associações de proteção ou suscetibilidade entre os genes *HLA* de classe I e progressão para AIDS. Foi verificado que os três *loci* estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi observada associação entre homozigose com a modulação da carga viral, contagem de CD4<sup>+</sup> e progressão para AIDS. Não foi observada associação com *HLA-A*. Para o *HLA-B*, foi observada associação do *B\*27* (OR=0,36; p=0,05) e *B\*51* (OR=2,95; p<0.01) entre os grupos AIDS e NÃO AIDS. Em relação ao *HLA-C*, a comparação entre os grupos AIDS e NÃO AIDS apresentou associação com *C\*02* (OR=0,44; p=0,03), *C\*04* (OR=0,58; p=0,03) e *C\*14* (OR=4,35; p=0,03). Após análise multivariada por regressão logística, foi verificada existência de associação de suscetibilidade para AIDS para *B\*51* (OR=3,1; p<0,01) e associação de proteção para *B\*27* (OR=0,3; p=0,03), *C\*02* (OR=0,3; p<0,01) e *C\*04* (OR=0,5; p=0,01). Foi observado que a presença do grupo alélico *B\*51* modulou de forma negativa a contagem de CD4<sup>+</sup> (p<0,01), enquanto a presença do grupo alélico *C\*04* modulou positivamente a contagem de CD4<sup>+</sup> (p=0,04), corroborando os achados de associação encontrados. O presente estudo corrobora recentes estudos da literatura, sobre novas associações dos genes *HLA* de classe I com a infecção pelo HIV e progressão para AIDS, e fornece informação, até agora inédita, sobre as associações do *HLA* com HIV numa amostra da população brasileira de origem européia.

Palavras-chave: HIV, AIDS, MHC, HLA Classe I, PCR-SSO, Polimorfismo, Brasil

## ABSTRACT

The infection of human immunodeficiency virus (HIV) is considered a major public health problem, affecting about 40 million people. The final stage of HIV infection, known as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), is associated with high morbidity and mortality. Several human genes have been identified as genes of susceptibility or protection in HIV infection and progression to AIDS, with emphasis on the genes of the *HLA* system. The *HLA* genes are located on the short arm of chromosome 6, and are the most polymorphic genes of human genome. Numerous reports indicate that the genes of the *HLA* class I (*-A*, *-B* and *-C*) showed significant associations with HIV infection's control and progression to AIDS. In this study, *HLA* class I genes typing by PCR-SSO LABType was performed in 286 HIV-positive patients who were classified into two groups, AIDS (n = 183) and NO AIDS (n = 103), according the CDC criteria. Data on opportunistic diseases, antiretroviral therapy, viral load and CD4 counts were obtained by retrospective analysis of medical records. Allele and haplotype frequencies, and homozygosity rates were obtained, and multivariate logistic regression was performed to verify the existence of protection or susceptibility associations between *HLA* class I genes and progression to AIDS. The three loci studied were in Hardy-Weinberg equilibrium. There was no association between *HLA* homozygosity with viral load modulation, CD4<sup>+</sup> count and progression to AIDS. There was no association with *HLA-A*. There was an association of *B\*27* (OR= 0.36, p=0.05) and *B\*51* (OR = 2.95, p <0.01) with AIDS. relation to *HLA-C*, an association with *C\*02* (OR=0.44, p=0.03), *C\*04* (OR=0.58, p=0.03) and *C\*14* (OR=4.35, p=0.03) was observed with AIDS. After multivariate logistic regression, there was evidence of susceptibility association for *B \* 51* (OR=3.1, p <0.01) and protection association for *B\* 27* (OR=0.3, p=0.03), *C\*02* (OR=0.3, p<0.01) and *C\*04* (OR=0.5, p=0.01). It was observed that the presence of *B \* 51* allelic group negatively modulates the CD4<sup>+</sup> cell count (p <0.01), while the presence of *C\*04* allelic group modulates positively the CD4<sup>+</sup> cell count (p=0.04). This study supports recent studies in the literature, showing new *HLA* class I genes associations with HIV infection and progression to AIDS, and provides novel information, about associations between HLA and HIV in a Brazilian population of European descendents.

Keywords: HIV, AIDS, MHC, HLA Class I, PCR-SSO, Polymorphism, Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO HIV .....	20
FIGURA 2 - EVOLUÇÃO CLÍNICA DA INFECÇÃO PELO HIV .....	21
FIGURA 3 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV SEGUNDO PORTARIA SVS/MS Nº 151 DE 2009 .....	25
FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO <i>MHC</i> .....	29
FIGURA 5 - PADRÃO DE HERANÇA DOS HAPLÓTIPOS <i>HLA</i> .....	30
FIGURA 6 - GRAU DE POLIMORFISMO GÊNICO DO SISTEMA <i>HLA</i> .....	31
FIGURA 7 - NOMENCLATURA DO SISTEMA <i>HLA</i> .....	33
FIGURA 8 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA <i>HLA</i> DE CLASSE I .....	34
FIGURA 9 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA <i>HLA</i> DE CLASSE II .....	35
FIGURA 10 - TONALIDADES DE FLUORESCÊNCIA DAS MICROESFERAS DO KIT LABTYPE PCR-SSO .....	44
FIGURA 11 - AÇÃO DOS LASERS NO LABSCAN100™ DURANTE A REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO NA PCR-SSO .....	45
FIGURA 12 - PRINCÍPIO DA TIPIFICAÇÃO <i>HLA</i> POR PCR-SSO .....	45
FIGURA 13 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA TIPIFICAÇÃO <i>HLA</i> POR PCR-SSO .....	47
FIGURA 14 - SOFTWARE <i>HLA FUSION</i> PARA ANÁLISE DA TIPIFICAÇÃO <i>HLA</i> POR PCR-SSO .....	48



## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA NOS PACIENTES HIV+.....	51
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O ANO DE DIAGNÓSTICO NOS PACIENTES HIV+.....	52
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O GRUPO DE RISCO NOS PACIENTES HIV+.....	53
GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O GRUPO DE RISCO NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS .....	53
GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O SEXO NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS .....	54
GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS .....	55
GRÁFICO 7 - CARGA VIRAL NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS.....	56
GRÁFICO 8 - CONTAGEM DE CD4 <sup>+</sup> NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS.....	57

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DOENÇAS DEFINIDORAS DE AIDS SEGUNDO CRITÉRIO DO CDC .....	23
TABELA 2 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DA TIPIFICAÇÃO <i>HLA</i> POR PCR-SSO .....	46
TABELA 3 - MEDIANA E IC 95% DA CONTAGEM DE CD4 <sup>+</sup> E CARGA VIRAL NOS PACIENTES HIV+.....	56
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE DOENÇAS OPORTUNISTAS NO GRUPO AIDS .....	58
TABELA 5 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG POR <i>LOCUS</i> NO GRUPO AIDS .....	59
TABELA 6 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG POR <i>LOCUS</i> NO GRUPO NÃO AIDS.....	59
TABELA 7 - TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS PARA <i>HLA DE CLASSE I</i> .....	60
TABELA 8 - CD4 <sup>+</sup> , CV, DOENÇAS OPORTUNISTAS E TARV DE ACORDO COM A HOMOZIGOSE / HETEROZIGOSE PARA <i>HLA-A, -B E -C</i> NOS PACIENTES HIV+.....	61
TABELA 9 - CD4 <sup>+</sup> , CV E DOENÇAS OPORTUNISTAS DE ACORDO COM A HOMOZIGOSE / HETEROZIGOSE PARA <i>HLA-A, -B E -C</i> NO GRUPO AIDS.....	62
TABELA 10 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-A</i> NOS PACIENTES HIV+ .....	63
TABELA 11 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-B</i> NOS PACIENTES HIV+ .....	64
TABELA 12 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-C</i> NOS PACIENTES HIV+ .....	65
TABELA 13 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS PACIENTES HIV+ .....	66
TABELA 14 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-A</i> NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS.....	67
TABELA 15 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-B</i> NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS.....	69
TABELA 16 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-C</i> NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS.....	71
TABELA 17 - REGRESSÃO LOGÍSTICA PARA AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-A, B E - C</i> (GRUPOS AIDS E NÃO AIDS) .....	74

TABELA 18 - MODULAÇÃO DA CONTAGEM DE CD4 <sup>+</sup> (MEDIANA E IC 95%) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS GRUPOS ALÉLICOS <i>B*51, C*04 E</i> <i>C*02</i> .....	75
---	----

## LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CMIA	Ensaio Imunológico Quimioluminescente Magnético
CV	Carga Viral
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DL	Desequilíbrio de Ligação
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EC	Controlador de Elite
ELFA	Ensaio Imunológico Fluorescente Ligado a Enzima
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
EQL	Ensaio Imunológico com Revelação Quimioluminescente
HAART	Terapia Antiretroviral de Alta Atividade
HC	Hospital de Clínicas
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IFI	Imunofluorescência Indireta
LTNP	Não Progressor de Longo Prazo
MEIA	Ensaio Imunoenzimático de Micropartículas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SAPE	Streptoavidina-Ficoeritrina
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SSO	Sonda Sequência Específica
SSP	Primer Sequência Específica
TARV	Terapia Antirretroviral
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UCLA	Universidade da Califórnia, Los Angeles
UFPR	Universidade Federal do Paraná
WIIH	Workshop Internacional de Imunogenética e Histocompatibilidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV).....	17
3.1.1 Aspectos epidemiológicos.....	17
3.1.2 Transmissão e fatores de risco .....	17
3.1.3 Classificação genética, estrutura e ciclo de replicação .....	19
3.1.4 Patogênese e aspectos imunológicos.....	20
3.1.5 Diagnóstico e tratamento.....	22
3.1.6 Genes que afetam a infecção pelo HIV e progressão para AIDS.....	26
3.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE .....	27
3.2.1 Introdução .....	27
3.2.2 Organização gênica do <i>MHC</i> .....	28
3.2.3 Polimorfismo e nomenclatura do sistema <i>HLA</i> .....	30
3.2.4 Estrutura e função das moléculas <i>HLA</i> .....	33
3.2.5 Aspectos clínicos envolvendo as moléculas <i>HLA</i> .....	36
3.2.5.1 <i>HLA</i> e transplantes.....	36
3.2.5.2 <i>HLA</i> e associação com doenças.....	37
3.2.6 <i>HLA</i> e HIV .....	38
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
4.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	42
4.2 CASUÍSTICA.....	42
4.2.1 Pacientes.....	42
4.3 METODOLOGIA.....	43
4.3.1 Extração de DNA das amostras .....	43
4.3.2 Quantificação do DNA nas amostras .....	43
4.3.3 Tipificação <i>HLA</i> por PCR-SSO.....	43
4.3.3.1 Princípio da tecnologia Luminex.....	43
4.3.3.2 PCR-SSO LABType®.....	45
4.3.3.3 Critérios de análise e liberação dos resultados .....	48

4.3.4 Análise Estatística .....	49
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA.....	51
5.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	58
5.3 HOMOZIGOSE E HETEROZIGOSE PARA OS <i>LOCI HLA-A, -B E -C</i> .....	60
5.4 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS .....	63
5.4.1 Pacientes HIV.....	63
5.4.2 Grupos AIDS e NÃO AIDS .....	67
5.5 ANÁLISE MULTIVARIADA POR REGRESSÃO LOGÍSTICA .....	73
5.5.1 Modulação da contagem de células T CD4 <sup>+</sup> pelas associações de suscetibilidade e proteção .....	74
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) constitui um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, afetando cerca de 40 milhões de pessoas mundialmente. A infecção está associada com grande morbi-mortalidade, especialmente na região da África subsaariana. Desde 1981, quando o HIV foi inicialmente descrito, essa epidemia já vitimou aproximadamente 25 milhões de pessoas. Estima-se que aproximadamente 14.000 pessoas são diariamente infectadas pelo HIV, e quatro milhões de casos novos são observados a cada ano (SIMON; HO; KARIM, 2006).

A história natural da infecção pelo HIV pode variar significativamente entre os indivíduos infectados (O'BRIEN; NELSON, 2004), tanto para o controle do vírus, quanto para os tempos de progressão para AIDS. Com base nesta heterogeneidade é possível identificar quatro grupos de progressão para AIDS: os progressores típicos, os progressores rápidos, os não progressores de longo prazo, que contemplam os controladores de elite, e os progressores lentos ou sobreviventes de longo prazo (PANTALEO; FAUCI, 1996). Estas diferenças observadas têm sido atribuídas a vários genes humanos, incluindo os genes do complexo principal de histocompatibilidade (*MHC*), que influenciam o ciclo de replicação do HIV, e a progressão para AIDS (AN; WINKLER, 2010; BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

Os genes do *MHC*, que no ser humano é denominado sistema *HLA* (*human leukocyte antigen*), está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), sendo os genes mais polimórficos do genoma humano (JANEWEY *et al*, 2002). A região do *MHC* contém mais de duzentos genes, que apresentam funções imunológicas (MICKELSON; PETERSDORF, 2004). As moléculas HLA possuem a função de apresentar peptídeos estranhos para os linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os alelos do sistema *HLA* desempenham um papel crucial nos transplantes (HOWELL; CARTER; CLARK, 2010), e apresentam associações com as mais variadas doenças, incluindo a diabetes melito tipo 1 (FERREIRA *et al*, 2009), doença celíaca (GHODKE *et al*, 2005), narcolepsia (WILLIAMS, 2001), artrite reumatóide (GHODKE *et al*, 2005), espondilite anquilosante (WILLIAMS, 2001), hepatite B (HAN

*et al*, 2005), hepatite C (MARTIN; CARRINGTON, 2005; CORGUI *et al*, 2008), malária (BLACKWELL; JAMIESON; BURGNER, 2009) e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

Os alelos do sistema *HLA* foram os primeiros fatores genéticos do hospedeiro associados com o controle da replicação do HIV-1 e retardo no tempo de progressão para AIDS (KAUR; MEHRA, 2009). Entre os genes do sistema *HLA*, os alelos *HLA* de classe I (-A, -B e -C) influenciam de modo significativo a infecção pelo HIV e a progressão para AIDS (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

No Brasil, existe somente um estudo de associação entre alelos *HLA* e a infecção pelo HIV, realizado na Bahia, com um grupo de 147 de pacientes afro-brasileiros HIV positivos (SILVA *et al*, 2010). Até o presente momento, não foram relatados no Brasil, estudos de associação entre alelos *HLA* de classe I e pacientes HIV positivos de origem européia.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o polimorfismo dos genes *HLA de classe I (A, B e C)* em pacientes HIV positivos de Curitiba, Estado do Paraná, atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as freqüências alélicas dos genes *HLA de classe I (-A, -B e -C)* nos pacientes HIV positivos, com e sem AIDS;
- Determinar as freqüências haplotípicas dos genes *HLA de classe I (-A, -B e -C)* nos pacientes HIV positivos, com e sem AIDS;
- Investigar a influência da homozigose nos genes *HLA de classe I (-A, -B e -C)* nos parâmetros clínicos (manifestação de doenças oportunistas) e laboratoriais (contagem de CD4<sup>+</sup> e carga viral) dos pacientes HIV positivos;
- Verificar a existência de associações de proteção ou suscetibilidade entre os genes *HLA de classe I (-A, -B e -C)* e progressão pra AIDS, nos pacientes HIV positivos;
- Verificar a modulação na contagem de CD4<sup>+</sup> pelas associações de proteção ou suscetibilidade nos genes *HLA de classe I (-A, -B e -C)*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

##### 3.1.1 Aspectos epidemiológicos

A epidemia da AIDS iniciou-se no ano de 1981 nos Estados Unidos, quando o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) relatou casos de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) em um grupo de cinco homens homossexuais (KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008). Desde então, estima-se que a epidemia de HIV tenha causado a morte de aproximadamente 25 milhões de pessoas e que existam mundialmente cerca de 40 milhões de pessoas vivendo com o HIV. Em 2005 ocorreram quatro milhões de novos casos e cerca de três milhões de mortes relacionadas com a AIDS (SIMON; HO; KARIM, 2006).

Dos 40 milhões de pessoas vivendo com o HIV mundialmente, cerca de 70% se encontram na África e 20% na Ásia. Estima-se que adultos jovens, de 15 a 24 anos, representam cerca de metade dos cinco milhões de novos casos anuais, e que aproximadamente 14.000 pessoas são infectadas pelo HIV diariamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A África subsaariana constitui o epicentro da epidemia de HIV, possuindo a maior taxa de infecção do mundo e a maior proporção de casos novos, cerca de 10.000 casos novos todos os dias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Nesta localidade, mais da metade dos indivíduos infectados são mulheres, o que aumenta o risco de transmissão vertical (SIMON; HO; KARIM, 2006).

Dados do Departamento de Informática do SUS (DATASUS) indicam que foram diagnosticados 592.914 casos de HIV/AIDS no Brasil durante o período de 1980 a junho de 2010. As regiões sul e sudeste representam 77,5% do total de casos de HIV/AIDS no Brasil. No estado do Paraná, cerca de 86,4% dos casos de HIV/AIDS se concentram na cidade de Curitiba e Região Metropolitana (BRASIL, 2011).

##### 3.1.2 Transmissão e fatores de risco

O HIV pode ser transmitido sexualmente, por práticas heterossexuais e homossexuais, verticalmente de mãe para filho, através de sangue contaminado,

decorrente da utilização de produtos hemoterápicos infectados, compartilhamento de agulhas contaminadas e acidentes ocupacionais (MANAVI, 2006; LEVY, 2009).

A infecção pelo HIV é uma doença sexualmente transmissível (DST). O risco de adquirir a infecção pelo HIV durante o ato sexual aumenta significativamente na presença de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), práticas sexuais agressivas e se o parceiro for HIV positivo com carga viral elevada. Por conta de particularidades morfofisiológicas, as mulheres apresentam maior probabilidade de adquirir HIV durante ato sexual que os homens (KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008; LEVY, 2009).

A transmissão sexual representa a rota mais importante de transmissão do HIV, contribuindo com cerca de 70% dos casos mundiais. Em países desenvolvidos o ato sexual entre homossexuais representa a forma mais comum de infecção, já em países em desenvolvimento a transmissão sexual heterossexual é a mais comum (MANAVI, 2006).

A transmissão vertical é uma importante rota de transmissão do HIV em países em desenvolvimento (MANAVI, 2006). Este modo de transmissão é responsável pela maioria dos casos pediátricos de AIDS, podendo ocorrer no útero, durante o parto e através do aleitamento materno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011). Intervenções incluindo a triagem sorológica de gestantes, terapia antirretroviral, cesárea e substituição do leite materno reduzem de modo eficaz a transmissão vertical do HIV (SIMON; HO; KARIM, 2006).

O HIV pode ser transmitido pelo contato com sangue contaminado com o vírus, mais freqüentemente através do compartilhamento e reutilização de seringas entre usuários de drogas (MANAVI, 2006; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011). A transmissão do HIV através de produtos hemoterápicos, muito comum no início dos anos 80, hoje é um tanto rara, principalmente devido ao processo de triagem para HIV que ocorre nos bancos de sangue atualmente. O risco ocupacional de transmissão do HIV para profissionais de saúde relaciona-se principalmente com acidentes com agulhas contendo sangue contaminado, e o risco de transmissão depende do tipo e da gravidade da exposição (KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008).

Nos Estados Unidos os principais grupos de risco para o desenvolvimento da AIDS incluem homens homossexuais ou bissexuais, usuários de drogas

endovenosas, heterossexuais que são parceiros de membros dos outros grupos de risco e bebês de mães infectadas. Profissionais de saúde apresentam um pequeno aumento no risco de infecção pelo HIV (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

### 3.1.3 Classificação genética, estrutura e ciclo de replicação

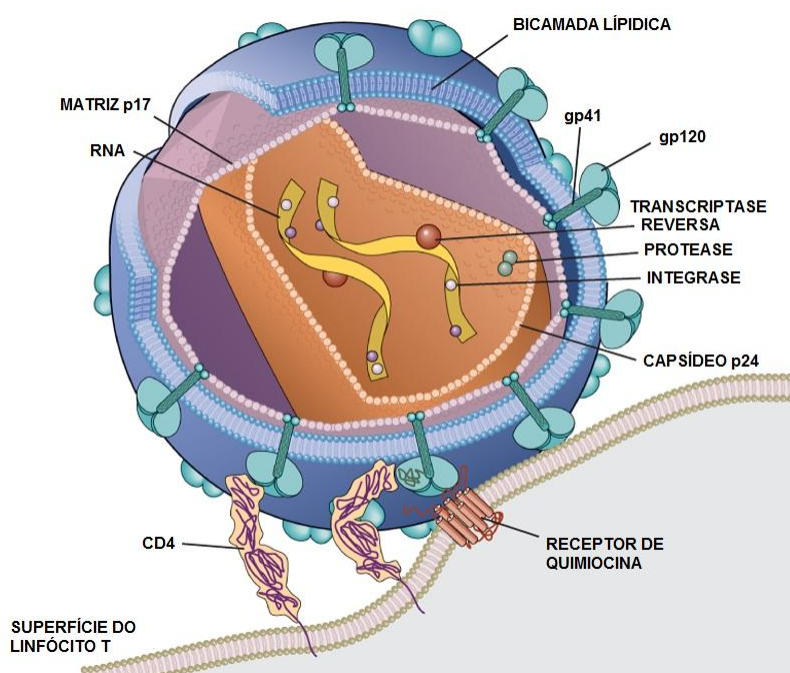
O HIV é classificado em dois tipos, HIV-1 e HIV-2, sendo que o HIV-1 é subdividido em quatro grupos M (*Major*), O (*Outlier*), N (*Not M, Not O*) e P (*Plantier*) (SHARMA *et al*, 2011). O grupo M do HIV-1 tem distribuição mundial, sendo a principal causa de AIDS no mundo. Este grupo pode ser subdividido em subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), subsubtipos (A1, A2, A3 e A4; F1 e F2) e formas recombinantes circulantes (CRF01\_AE, CRF02\_AG; etc) (EBERLE; GÜRTLER, 2012). O HIV-2, por sua vez, tem distribuição restrita ao continente africano. O HIV é um retrovírus pertencente ao gênero dos lentivírus. O curso da infecção destes vírus é caracterizado por um longo intervalo entre a infecção inicial e a manifestação dos sintomas mais graves (KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008; FANALES-BELASIO *et al*, 2010).

O genoma do HIV é composto por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, sendo caracterizado pela presença dos genes *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do núcleo p24, p7 e p6. O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope viral gp120 e gp41, que reconhecem os receptores de CD4<sup>+</sup>. O gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease viral, que são necessárias para a replicação viral. As partículas virais do HIV são envoltas por uma dupla camada fosfolipídica derivada da membrana da célula hospedeira (Figura 1). A estrutura da partícula do HIV é similar para HIV-1 e HIV-2 (FANALES-BELASIO *et al*, 2010).

O primeiro passo da replicação viral é a ligação da glicoproteína gp120 do envelope viral ao receptor CD4<sup>+</sup> e ao co-receptor de quimiocinas CCR5 ou CXCR4 na célula hospedeira. Em seguida ocorre fusão da membrana do HIV com a membrana da célula hospedeira, com liberação do material genético do vírus no citoplasma da célula. Após liberação do genoma viral, a enzima transcriptase reversa converte o RNA em DNA, que entra no núcleo da célula e se integra ao genoma celular pela ação da enzima integrase, formando um provírus. O início da transcrição dos genes do provírus integrado está ligado à ativação da célula T por

antígenos ou citocinas. Após sua ativação, a célula T faz a transcrição do DNA, produzindo RNA mensageiro, que é transportado do núcleo para o citoplasma. No citoplasma o RNA mensageiro é traduzido e as proteínas do HIV são sintetizadas. A protease viral cliva as proteínas recém formadas em fragmentos menores, e em seguida ocorre montagem das partículas virais. Após essa montagem, os vírions são liberados da célula por um processo de brotamento da membrana plasmática, ficando livres para infectar outras células e reiniciar o ciclo de replicação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008; FANALES-BELASIO *et al*, 2010; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011)

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO HIV



FONTE: Adaptado de ABBAS, LICHTMAN e PILLAI (2008)

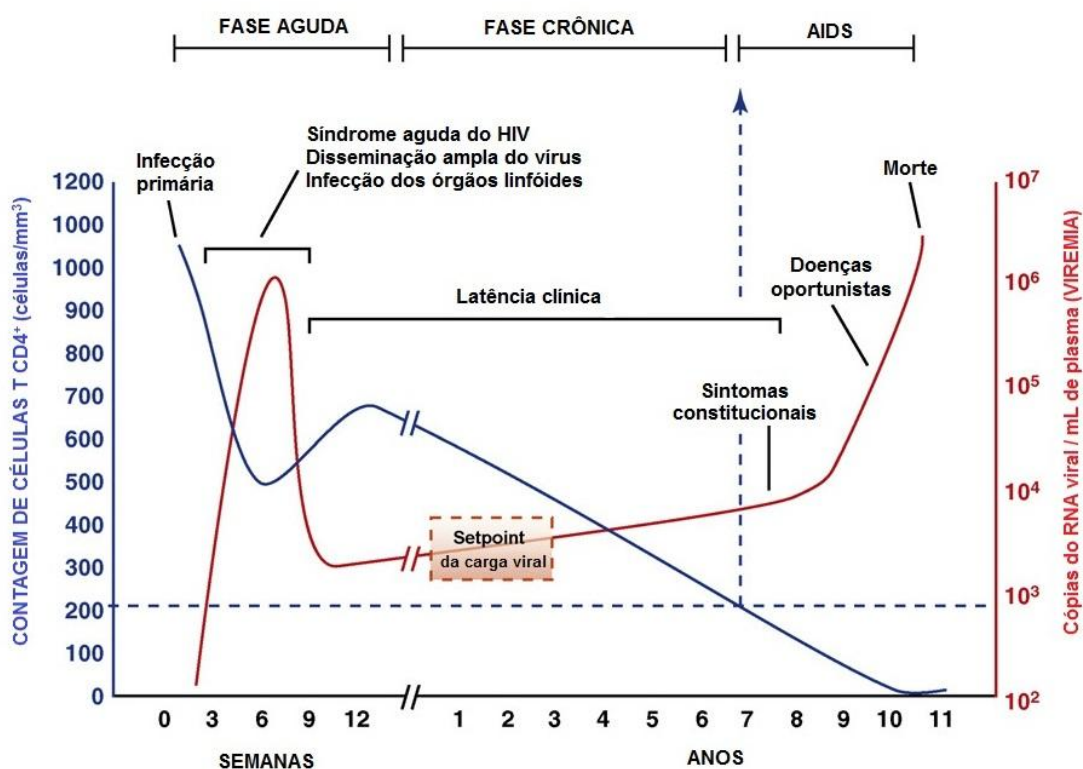
### 3.1.4 Patogênese e aspectos imunológicos

A infecção aguda pelo HIV é caracterizada pela infecção das células T CD4<sup>+</sup> de memória, que expressam CCR5 nos tecidos linfóides da mucosa. Ocorre destruição maciça dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, aumento da viremia e disseminação do

vírus pelos linfonodos. Nesta fase o indivíduo infectado apresenta a chamada síndrome aguda do HIV, caracterizada por sintomas inespecíficos como febre, cefaléia, faringite, linfadenopatia generalizada e urticária, mas que em alguns casos pode ser assintomática. (MANAVI, 2006; LEVY, 2009).

A resposta imunológica humoral e celular do hospedeiro contra os antígenos virais controla temporariamente a infecção aguda, diminuindo a replicação viral. Verifica-se assim uma redução na viremia e um aumento discreto nas contagens de linfócitos CD4<sup>+</sup> (Figura 2). A resposta imunológica, entretanto, não consegue erradicar o HIV e prevenir o estabelecimento da infecção crônica nos tecidos linfóides. Nesta fase ocorre um período de latência clínica, com ausência de sintomas associada com replicação viral de baixo grau nos tecidos linfóides e perda lenta e progressiva dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LEVY, 2009; FANALES-BELASIO *et al*, 2010).

FIGURA 2 – EVOLUÇÃO CLÍNICA DA INFECÇÃO PELO HIV



FONTE: Adaptado de AN e WINKLER (2010)

A progressiva diminuição da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> torna os pacientes mais suscetíveis a infecções por outros microorganismos. A resposta imunológica do hospedeiro a estas infecções acaba estimulando a replicação do HIV, mediante estímulo de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), que são liberadas durante a resposta imunológica. Desta forma, conforme o sistema imunológico tenta erradicar outros microorganismos, ele acelera a destruição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, levando à fase final de imunodeficiência conhecida como AIDS (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011)

A AIDS é definida quando a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> está abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> ou na presença de alguma doença definidora de AIDS, independente da contagem de CD4<sup>+</sup> (SCHNEIDER *et al*, 2008) (Tabela 1). Na ausência de tratamento, a maior parte dos pacientes com AIDS vão a óbito. Neste quadro, os pacientes são acometidos com infecções oportunistas, caquexia, neoplasias e degeneração do sistema nervoso central (KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008). A manifestação de anemia e profunda linfopenia tem sido associada à AIDS. As infecções oportunistas mais comuns em pacientes com AIDS são causadas por Citomegalovírus, *Candida albicans*, *Cryptosporidium sp* e *Isospora belli* (FANALES-BELASIO *et al*, 2010).

### 3.1.5 Diagnóstico e tratamento

A infecção pelo HIV é diagnosticada pela pesquisa de anticorpos anti-HIV por ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA). Tal metodologia possui sensibilidade e especificidade superiores a 99%. Testes positivos de ELISA devem ser repetidos e confirmados. Amostras positivas devem ser confirmadas por Western Blot, que detectam anticorpos contra p24, gp41 e gp120/gp160 do HIV (GUPTA, V.; GUPTA, S., 2004; MANAVI, 2006; BRASIL, 2009).

Resultados falso-negativos no teste de ELISA podem ocorrer durante a janela imunológica, que consiste no tempo entre a aquisição do vírus e o desenvolvimento de resposta humoral, com produção de anticorpos. A duração da janela imunológica é considerada um período de três meses, embora novos testes de ELISA consigam detectar anticorpos anti-HIV três semanas após a infecção (GUPTA, V.; GUPTA, S., 2004; MANAVI, 2006).

TABELA 1 - DOENÇAS DEFINIDORAS DE AIDS SEGUNDO CRITÉRIO DO CDC

- 
- Infecções bacterianas, múltiplas ou recorrentes em crianças menores de 13 anos
  - Candidíase de esôfago;
  - Candidíase de traquéia, brônquios ou pulmões;
  - Câncer cervical invasivo;
  - Coccidiodomicose, disseminada ou extrapulmonar;
  - Criptococose extrapulmonar;
  - Criptosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
  - Citomegalovirose em local que não sejam fígado, baço e linfonodos;
  - Retinite por citomegalovírus, com perda de visão
  - Encefalopatia relacionada com HIV
  - Herpes simples, com úlceras crônicas por um período superior a 1 mês;
  - Histoplasmose disseminada ou extrapulmonar
  - Isosporidiose intestinal crônica (período superior a um mês);
  - Sarcoma de Kaposi;
  - Linfoma de Burkitt;
  - Linfoma maligno imunoblástico
  - Linfoma primário do cérebro;
  - Complexo *Mycobacterium avium*(MAC);
  - Tuberculose pulmonar, disseminada ou extrapulmonar;
  - *Mycobacterium* de outras espécies, com doença disseminada ou extrapulmonar;
  - Pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*;
  - Pneumonia de repetição;
  - Leucoencefalopatia multifocal progressiva;
  - Sepses recorrentes por bactérias do gênero *Salmonella* (não tifóide);
  - Neurotoxoplasmose;
  - Caquexia associada ao HIV (*Wasting syndrome*)
- 

FONTE: Adaptado de SCHNEIDER et al. (2008)

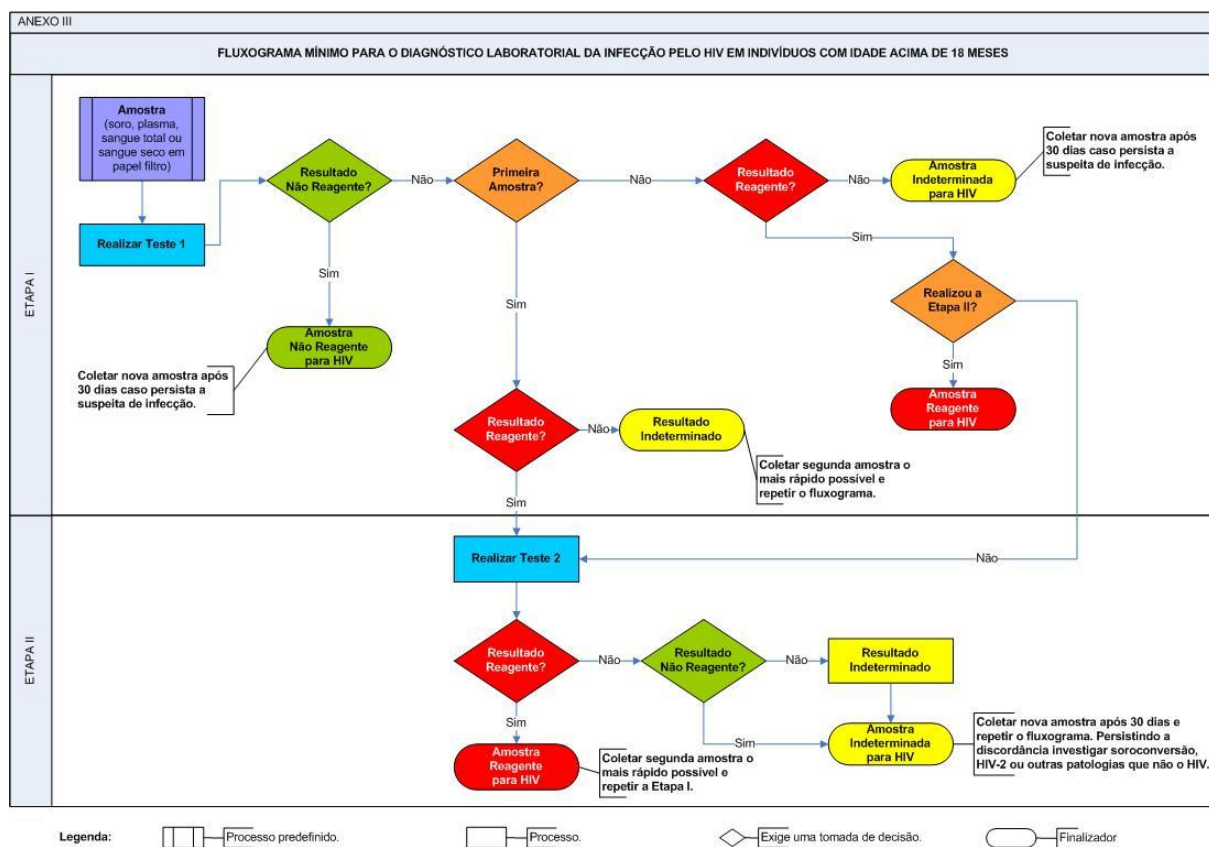


No Brasil, o diagnóstico laboratorial do HIV é estabelecido pela Portaria SVS/MS no 151 de 14 de outubro de 2009 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. O diagnóstico laboratorial do HIV é dividido em duas etapas, uma primeira de triagem e uma seguinte confirmatória (Figura 3). Na etapa de triagem é feita a pesquisa de anticorpos anti-HIV 1 e 2 pelas metodologias de ELISA, ensaio imunoenzimático de micropartículas (MEIA), ensaio imunológico com revelação quimioluminescente e derivações (EQL), ensaio imunológico fluorescente ligado a enzima (ELFA) e ensaio imunológico quimioluminescente magnético (CMIA). Na etapa confirmatória podem ser utilizadas as metodologias de imunofluorescência indireta (IFI), Western Blot, imunoblot e imunoblot rápido. Quando uma amostra é reagente para HIV nas etapas de triagem e confirmatória, uma segunda amostra deve ser coletada e repetida por alguma das metodologias da etapa inicial de triagem. A portaria nº 151 indica a realização de testes de biologia molecular ou investigação da infecção pelo HIV-2, para os resultados indeterminados, tanto na etapa de triagem quanto na etapa confirmatória (BRASIL, 2009).

A carga viral e a contagem de células CD4<sup>+</sup> são os parâmetros laboratoriais utilizados para monitorar a resposta à terapia antirretroviral e a evolução clínica dos pacientes infectados pelo HIV. A carga viral tem importância no monitoramento da resposta à terapia antirretroviral (TARV) e a contagem de células CD4<sup>+</sup> relaciona-se com o grau de imunodeficiência do organismo. A contagem de células CD4<sup>+</sup> é realizada por citometria de fluxo, e constitui um critério fundamental para definição dos estágios da infecção pelo HIV (GUPTA, V.; GUPTA, S., 2004; SIMON; HO; KARIM, 2006).

O objetivo da TARV é a redução da morbidade e mortalidade associada com a infecção pelo HIV. A TARV suprime a replicação viral, mas não erradica o vírus do HIV. A diminuição da carga viral acarreta em aumentos nas contagens de células CD4<sup>+</sup>, revertendo o quadro de imunodeficiência ligado ao HIV (SIMON; HO; KARIM, 2006; KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008).

FIGURA 3 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV SEGUNDO PORTARIA SVS/MS nº 151 DE 2009



FONTE: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/portaria151\\_anexo3.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/portaria151_anexo3.pdf)

Existem atualmente vinte medicamentos antirretrovirais que são utilizados no tratamento da infecção pelo HIV. Estes medicamentos são divididos em seis classes de antirretrovirais, que compreendem os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa, inibidores de protease, inibidores de fusão, inibidores da integrase e os antagonistas de CCR5. Estas classes de antirretrovirais afetam o HIV em diferentes etapas de seu ciclo de replicação. A abordagem terapêutica mais atual consiste na combinação de diferentes classes de antirretrovirais, caracterizando a terapia antirretroviral de alta atividade (HAART) (MANAVI, 2006; KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008).

A introdução da HAART no tratamento de pacientes infectados com HIV diminuiu significativamente a morbidade e mortalidade associadas ao HIV, transformando a doença, antes fatal, em uma doença crônica tratável (SIMON; HO; KARIM, 2006). Entretanto existe um problema relacionado com a HAART, que é a

difícil adesão ao seu regime terapêutico, composto por vários medicamentos com inúmeras doses. Relatos indicam que a principal causa de resistência aos medicamentos antirretrovirais é falta de adesão à HAART (KLIMAS; KONERU; FLETCHER, 2008; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011).

### 3.1.6 Genes que afetam a infecção pelo HIV e progressão para AIDS

Existe uma grande heterogeneidade quanto ao controle do HIV e as taxas de progressão da doença em diferentes indivíduos (O'BRIEN; NELSON, 2004). Existem indivíduos que mesmo depois de repetidas exposições de alto risco, continuam não infectados pelo HIV. Outros indivíduos denominados não progressores de longo prazo (*long-term non-progressors* – LTNP) mantêm níveis estáveis de CD4<sup>+</sup> e baixa carga viral por até 20 anos. Em contraste com os LTNP, os progressores rápidos não controlam a viremia, apresentam carga viral exacerbada e desenvolvem AIDS rapidamente, no prazo de aproximadamente três anos. Um subconjunto de LTNP denominado controladores de elite (*elite controllers* – EC) tem sido foco de inúmeras pesquisas nos últimos anos, já que tais indivíduos mantêm a viremia em níveis indetectáveis (menor que 50 cópias/mL) na ausência de TARV. Estas diferenças no curso da infecção do HIV têm sido associadas com determinados genes que afetam diretamente o ciclo do HIV no hospedeiro (HUNT; CARRINGTON, 2008; AN; WINKLER, 2010; BLANKSON, 2010; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011).

Inúmeros genes do hospedeiro têm sido associados com suscetibilidade ou proteção à infecção pelo HIV e progressão para AIDS. Estas variantes genéticas que afetam o curso da infecção pelo HIV incluem genes da imunidade inata e adquirida, fatores intrínsecos de restrição antiviral, e fatores de dependência do HIV para replicação viral (AN; WINKLER, 2010; MOIR; CHUN; FAUCI, 2011).

Relatos indicam que a deleção de 32 pares de bases no gene *CCR5* tem um importante papel no controle da infecção pelo HIV, em indivíduos portadores desta mutação. Os indivíduos homocigotos para a mutação conseguem bloquear efetivamente a infecção pela cepa R5 do HIV-1, e os heterocigotos apresentam taxas lentas de progressão para AIDS (O'BRIEN; NELSON, 2004; HUNT; CARRINGTON, 2008)

A expressão do gene que codifica o ligante de *CCR5*, *CCL5* é modulada por certos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) regulatórios, que podem codificar

níveis diminuídos do ligante CCL5. Indivíduos que apresentam níveis reduzidos deste ligante apresentam maior carga viral e progressão mais rápida para AIDS. A produção da quimiocina RANTES, outro ligante de CCR5, também é afetada por certos SNPs. A redução da produção de RANTES tem sido associada com progressão rápida para AIDS, enquanto níveis elevados da quimiocina estão relacionados com proteção contra infecção pelo HIV-1 e manifestação tardia da AIDS (O'BRIEN; NELSON, 2004).

Os genes das interleucinas IL-10 (*IL10*) e interferon  $\gamma$  (*IFNG*), que são potentes citocinas que inibem a replicação viral, também apresentam variantes alélicas que influenciam o curso da infecção pelo HIV. O SNP *IL10* 5'A altera a região promotora, que reduz a transcrição de *IL10* e produz níveis diminuídos de IL-10. Indivíduos homozigotos e heterozigotos para *IL10* 5'A têm apresentado progressão rápida para AIDS. O gene *IFNG* possui um alelo na região promotora (-179T) que é induzível pelo TNF, enquanto o alelo tipo selvagem (-179G) não é. Os indivíduos heterozigotos para *IFNG* -179T progredem para AIDS mais rapidamente que os homozigotos para o alelo selvagem *IFNG* -179G/G (O'BRIEN; NELSON, 2004; AN; WINKLER, 2010).

Os alelos do sistema de antígenos leucocitários humanos (*human leukocyte antigen - HLA*), que possuem a função de apresentar peptídeos estranhos para as células T do sistema imunológico, foram os primeiros fatores genéticos do hospedeiro associados com o controle da infecção pelo HIV-1 (KAUR; MEHRA, 2009). Inúmeros relatos indicam existência de associações robustas entre alelos/grupos alélicos de proteção e suscetibilidade com o controle da replicação viral e evolução para AIDS (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; KAUR; MEHRA, 2009; AN; WINKLER, 2010; BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

## 3.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

### 3.2.1 Introdução

O complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex – MHC*), que no ser humano é denominado sistema *HLA*, está localizado no braço curto do cromossomo 6, sendo constituído por quatro milhões de pares de bases (4Mb). A região do MHC contém mais de duzentos genes, muitos dos quais

apresentem função imunológica. Estas funções imunológicas incluem o processamento e apresentação de antígenos (*HLA-A, -B, -C, DP, DQ e DR*), inflamação (*ABCF1, A1F1, DAXX, IER3, LST1, LTA, LTB, NCR3 e TNF*), maturação de leucócitos (*DDAH2 e LY6G*), cascata do sistema complemento (*BF, C2, C4A e C4B*), imunologia materno-fetal (*HLA-E, -F e -G*) e regulação imunológica (*NFKB, RXRB e FKBPL*) (JANEWEY *et al*, 2002; MICKELSON; PETERSDORF, 2004).

A evidência do MHC em humanos foi reconhecida no início de 1950, a partir da observação que o soro de pacientes com reações transfusionais causava a aglutinação dos leucócitos dos seus respectivos doadores na transfusão, bem como os leucócitos de outros indivíduos. Estudos posteriores mostraram que mulheres múltiparas também apresentavam estes aloanticorpos que aglutinavam leucócitos. Em 1958, Jean Dausset caracterizou o primeiro destes aloantígenos, que recebeu a denominação inicial de MAC. Como os aloantígenos que causavam a aglutinação estavam presentes nos leucócitos humanos, estes foram chamados de antígenos leucocitários humanos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; THORSBY, 2009).

Desde 1964, vários Workshops Internacionais de Imunogenética e Histocompatibilidade (WIIH) tem sido realizados para a comunicação de novas descobertas sobre o sistema *HLA*, e para padronização da nomenclatura *HLA*, e dos métodos de tipificação *HLA*. O primeiro WIIH ocorreu em 1964 em Durham, NC, Estados Unidos, e o último em 2008, em Búzios, RJ, Brasil (THORSBY, 2009).

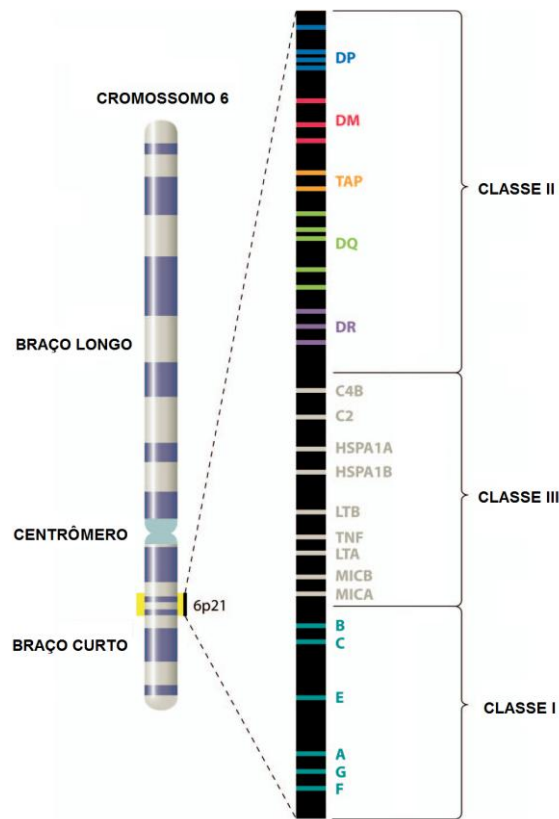
### 3.2.2 Organização gênica do *MHC*

O *MHC* é uma região poligênica e polialélica, localizado no braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.3), compreende uma região de aproximadamente 4000 Kb, com 224 genes, sendo 51 genes diretamente envolvidos na resposta imunológica (WILLIAMS, 2001; MICKELSON; PETERSDORF, 2004; MASSEY; McPHERSON, 2006).

O *MHC* é dividido de acordo com a estrutura e a função dos produtos gênicos em três regiões classificadas como: classe I, classe II e classe III (Figura 4). Na região de classe I (aproximadamente 2000Kb), localizada distalmente em relação ao centrômero, estão localizados os genes *HLA* clássicos de histocompatibilidade, *HLA-A, B e C*, bem como de genes *HLA* não clássicos, *HLA-E, F, G e HFE, MICA e MICB*. Na região de classe II, localizada mais ao centro (1000 a 1200 Kb), estão os

loci *HLA-DRA*, *DRB1-5*, *DQA1-3*, *DQB1-2*, *DPA1*, *DPB1*, *DOA*, *DOB*, *DMA* e *DMB*. Também nesta região estão localizados vários pseudogenes e os genes *LMP1*, *LMP2*, *TAP1*, *TAP2*. A região de classe III, localizada entre as de classe I e classe II, contém, entre outros, os genes que codificam para componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B), fator B (Bf) e para a enzima 21-hidroxilase. Os genes que codificam para as proteínas de choque térmico Hsp70, TNF- $\alpha$  e linfotoxinas  $\alpha$ (LTA) e  $\beta$ (LTB), estão localizados entre o complemento e as regiões de classe I. (MASSEY; McPHERSON, 2006; CHOO, 2007)

FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO *MHC*



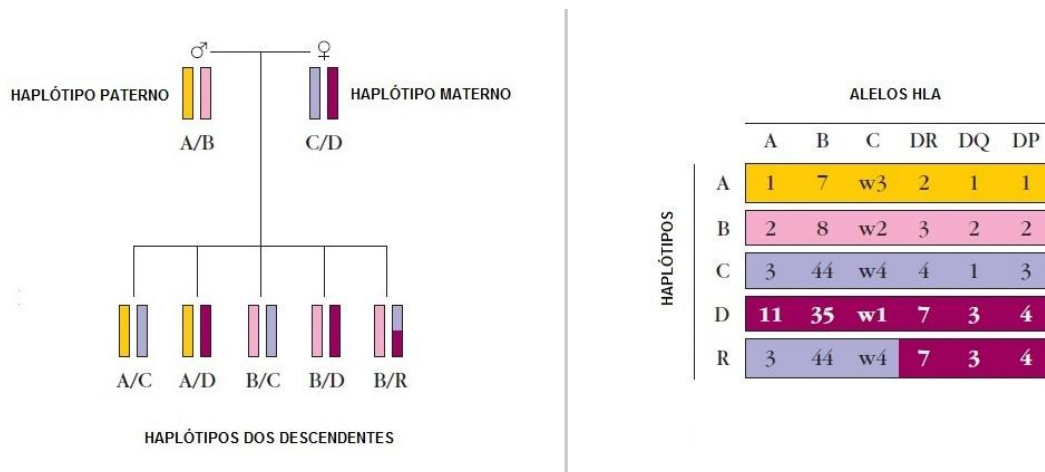
FONTE: Adaptado de BLACKWELL, JAMIESON e BURGNER (2009)

Entre todos os genes do *MHC*, apenas nove genes estão envolvidos com a apresentação de peptídeos, sendo denominados genes *HLA* clássicos. Na região de classe I se localizam os loci *HLA-A*, *-B* e *-C* e na região de classe II, estão os loci *DPA1*, *DPB1*, *DQA1*, *DQB1*, *DRA*, *DRB1* (WILLIAMS, 2001).

Os genes da região *MHC* são intimamente ligados, sendo freqüentemente herdados em bloco, constituindo haplótipos e resultando no fenômeno de desequilíbrio de ligação (DL) (MASSEY; McPHERSON, 2006).

Os genes *HLA* são expressos de forma co-dominante e acompanham a segregação Mendeliana clássica. O genótipo de um indivíduo é constituído por dois haplótipos, um de origem paterna (*ab*) e outro de origem materna (*cd*). Caso não ocorra recombinação, as quatro combinações parentais possíveis, transmitidas aos descendentes, são *ac*, *ad*, *bc* e *bd* (Figura 5). Portanto, dois irmãos têm 25% de chance de serem genotipicamente idênticos nos loci *HLA*, 50% de chance de serem haploidênticos (compartilharem um haplótipo) e 25% de chance de não compartilharem haplótipo algum. Durante a prófase I da meiose pode haver recombinação entre os diferentes loci *HLA*, e caso a recombinação ocorra, novos haplótipos com diferentes combinações de alelos serão formados (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; CHOO, 2007; TRIVEDI *et al*, 2007).

FIGURA 5 – PADRÃO DE HERANÇA DOS HAPLÓTIPOS *HLA*



FONTE: Adaptado de GOLDSBY, KINDT e OSBORNE (2000)

### 3.2.3 Polimorfismo e nomenclatura do sistema *HLA*

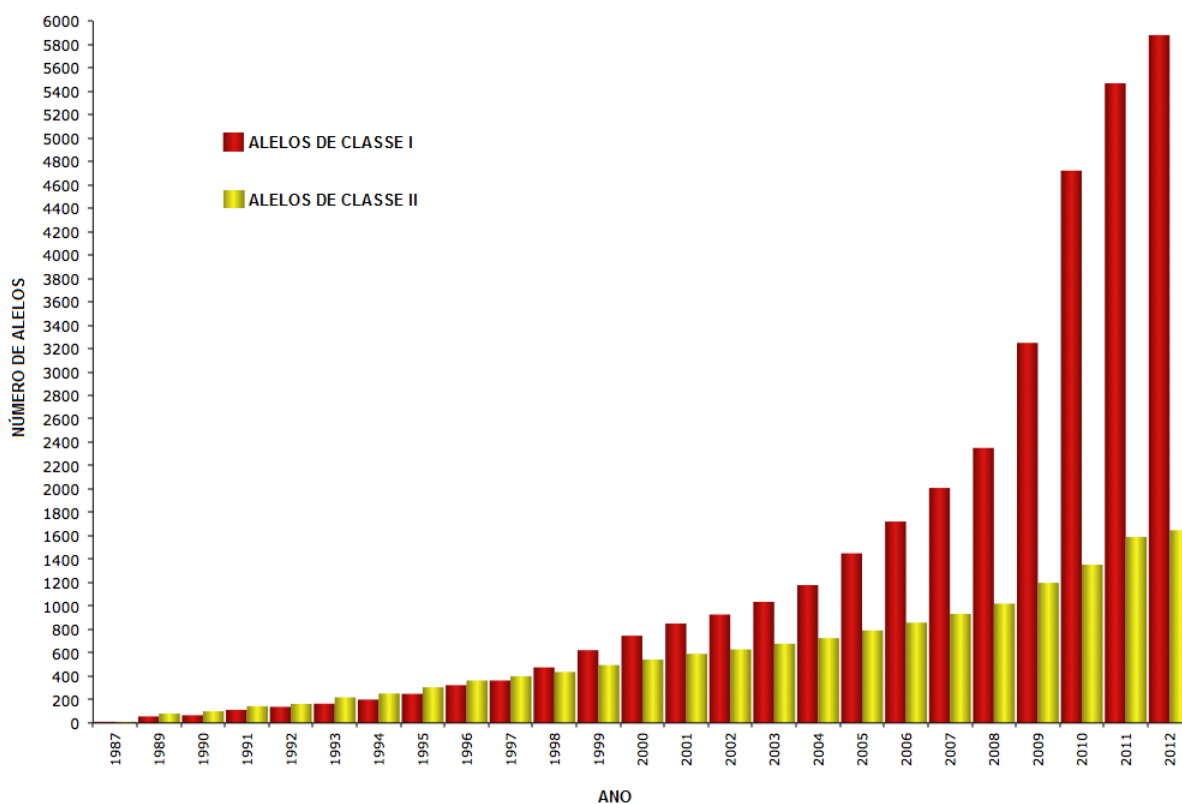
O sistema *HLA* apresenta um extenso polimorfismo para os genes de classe I e II, caracterizado por um número muito elevado de alelos, que são formas alternativas de um gene (Figura 6), os quais podem diferir entre si em múltiplos

pontos da seqüência de sua estrutura primária (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; SHANKARKUMAR, 2004).

Dados do site <http://hla.alleles.org/>, que é vinculado ao Anthony Nolan Research Institute, indicam que até abril de 2012 foram descritos 7527 alelos *HLA*, sendo 5880 alelos de classe I e 1647 alelos de classe II (Figura 6). O *HLA-B* é o gene mais polimórfico do sistema *HLA*, com 2490 alelos já identificados. O *HLA-A*, -*C* e -*DRB1* possuem, respectivamente, 1884, 1384 e 1094 alelos.

Os mecanismos genéticos que contribuem para a geração do polimorfismo no sistema *HLA* incluem mutações de ponto, recombinações, duplicações e conversões intragênicas e intergênicas. A grande diversidade dos genes *HLA* resulta do acúmulo gradual de mudanças nas espécies ancestrais ao longo da evolução (JANEWAY *et al*, 2002).

FIGURA 6 – GRAU DE POLIMORFISMO GÊNICO DO SISTEMA *HLA*



FONTE: Adaptado de MARSH (2012)  
Disponível em [http://hla.alleles.org/inc/images/graph\\_hires.png](http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png)



Acredita-se que o polimorfismo do sistema *HLA* seja mantido através da seleção natural imposta pela morbidade e mortalidade das doenças infecciosas, garantindo que o ser humano, como espécie, seja capaz de resistir a uma grande variedade de patógenos. Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar a manutenção deste polimorfismo, e envolvem a vantagem do heterozigoto, na qual heterozigotos para o *HLA* apresentam uma variedade maior de peptídeos antigênicos às células T do que os indivíduos homozigotos. Outra hipótese é a seleção dependente da frequência, em que um agente patogênico que escapa da resposta imunológica mediada por alelos comuns na população, permanece suscetível a respostas mediadas por alelos mais raros (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003).

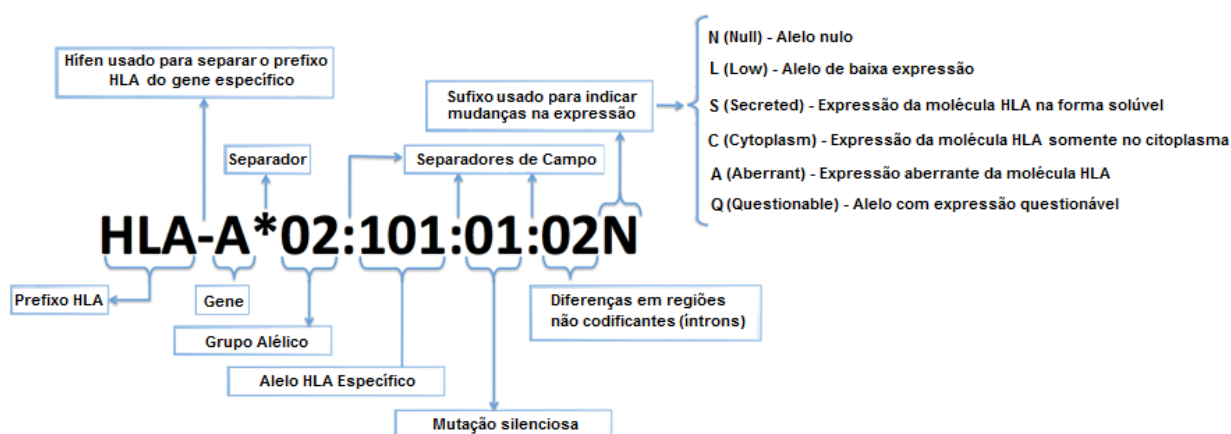
A nomenclatura *HLA* é determinada pelo comitê de nomenclatura para o sistema *HLA*, designado pela Organização Mundial de Saúde, o qual é responsável pela atualização da nomenclatura oficial dos genes *HLA* e de suas respectivas proteínas (MARSH *et al*, 2010).

O nome de um determinado alelo pode ser composto por quatro, seis ou oito dígitos dependendo de sua seqüência. Os dois primeiros dígitos descrevem o grupo alélico, que freqüentemente corresponde com a sua especificidade sorológica. O terceiro e quarto dígito corresponde à ordem em que a seqüência do alelo foi descoberta. Os alelos cujos números diferem nos quatro primeiros dígitos devem diferir por uma ou mais substituições de nucleotídeos, que altera a seqüência de aminoácidos na proteína codificada. Os alelos que diferem somente por substituições sinônimas devem ser distinguidos pelo uso do quinto e sexto dígitos. Já os alelos que diferem entre si somente por diferenças nos íntrons e nas regiões não traduzidas são distinguidos pelo uso do sétimo e oitavo dígitos (MARSH *et al*, 2010; TAIT, 2011) (Figura 7).

Existem alguns sufixos que podem ser adicionados ao nome do alelo para indicar seu status de expressão (Figura 7). O sufixo 'N' indica alelos nulos, que não são expressos. O sufixo 'L' indica alelos que apresentam baixa expressão na superfície celular. O sufixo 'S' é utilizado para designar um alelo que codifica uma proteína que se expressa como uma molécula solúvel/secretada, não estando presente na superfície celular. Alelos com os sufixos 'C', 'A' e 'Q', são mais incomuns

e indicam expressão citoplasmática, aberrante e questionável, respectivamente (TAIT, 2011)

FIGURA 7 – NOMENCLATURA DO SISTEMA *HLA*



FONTE: Adaptado de MARSH (2010)

Disponível em <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

### 3.2.4 Estrutura e função das moléculas HLA

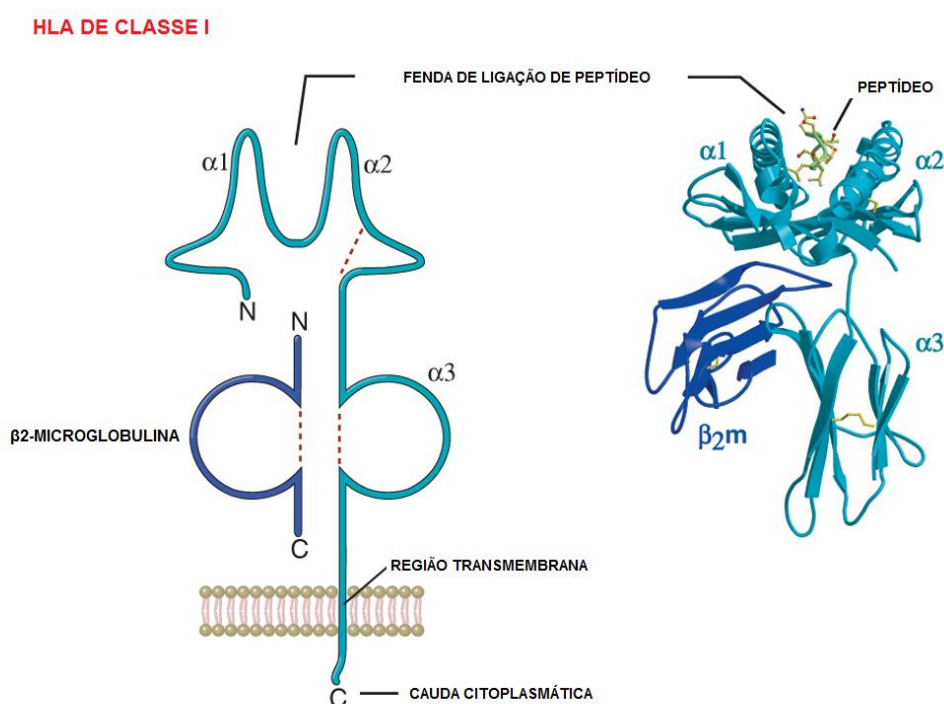
As moléculas HLA de classe I e II são heterodímeros, com domínios extracelulares variáveis e domínios transmembrana e intracitoplasmáticos relativamente constantes (WILLIAMS, 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

As moléculas HLA de classe I são codificadas pelos genes *HLA-A*, *B* e *C*. São glicoproteínas de 44-49 kDa, formadas por três domínios extracelulares,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. Esta cadeia  $\alpha$  pesada se encontra associada de forma não covalente a uma cadeia leve, de 12 kDa, denominada  $\beta 2$ -microglobulina, que é codificada fora do *MHC*, no cromossomo 15. Grande parte do polimorfismo da molécula está localizada nos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  que formam uma estrutura em  $\alpha$ -hélice que se apóia em uma plataforma laminar (folha  $\beta$ ), resultando numa fenda que serve de sítio de ligação para peptídeos, podendo acomodar de oito a dez resíduos de aminoácidos (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; MASSEY; McPHERSON, 2006; CHOO, 2007) (Figura 8).

As moléculas HLA classe II são heterodímeros formados por uma cadeia  $\alpha$  de 32-34kD, e uma cadeia  $\beta$  de 28-29kD, associadas de modo não covalente,

cada uma com 4 domínios: domínio de ligação ao peptídeo ( $\alpha 1$  e  $\beta 1$ ), domínios imunoglobulina-like ( $\alpha 2$  e  $\beta 2$ ), um domínio transmembrana e um citoplasmático. Os genes *HLADRA1*, *-DQA1* e *-DPA1* codificam as cadeias  $\alpha$  das moléculas DR, DQ e DP e os genes *HLA-DRB1*, *-DQB1* e *-DPB1* codificam as suas respectivas cadeias  $\beta$ . Alguns indivíduos expressam ainda uma quarta molécula denominada DR52, DR53 ou DR51, em que a cadeia DR $\alpha$  não polimórfica, é a mesma cadeia das outras moléculas HLA-DR e a cadeia  $\beta$  é codificada pelos genes *DRB3*, *DRB4* ou *DRB5*, respectivamente. O polimorfismo nas moléculas de classe II ocorre principalmente no domínio  $\beta 1$ . Os domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  formam a fenda de ligação para os peptídeos estranhos, que pode acomodar de 14 a 25 resíduos de aminoácidos (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; MASSEY; McPHERSON, 2006; CHOO, 2007) (Figura 9).

FIGURA 8 – ESTRUTURA DA MOLÉCULA HLA DE CLASSE I

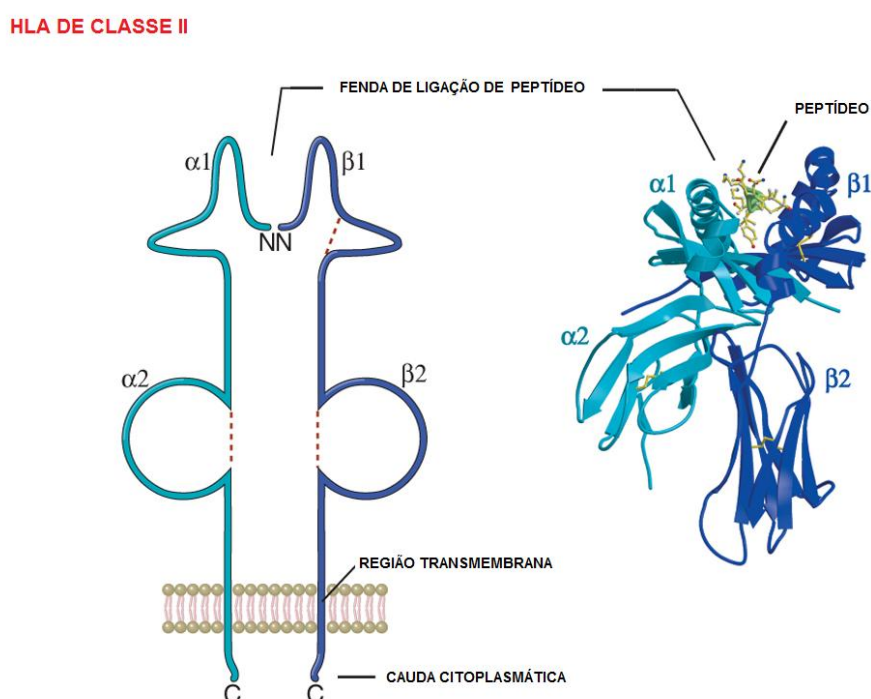


FONTE: Adaptado de ABBAS, LICHTMAN e PILLAI (2008)

O segmento  $\alpha 3$  da moléculas HLA de classe I forma um domínio semelhante à imunoglobulina, que serve de local de ligação para os co-receptores CD8 das células T citotóxica. Na molécula HLA de classe II, uma alça do segmento  $\beta 2$  liga-se ao co-receptor CD4<sup>+</sup> da célula T auxiliar (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008)

As moléculas HLA de classe I se expressam constitutivamente em todas as células nucleadas e nas plaquetas, enquanto as moléculas HLA de classe II possuem uma distribuição mais restrita, se expressando nas chamadas células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, além de alguns outros tipos celulares, como células epiteliais do timo (ERLICH; OPELZ; HANSEN, 2001; CHOO, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

FIGURA 9 – ESTRUTURA DA MOLÉCULA HLA DE CLASSE II



FONTE: Adaptado de ABBAS, LICHTMAN e PILLAI (2008)

A função primordial das moléculas HLA de classe I e II é se ligar a antígenos estranhos e apresentá-los aos linfócitos T específicos, através da interação do HLA associado ao peptídeo antigênico com o TCR. As moléculas HLA de classe I apresentam antígenos endógenos às células T-CD8<sup>+</sup>, e as moléculas HLA de classe II apresentam antígenos exógenos às células T- CD4<sup>+</sup> (ERLICH; OPELZ; HANSEN, 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; HOWELL; CARTER; CLARK, 2010).

Na apresentação de antígenos via HLA de classe I, as moléculas HLA de classe I se ligam a peptídeos resultantes da fragmentação de proteínas endógenas

localizadas no citosol. Os peptídeos fragmentados são transportados do citoplasma para o retículo endoplasmático pelas proteínas TAP, onde ocorre ligação do peptídeo com a fenda da molécula HLA de classe I. Em seguida, o complexo HLA/peptídeo é transportado através do aparelho de Golgi para a superfície celular, onde será exposto aos receptores dos linfócitos T CD8+. A apresentação de antígenos via moléculas HLA de classe II, por sua vez, começa com a captura de antígenos extracelulares por endocitose. Ocorre processamento das proteínas internalizadas em vesículas endossômicas e síntese das moléculas HLA de classe II no retículo endoplasmático. As proteínas HLA recém sintetizadas são transportadas para os endossomos associadas com uma proteína chamada de cadeia invariante (I<sub>i</sub>), que ocupa as fendas de ligação de peptídeos na molécula HLA. No interior do endossomo, a cadeia invariante é degradada, possibilitando a ligação do peptídeo processado com a molécula HLA de classe II. Posteriormente, o complexo HLA /peptídeo é transportado para a superfície celular, onde será exposto aos receptores dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (JANEWAY *et al*, 2002; MASSEY; McPHERSON, 2006; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008)

### 3.2.5 Aspectos clínicos envolvendo as moléculas *HLA*

#### 3.2.5.1 *HLA* e transplante

O principal obstáculo para o sucesso dos transplantes de órgãos sólidos e de células tronco hematopoiéticas é a rejeição mediada imunologicamente à tecidos estranhos. O sucesso do aloenxerto depende da minimização desta resposta imunológica, que pode ser obtida através da compatibilidade entre o par receptor/doador para o *HLA*, e da terapia imunossupressora do paciente (HOWELL; CARTER; CLARK, 2010). O alorreconhecimento do enxerto pode ocorrer tanto da forma direta, em que as células T do receptor reconhecem as moléculas HLA intactas do doador, quanto da forma indireta, na qual as moléculas HLA do doador são processadas por uma célula apresentadora de antígeno e apresentadas aos linfócitos T do doador (ERLICH; OPELZ; HANSEN, 2001; SAGE, 2010).

O grau de compatibilidade entre o receptor e doador para os antígenos do *MHC* é fundamental no transplante de células tronco hematopoiéticas. Quanto maior for o grau de compatibilidade *HLA* entre o par receptor/doador, para os alelos *HLA*-

A, -B, -C, -DRB1 e DQB1, menor será a incidência de complicações como a manifestação da doença do enxerto contra o hospedeiro e a falha na pega do enxerto, e melhor será a sobrevida pós transplante (PETERSDORF *et al*, 2003). Por sua vez, a presença de múltiplas incompatibilidades para HLA-A, -B, -C e -DRB1 aumenta tanto a incidência de complicações associadas ao transplante de medula óssea, quanto às taxas de mortalidade relacionadas com o procedimento (PETERSDORF, 2004; SAGE, 2010).

### 3.2.5.2 HLA e associação com doenças

A associação de um alelo HLA com uma determinada doença pode refletir o desequilíbrio de ligação entre um gene HLA e outro gene diretamente envolvido no processo patológico, ou o envolvimento direto da molécula do HLA na etiologia da doença. Dois tipos de estudos têm sido utilizados para avaliar a associação entre os alelos do sistema HLA com doenças, os estudos de ligação, realizados em famílias, e os estudos populacionais de associação (GHODKE *et al*, 2005).

A associação entre alelos HLA e doenças infecciosas mostram que a variação no sistema HLA está relacionada à resistência ou à susceptibilidade a doenças infecciosas. Os estudos de associação entre HLA e doenças infecciosas têm demonstrado que patógenos contribuem para a distribuição dos alelos HLA em populações humanas. No caso da malária, o alelo HLA-B\*53 e o HLA-DRB1\*13:02 são sobre-representados entre os indivíduos que são resistentes à malária grave, sugerindo que eles são alelos protetores para a doença. Além disso, esses alelos são mais freqüentes entre os africanos do oeste, que são expostos ao parasito que causa malária, do que em outros grupos populacionais, indicando seleção que favorece indivíduos com os alelos protetores e, desta forma, elevando a freqüência de tais alelos na população (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; BLACKWELL; JAMIESON; BURGNER, 2009).

Além das doenças infecciosas, muitas doenças auto-imunes, câncer e doenças de outras etiologias mostram associação com HLA. Em alguns casos, a associação com as moléculas HLA de classe I clássicas reflete o DL com o gene real de predisposição à doença. Entretanto, em grande número de exemplos, os riscos para as doenças estão diretamente relacionados às moléculas clássicas de classe I ou II (GHODKE *et al*, 2005; THORSBY; LIE, 2005).

Os alelos *HLA DQB1\*03:02* e *DQA1\*03* foram identificados como fatores de predisposição para a diabetes melito tipo 1, enquanto que o alelo *DQB1\*03:01* foi associado com um efeito protetor à doença (FERREIRA *et al*, 2009). A associação do *HLA B\*27* com espondilite anquilosante tem sido amplamente relatada, sendo que mais de 90% dos pacientes com a doença possuem *HLA B\*27*, enquanto a frequência deste alelo na população normal varia de 5 a 10%. Mais de 95% dos pacientes com narcolepsia possuem o alelo *DQB1\*06:02*, que constitui uma das associações mais robustas entre um alelo *HLA* e uma doença (WILLIAMS, 2001).

Cerca de 90% dos pacientes com doença celíaca possuem os alelos *DQA1\*05:01* e *DQB1\*02:01*, comparado com 20-30% dos controles saudáveis. Na artrite reumatóide, estudos populacionais realizados em diferentes etnias identificaram os alelos *DRB1\*04:01*, *DRB1\*04:04*, *DRB1\*04:05*, *DRB1\*01:01* e *DRB1\*14:02* como alelos de suscetibilidade à doença. As moléculas *HLA* codificadas por esses genes compartilham uma seqüência conservada de aminoácidos nas posições 70-74, definida como epítipo compartilhado de suscetibilidade (GHODKE *et al*, 2005).

Na infecção pelo vírus da hepatite B (HBV), os alelos *HLA-DRB1\*06*, *DRB1\*08* e *DRB1\*16* estão associados com a hepatite B crônica, e o alelo *HLA-DRB1\*07* possui papel protetor contra a infecção pelo HBV (HAN *et al*, 2005). Foi relatado que o alelo *HLA-DRB1\*13:02* está relacionado com clareamento do HBV, e diversos estudos demonstraram uma associação dos alelos *HLA-DRB1\*11:01* e *HLA-DQB1\*03:01* no processo de clareamento do HCV (MARTIN; CARRINGTON, 2005). Em inúmeros estudos relataram que o alelo *HLA-DRB1\*07* está associado com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) (CORGUI *et al*, 2008).

### 3.2.6 *HLA* e HIV

Entre os diferentes fatores genéticos do hospedeiro que afetam a infecção pelo HIV, os alelos *HLA* de classe I (-A, -B e -C) apresentam os efeitos mais significativos no controle da replicação do vírus, afetando assim, a progressão para AIDS (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; KAUR; MEHRA, 2009; BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

Inúmeros relatos de associações de proteção e suscetibilidade entre os genes *HLA* de classe I e o HIV tem sido relatadas na literatura (STEPHENS, 2005).

As principais associações de suscetibilidade incluem os grupos alélicos *A\*23*, *B\*35*, *B\*53*, *B\*58:02*, *C\*07* e *C\*16*. Já as associações de proteção relatadas com maior frequência incluem os grupos *A\*32*, *B\*14*, *B\*27*, *B\*57*, *B\*58:01*, *C\*08*, *C\*14* e *C\*18* (STEPHENS, 2012). Alguns grupos alélicos, como *B\*51*, *B\*52* e *C\*04* apresentam relatos de associações, ora de proteção, ora de suscetibilidade (CADOGAN; DALGLEISH, 2008; KAUR; MEHRA, 2009). Os relatos envolvendo os grupos *B\*27*, *B\*57* e *B\*35* constituem as associações mais consistentes envolvendo genes *HLA* de classe I e o HIV, tendo sido constantemente relatadas em diferentes estudos, envolvendo pacientes de diferentes etnias (STEPHENS, 2012)

Relatos indicam uma associação significativa entre a homozigose nos genes *HLA* de classe I e rápida progressão para AIDS, tanto em caucasianos quanto em afro-americanos. Os três loci de classe I contribuem de modo independente para a associação, e a progressão para AIDS é mais pronunciada em indivíduos homozigotos para os três loci de classe I (MARTIN; CARRINGTON, 2005; BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

A heterozigose para os genes *HLA* de classe I, por sua vez, é considerada uma vantagem seletiva contra o HIV, pois permite a apresentação de uma grande variedade de antígenos virais aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, gerando uma resposta imunológica mais ampla e diversificada (MARTIN; CARRINGTON, 2005). Foi relatado que 28-40% de indivíduos caucasianos que retardaram o desenvolvimento da AIDS por mais de dez anos eram heterozigotos para os *HLA-A*, *-B* e *-C* (KAUR; MEHRA, 2009).

Os alelos *HLA-B\*27* e *HLA B\*57* tem sido associados como alelos protetores para AIDS, uma vez que estes alelos retardam o tempo de progressão da doença. O alelo *HLA-B\*35* e o haplótipo *HLA-A1-C7-B8-DR3-DQ2*, por sua vez, estão relacionados com progressão acelerada para AIDS, sendo considerados como fatores de suscetibilidade na infecção pelo HIV-1 (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; MARTIN; CARRINGTON, 2005; KAUR; MEHRA, 2009).

O alelo *HLA-B\*57* apresenta o efeito protetor mais significativo em relação à AIDS, uma vez que tal alelo exerce um controle efetivo na carga viral, retardando de forma expressiva a evolução para AIDS. Relatos indicam que a frequência do *HLA-B\*57* está aumentada nos controladores de elite, que mantêm a viremia em níveis indetectáveis na ausência de TARV. A apresentação de três ou quatro epítomos



imunodominantes em regiões conservadas do antígeno Gag pelo HLA-B\*57 aos linfócitos T CD8+, controla a replicação viral do HIV, já que direciona a produção de variantes de escape do HIV, com baixa capacidade de replicação (GOULDER; WATKINS, 2008; KAUR; MEHRA, 2009). A resposta das células T CD8+ contra epítomos destas variantes de escape parece ser fundamental no bloqueio da atividade replicativa do HIV (BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

O alelo *HLA-B\*27* também oferece proteção em termos de controle da replicação viral e progressão para AIDS. O mecanismo de proteção do *HLA-B\*27*, de maneira semelhante ao *HLA-B\*57*, envolve a indução de uma resposta do linfócito CD8+ contra um epítomo Gag altamente conservado, denominado KK10. Sob a pressão dos linfócitos T CD8+ restritos ao *HLA-B\*27*, o HIV passa por um complexo padrão de mutações que, eventualmente, pode resultar em vírus com capacidade de replicação deficiente. O desenvolvimento de variantes de escape com esta característica está relacionada com progressão lenta para AIDS (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; GOULDER; WATKINS, 2008; KAUR; MEHRA, 2009).

O *HLA-B\*35*, que é encontrado em associação haplotípica com *HLA-C\*04*, é o alelo mais frequentemente associado com suscetibilidade à infecção pelo HIV e progressão rápida para AIDS. A progressão acelerada da AIDS entre indivíduos *HLA-B\*35* está diretamente relacionada com um subconjunto de alelos do *HLA-B*, denominados *B\*35-Px*, que engloba os alelos *HLA-B\*35:02*, *HLA-B\*35:03*, *HLA-B\*35:04* e *HLA-B\*53:01*. Os linfócitos T CD8+ restritos ao *HLA-B\*35* raramente reconhecem epítomos Gag na infecção primária, e por isso não são capazes de estabelecer uma resposta protetora contra o HIV (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003; BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011).

Diferentemente dos genes *HLA* de classe I, os alelos *HLA* de classe II não apresentam associações consistentes com a infecção pelo HIV e progressão para AIDS. Alguns estudos relatam efeitos de proteção e de suscetibilidade, para os alelos *HLA-DRB1\*01* e *DRB1\*15:03*, respectivamente (BASHIROVA; THOMAS, CARRINGTON, 2011). O haplótipo *HLA-DRB1\*13:01/02-DQB1\*06* tem sido associado com controle da carga viral em pacientes em TARV (MALHOTRA *et al*, 2001, MARTIN; CARRINGTON, 2005).

Vários estudos têm associado o alelo HLA-B\*5701 com a manifestação de hipersensibilidade ao antirretroviral abacavir. Como a presença do alelo *HLA-*

*B\*57:01* possui um grande valor preditivo no diagnóstico da hipersensibilidade ao abacavir, a tipagem deste alelo tem sido preconizada em indivíduos com indicação de terapia com abacavir (KAUR; MEHRA, 2009; PHILLIPS *et al*, 2011).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo faz parte de um amplo projeto intitulado “Investigação do polimorfismo gênico de marcadores da resposta imune inata na infecção por HIV”, desenvolvido sob a coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara José Taborda de Messias-Reason. Tal projeto foi submetido à análise e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), tendo sido devidamente aprovado e registrado sob o número 1409.074/2007-04.

### 4.2 CASUÍSTICA

#### 4.2.1 Pacientes

O presente estudo utilizou 306 amostras de pacientes HIV positivos, coletadas de agosto de 2007 a agosto de 2010. Todos os pacientes eram maiores de 18 anos, diagnosticados segundo o protocolo da Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde, e atendidos no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR). Estes pacientes são participantes do projeto “Investigação do polimorfismo gênico de marcadores da resposta imune inata na infecção por HIV”, e concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da pesquisa, aprovada e registrada no CEP com o número 2007021749.

Foi realizada revisão dos prontuários de todos os pacientes para compilação dos seguintes dados:

- Data de diagnóstico da infecção pelo HIV;
- Data do início da TARV;
- Carga viral antes do início da TARV;
- Contagens de CD4<sup>+</sup> antes do início da TARV (CD4<sup>+</sup> Nadir);
- Manifestação de doenças oportunistas.

Os pacientes que não apresentavam contagens de CD4<sup>+</sup> e carga viral antes do início da TARV foram excluídos. Com base neste parâmetro de exclusão, foram considerados 286 pacientes para investigação no presente estudo.

O desenho do estudo seguiu os critérios propostos por Saah *et al.* (1998), Gao *et al.* (2001) e Trachtenberg *et al.* (2003), no qual os pacientes HIV positivos são divididos em um grupo com AIDS, e outro grupo sem AIDS, com o intuito de estudar a influência dos genes *HLA* de classe I no prognóstico diferencial para AIDS. Os critérios do CDC para definição de casos de AIDS foi utilizado para caracterização dos grupos AIDS e não AIDS (SCHNEIDER *et al.*, 2008).

### 4.3 METODOLOGIA

#### 4.3.1 Extração de DNA das amostras

A extração do DNA genômico dos pacientes foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Serviço de Anatomia Patológica do HC/UFPR, utilizando o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.3.2 Quantificação do DNA nas amostras

As amostras de DNA genômico dos pacientes foram quantificadas em um espectrofotômetro NanoDrop® 2000. Todas as amostras foram avaliadas para os valores de concentração e pureza da amostra (relação 260/280).

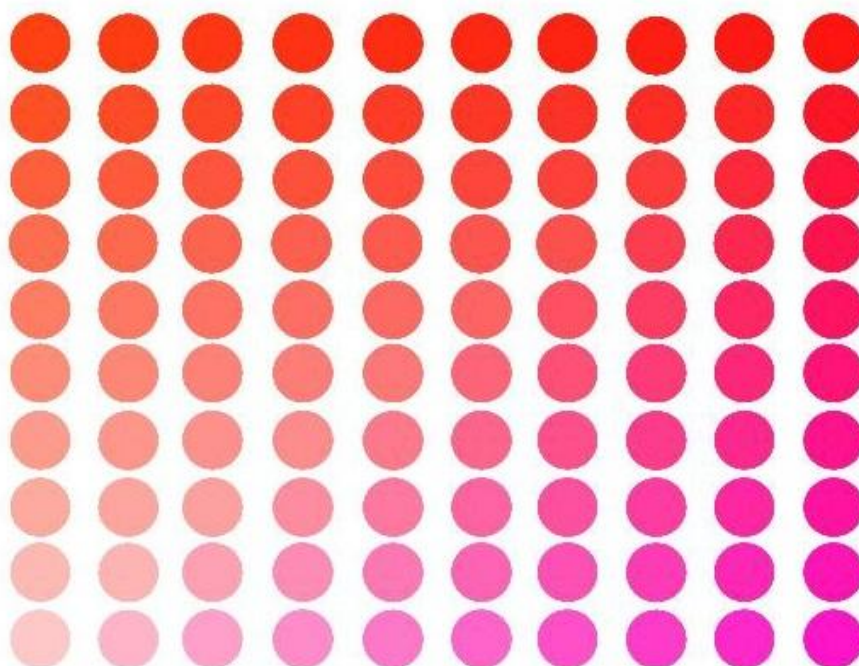
#### 4.3.3 Tipificação HLA por PCR – SSO

##### 4.3.3.1 Princípio da tecnologia Luminex

A tipificação *HLA* por PCR-SSOP (Polymerase Chain Reaction – Specific Sequence Oligonucleotides Probes) utiliza a tecnologia Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX, USA), cujo princípio se baseia na utilização de microesferas codificadas por diferentes tonalidades de fluorescência (Figura 10) na citometria de fluxo. As diferentes tonalidades de fluorescência são produzidas pela mistura de dois corantes fluorescentes (*red* e *infrared*) em diferentes proporções, conferindo uma identidade para cada microesfera em particular. As diferentes microesferas são

revestidas com sondas específicas para os alelos *HLA*, e cada microesfera de uma determinada tonalidade está conjugada a um único tipo de sonda (HEINEMANN, 2009; DUNN, 2011; BONTADINI, 2012).

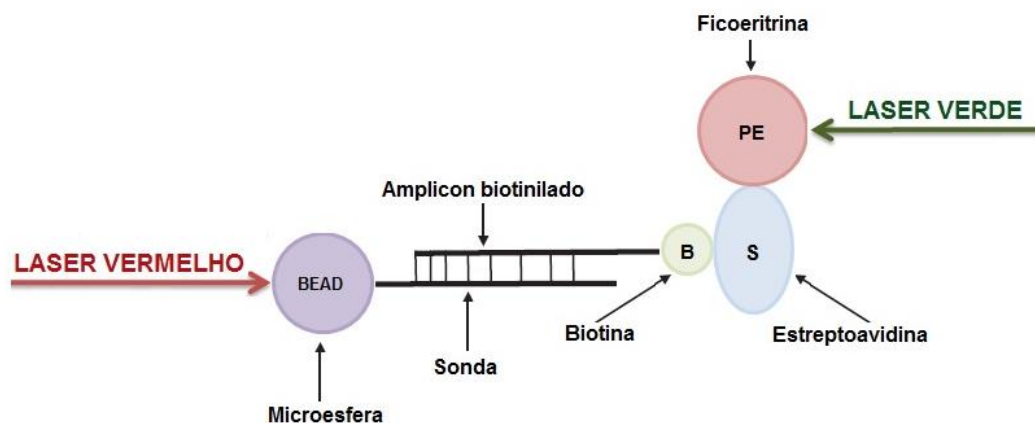
FIGURA 10 – TONALIDADES DE FLUORESCÊNCIA DAS MICROESFERAS DO KIT LABTYPE PCR-SSO



FONTE: O AUTOR

O analisador de fluxo *LABScan 100™* utiliza dois lasers, um vermelho e um verde, para identificar a fluorescência da microesfera e a fluorescência do marcador da reação de hibridização, respectivamente (Figura 11). O laser vermelho possui comprimento de onda de 633nm, e excita os corantes internos da microesfera a fim de identificar qual das microesferas está sendo lida. O laser verde, que possui comprimento de onda de 532nm, reconhece se a microesfera caracterizada pelo laser vermelho, está ou não marcada com a estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE), que é o marcador de fluorescência na reação de hibridização da PCR-SSO (HEINEMANN, 2009; DUNN, 2011; BONTADINI, 2012).

FIGURA 11 – AÇÃO DOS LASERS NO LABSCAN100™ DURANTE A REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO NA PCR-SSO

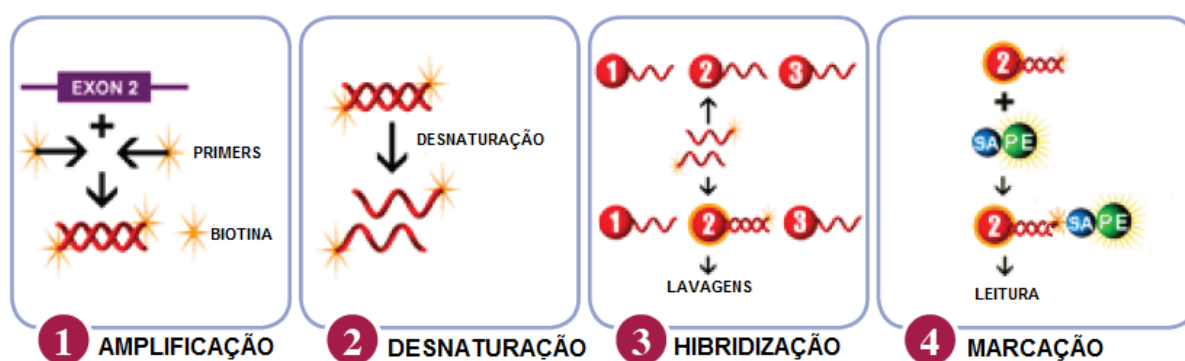


FONTE: O AUTOR

#### 4.3.3.2 PCR-SSO LABType®

A tipificação HLA dos loci *HLA-A*, *-B* e *-C* foi realizada pela técnica PCR-SSOP utilizando o kit LABType® (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA). A técnica PCR-SSO é composta por quatro etapas: amplificação do DNA alvo; eletroforese para análise do material amplificado; hibridização com as microesferas e análise dos dados obtidos no software HLA Fusion (Figura 12).

FIGURA 12 - PRINCÍPIO DA TIPIFICAÇÃO *HLA* POR PCR-SSO



FONTE: Adaptado de [http://www.onelambda.com/source/pdffiles/productsheets/LType\\_ps\\_r200711.pdf](http://www.onelambda.com/source/pdffiles/productsheets/LType_ps_r200711.pdf)

Na etapa de amplificação, o DNA alvo foi amplificado por uma PCR, utilizando *primers* específicos para cada locus. Os *primers* são marcados com biotina e específicos para os éxons 2 e 3 dos genes *HLA-A*, *-B* e *-C*. Foi utilizada a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, USA), e os demais reagentes da mistura de reação (dNTPs, tampão e MgCl<sub>2</sub>) estão presentes na solução D-mix do kit LABType®. A amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700, seguindo o protocolo de amplificação descrito na tabela abaixo (Tabela 2).

TABELA 2 – PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DA TIPIFICAÇÃO *HLA* POR PCR-SSO

I. <i>Hold</i>	94°C – 2 minutos *(Quando se utiliza <i>Taq</i> Polimerase Platinum)
II. <i>Hold</i>	96°C – 3 minutos
III. 5 ciclos	96°C – 20 segundos 60°C – 20 segundos 72°C – 20 segundos
IV. 30 ciclos	96°C – 10 segundos 60°C – 15 segundos 72°C – 20 segundos
V. <i>Hold</i>	72°C – 10 minutos
VI. <i>Hold</i>	04°C – infinito

FONTE: O AUTOR

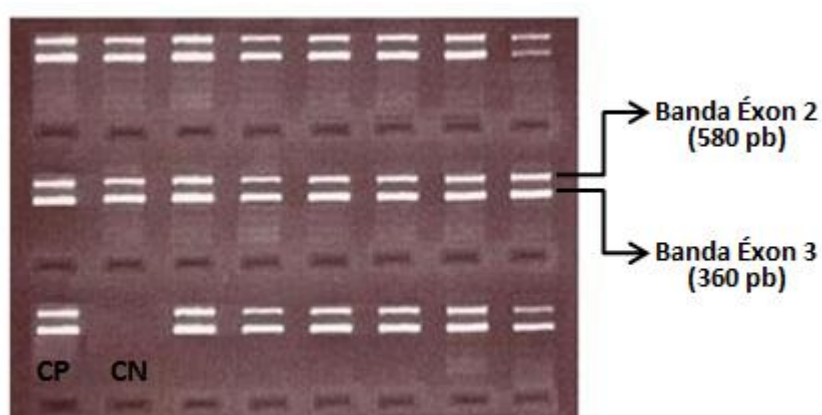
Para verificar a eficácia do procedimento técnico e dos reagentes utilizados, foram incluídos, em cada bateria de amplificação, um controle negativo com água ultrapura e um controle positivo com DNA de uma célula de referência do programa de qualidade da Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA).

Após a etapa de amplificação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para separar os fragmentos de DNA amplificados pela PCR. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2,5% com brometo de etídeo, sob voltagem de 150 V por dez minutos. Após a corrida eletroforética, os fragmentos amplificados foram visualizados no gel exposto à luz ultravioleta no transiluminador UV. O padrão das bandas no gel foi fotografado por um sistema de fotodocumentação acoplado ao

transiluminador. Se o DNA foi amplificado corretamente, verifica-se a presença de duas bandas coradas com brometo de etídeo, referentes aos éxons 2 (fragmento com 580 pb) e 3 (fragmento com 360 pb) dos *loci HLA-A, -B e -C* (Figura 13).

A realização da eletroforese assegura que somente as amostras amplificadas que apresentem bandas adequadas para os éxons 2 e 3 dos *HLA-A, -B* e *-C* sejam submetidas à etapa de hibridização.

FIGURA 13 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DA TIPIFICAÇÃO *HLA* POR PCR-SSO



FONTE: O AUTOR

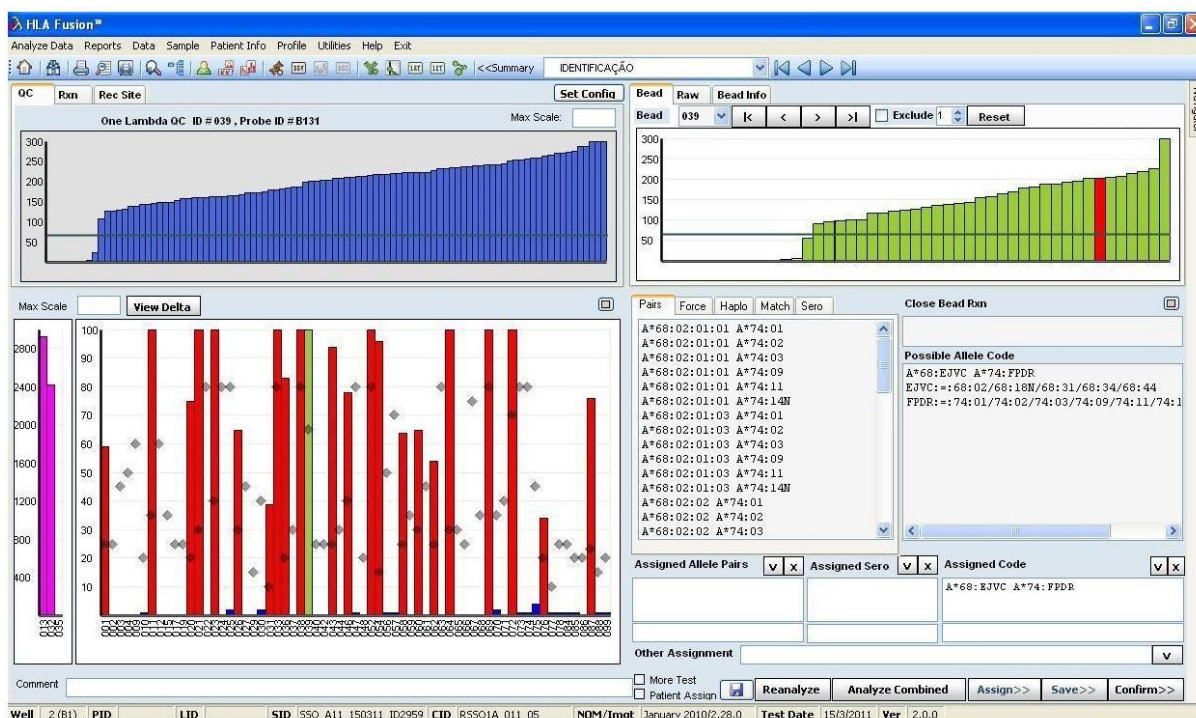
NOTA: CP – Controle Positivo da UCLA; CN – Controle Negativo com água ultrapura

Na etapa de hibridização, o DNA amplificado é desnaturado e submetido à hibridização com um conjunto de sondas de oligonucleotídeos seqüência específica, que estão imobilizadas nas microesferas de poliestireno codificadas por coloração fluorescente. Após a etapa de hibridização, as microesferas são submetidas a um processo de lavagem e posterior reação com um conjugado de estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE), que se liga ao DNA amplificado biotilado. Na última fase, o analisador de fluxo LABScan<sup>TM</sup> 100 identifica a intensidade da fluorescência da ficoeritrina em cada microesfera (Figura 11).

O método de análise da tipificação *HLA* por PCR-SSO reverso utiliza o software HLA Fusion (Figura 14) para determinar os alelos dos genes *HLA*. A análise do padrão de reatividade de cada amostra de DNA em relação ao conjunto de sondas conjugadas às microesferas permite o estabelecimento do genótipo *HLA* em média resolução.



FIGURA 14 – SOFTWARE HLA FUSION PARA ANÁLISE DA TIPIFICAÇÃO *HLA* POR PCR-SSO



FONTE: O AUTOR

#### 4.3.3.3 Critérios de análise e liberação dos resultados

Para garantir acurácia e segurança dos resultados da tipificação *HLA* por PCR-SSO, os seguintes parâmetros de análise no HLA Fusion foram levados em consideração:

- Valor da fluorescência bruta (Raw) das microesferas 13 (microesfera controle positivo do éxon 2) e 32 (microesfera controle positivo do éxon 3) acima de 1000;
- Valor da fluorescência bruta (Raw) da microesfera 35 (microesfera controle negativo) abaixo de 50;
- Contagem de microesferas acima de 80;
- Até dois ajustes de cut-off por amostra;
- Dupla análise, realizada em dias diferentes.

Os resultados das tipificações HLA que apresentarem ambiguidades foram resolvidas da seguinte maneira:

- Ambiguidades que possuam um alelo comum e um alelo raro foram resolvidas por PCR-SSP;
- Ambiguidades que possuam dois alelos raros (probabilidade de ocorrência menor que  $1 / 2,5 \times 10^9$ ), não foram resolvidas, e os alelos comuns presentes na ambigüidade foram considerados como resultado final.

A designação dos alelos como “comuns” e “raros” foi realizada conforme lista de alelos raros versão 3.7.0 do IMGT HLA database, disponível em <http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/Rare Allele Lists/Biannual Rare Allele Lists.aspx>.

Para a realização das análises estatísticas, os resultados da tipificação *HLA* serão considerados em baixa resolução (dois primeiros dígitos), que corresponde ao grupo alélico do gene *HLA*.

#### 4.3.4 Análise Estatística

As frequências alélicas foram obtidas através de contagem direta. A frequência de um alelo (FA) é obtida somando-se o número de indivíduos heterozigotos para aquele alelo (Het) mais duas vezes o numero de indivíduos homozigotos (Hom) e dividindo-se o resultado pelo dobro do número total de indivíduos (n). As frequências haplotípicas foram obtidas por máxima verossimilhança com o algoritmo EM, incluído no pacote de programas ARLEQUIN v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para avaliação das hipóteses de equilíbrio de Hardy-Weinberg, segundo Guo e Thompson (1992), e de diferenciação populacional, segundo Raymond e Rousset (1995) e Goudet *et al.* (1996), foi utilizado o pacote de programas ARLEQUIN v.3.5. O teste exato de diferenciação populacional foi configurado com 10.000 passos da cadeia de Markov e 1.000 passos de desmemorização. O calculo de desequilíbrio de ligação (valores de  $D'$  e  $p$ ) foi feito com o pacote de programas ARLEQUIN v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), adotando como limite de significância  $p=0,05$ .

Os dados obtidos foram registrados em planilha eletrônica *Microsoft Excel*®, conferidos e exportados para posterior análise estatística no software *Statistica - Statsoft*®.

A estimativa da diferença de variáveis contínuas de distribuição normal foi realizada pelo teste paramétrico, teste t de *Student* e Anova enquanto que para variáveis de distribuição assimétrica, o teste não-paramétrico, teste de Mann-Whitney e Anova de Kruskal-Wallis foram utilizados. Para a estimativa de diferença de variáveis categóricas foram aplicados os testes exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson. Quando apropriado, foi calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. O modelo de Regressão Logística Multivariada foi aplicado para identificar variáveis preditoras para os diferentes desfechos estudados. Para todos os testes foi considerado um nível mínimo de significância de 5% e poder de teste mínimo de 85%. O erro do tipo II pode ter ocorrido para as associações estimadas como não significativas em virtude do tamanho da amostra nos estudos de grupos com número reduzido.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA

O grupo de estudos foi constituído de 286 pacientes HIV+, com média de idade de  $43,7 \pm 11,1$  anos (20,0 a 76,0 anos), distribuídos de forma semelhante quanto ao sexo, 141 masculinos (49,3%) e 145 femininos (50,75%), com 94,7% deles de etnia caucasiana.

A maior parte dos pacientes apresentou faixa etária entre 31 e 50 anos (64,6%), sendo 84 pacientes (29,3%) na faixa etária de 31 a 40 anos e 101 pacientes (35,3%) na faixa etária de 41-50 anos. O gráfico 1 ilustra a distribuição em relação à faixa etária nos pacientes do estudo.

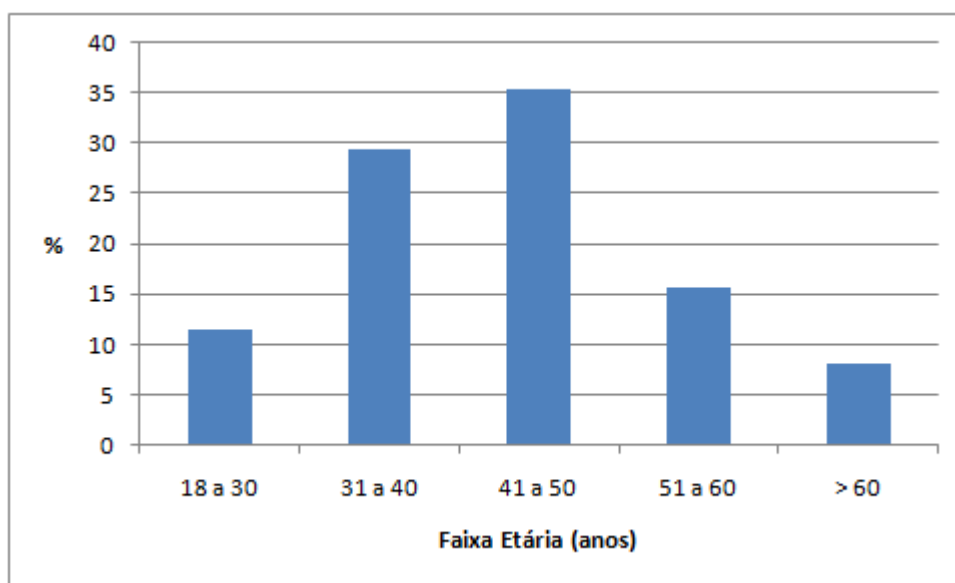


GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA NOS PACIENTES HIV+

Um total de 197/286 (68,8%) pacientes foram diagnosticados após o ano 2000. Dos 88 casos diagnosticados antes do ano 2000, 4/286 (1,39%) casos apresentaram diagnóstico antes de 1990. O gráfico 2 ilustra a distribuição dos casos (em números) em relação ao ano de diagnóstico.

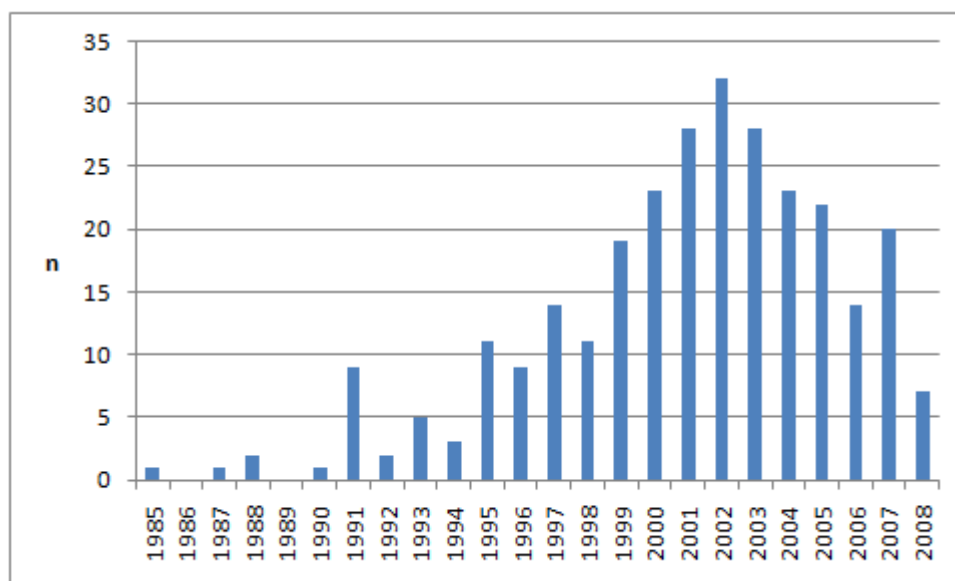


GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O ANO DE DIAGNÓSTICO NOS PACIENTES HIV

Com relação ao grupo de risco para aquisição do HIV, 130/286 (45%) pacientes foram caracterizados no grupo de risco sexual, 23/286 (8%) pacientes eram usuários de drogas injetáveis, e 17/286 (6%) pacientes adquiriram o HIV por meio de transfusão sanguínea. O gráfico 3 ilustra a distribuição dos casos (em %) em relação aos grupos de risco. Nossos resultados diferem dos dados de grupo de risco obtidos no estudo de associação conduzido por Huang *et al* (2009), que verificou aumento expressivo no grupo de risco de usuários de drogas injetáveis (31,2%), e menor representação do grupo de risco de transfusão sanguínea (2,2%). Os achados de Silva e cols.(2010), por outro lado, indicam participação significativa do grupo de risco sexual (84,8%). Essas diferenças em relação aos nossos dados podem ser explicadas pelo número significativo de pacientes (36%) que não apresentavam dados sobre grupo de risco nos seus respectivos prontuários.

Não se observou diferença significativa entre os pacientes com e sem AIDS no que se refere aos grupos de risco ( $p = 0,13$ ) (Gráfico 4). Este achado é corroborado por Huang *et al* (2009), que não observaram diferenças significativas entre os pacientes com e sem AIDS, em relação aos grupos de risco sexual, transfusão sanguínea e usuários de drogas injetáveis.

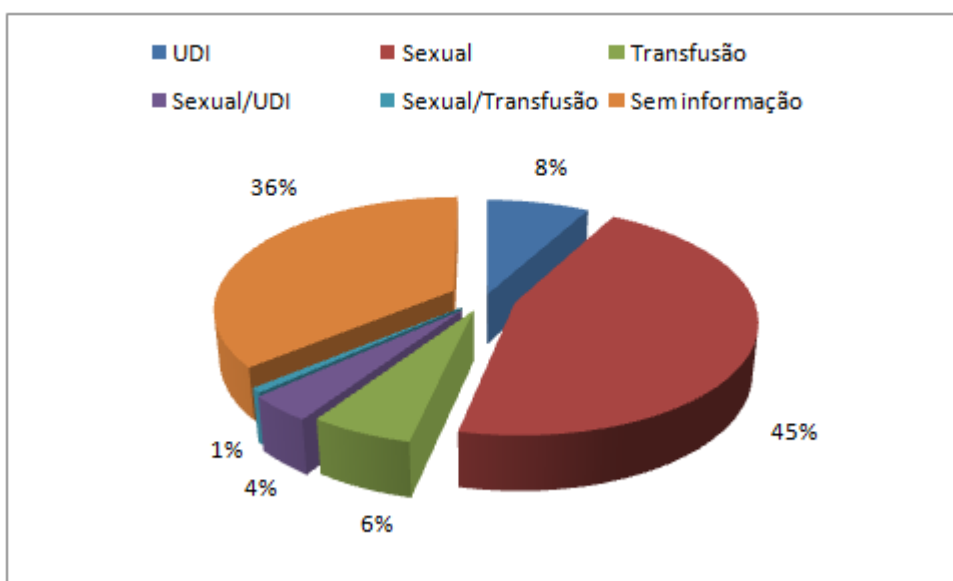


GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O GRUPO DE RISCO NOS PACIENTES HIV

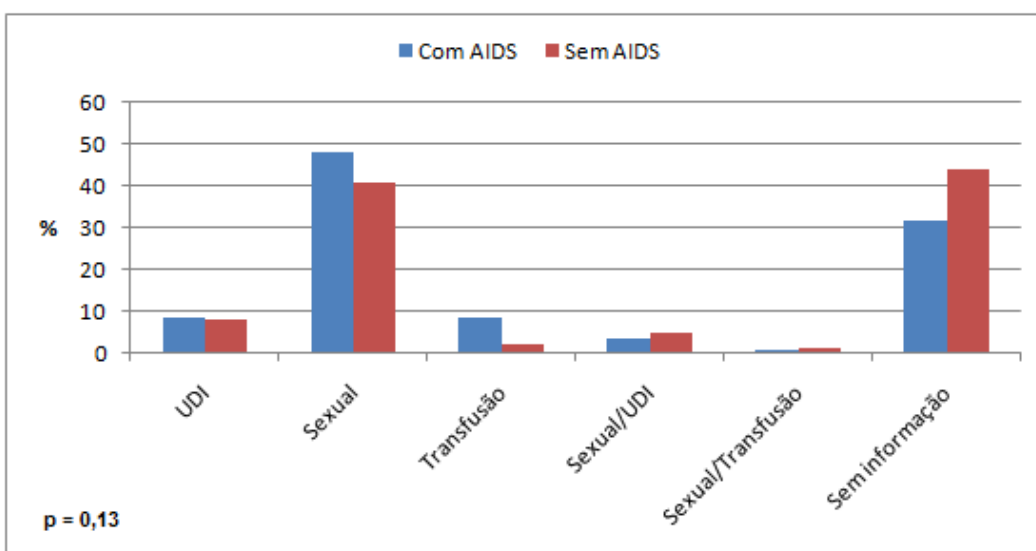


GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O GRUPO DE RISCO NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

Do total de pacientes, 35/286 (12,2%) não receberam TARV e 183/286 (64,0%) cursaram com AIDS. A mediana da contagem de células T CD4+ dos pacientes HIV+ foi de 195 células /mm<sup>3</sup>, variando de 3 a 1183 células /mm<sup>3</sup> (IC 95% = 21,0 – 575,0). Para a carga viral, a mediana foi 57.950 cópias/ml, variando de 50 a 840.000 cópias/ml (IC 95% = 1200 – 542.000). Huang e cols.(2009) relataram

mediana da contagem de células T CD4<sup>+</sup> de 409,4 células /mm<sup>3</sup> em seus pacientes HIV+. Silva e cols. (2010), por sua vez, observaram mediana da contagem de células T CD4<sup>+</sup> de 303 células /mm<sup>3</sup> e mediana da carga viral de 107.840 cópias/ml e, valores que diferem dos nossos achados. Uma possível explicação para essas diferenças deve-se ao número aumentado de pacientes com AIDS (64,0%) entre o total dos pacientes HIV+.

Não houve diferença significativa em relação à etnia entre os grupos AIDS e NÃO AIDS ( $p = 0,54$ ). Não se observou diferença entre os grupos no que se refere à distribuição do ano de diagnóstico ( $p = 0,51$ ). No grupo com AIDS, a distribuição quanto ao sexo foi semelhante, enquanto no grupo NÃO AIDS predominou o sexo feminino ( $p < 0,01$ ) (Gráfico 5). Em relação à idade observou-se média superior no grupo com AIDS em relação ao NÃO AIDS ( $45,8 \pm 10,9$  versus  $39,8 \pm 10,3$ ;  $p < 0,01$ ).

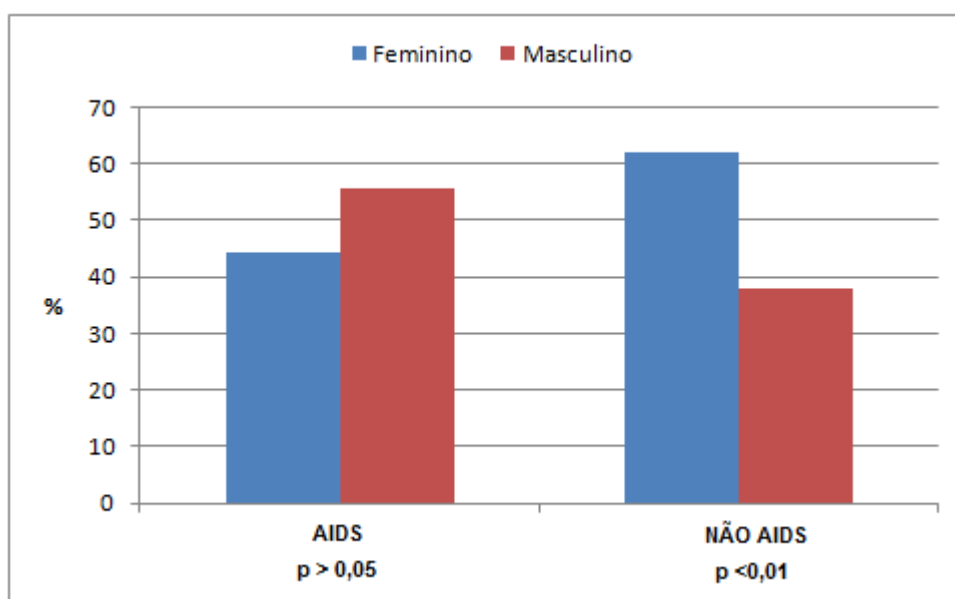


GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM O SEXO NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

O gráfico 6 ilustra a distribuição dos casos (em %) em relação à faixa etária nos grupos AIDS e NÃO AIDS ( $p < 0,001$ ). Os grupos AIDS e NÃO AIDS apresentaram distribuição similar de casos nas faixas etárias de 31-40, 41-50 e 51-60 anos. No entanto, verificou-se predomínio do grupo NÃO AIDS na faixa etária de 18-30 anos (20,3% x 6,5%) ( $p < 0,01$ ), enquanto na faixa etária acima de 60 anos,

houve predomínio do grupo AIDS (11,4% x 1,9%) ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo NÃO AIDS. Estes achados podem estar relacionados com o fenômeno imunológico de imunosenescência, no qual se verifica declínio progressivo da função imunológica inata e adquirida, aumentando assim a suscetibilidade dos indivíduos idosos para doenças auto-imunes, câncer e infecções (DEEKS *et al.*, 2012; HIGH *et al.*, 2012).

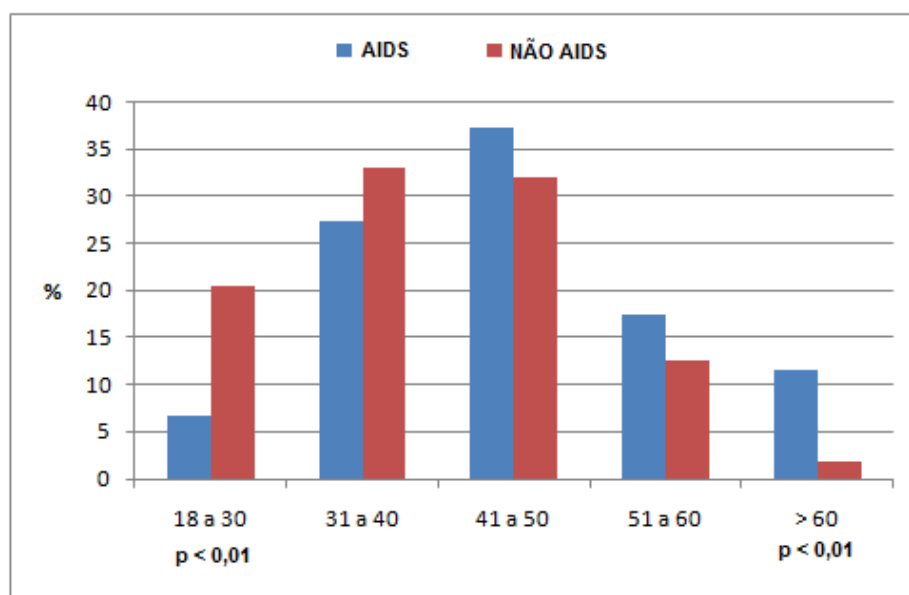


GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

A tabela 3 apresenta a mediana com intervalo de confiança 95% da carga viral e contagem de  $CD4^+$  dos grupos AIDS e NÃO AIDS. O grupo AIDS apresentou valor significativamente maior de mediana de carga viral em relação ao grupo NÃO AIDS (126.000 cópias/ml x 26.000 cópias/ml) ( $p < 0,001$ ). Já para a contagem de células T  $CD4^+$ , o grupo AIDS apresentou valor de mediana significativamente menor que o valor observado para o grupo NÃO AIDS (96,0 células/mm<sup>3</sup> x 399,0 células/mm<sup>3</sup>) ( $p < 0,001$ ). Essas diferenças indicam que os grupos AIDS e NÃO AIDS estão bem caracterizados segundo os critérios descritos por Schneider e cols. (2008). Esta heterogeneidade garante que as associações, baseadas nas frequências alélicas dos genes *HLA* de classe I nestes diferentes grupos, sejam confiáveis.



TABELA 3 – MEDIANA E IC 95% DA CONTAGEM DE CD4<sup>+</sup> E CARGA VIRAL NOS PACIENTES HIV+

	COM AIDS (n = 183)	SEM AIDS (n = 103)	*p
Carga Viral (cópias/ml)	126.000 (5270-750.000)	26.000 (400-147.000)	< 0,001
CD4 <sup>+</sup> (células/mm <sup>3</sup> )	96,0 (13-281)	399,0 (224 – 771)	< 0,001

NOTA: \*Teste de Mann-Whitney

Os gráficos 7 e 8 ilustram os valores, em mediana, da carga viral e contagens de células TCD4<sup>+</sup> nos dois grupos, AIDS e NÃO AIDS, respectivamente.

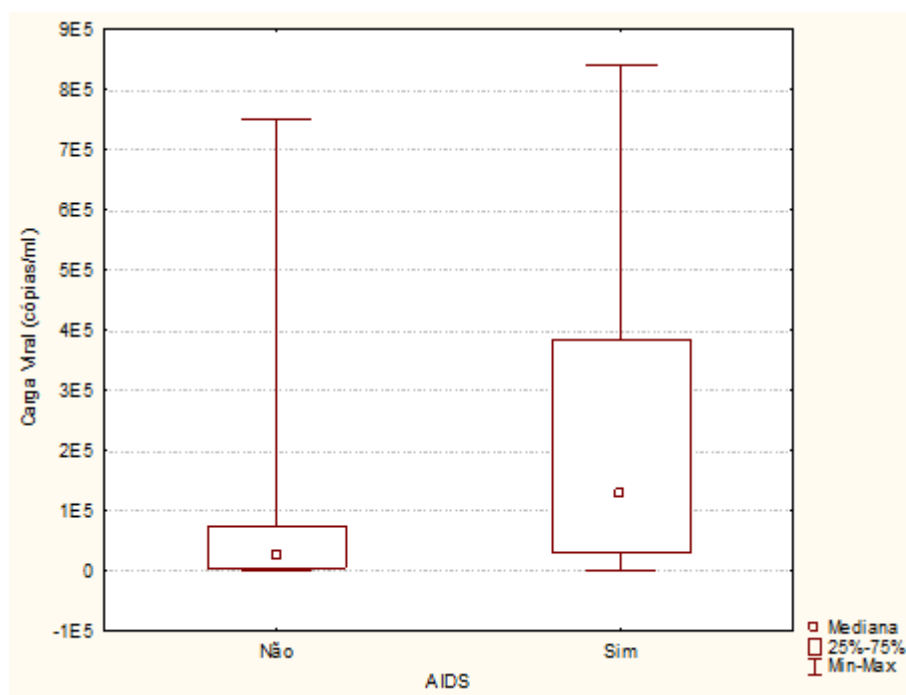


GRÁFICO 7 - CARGA VIRAL NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

NOTA: Teste de Mann-Whitney

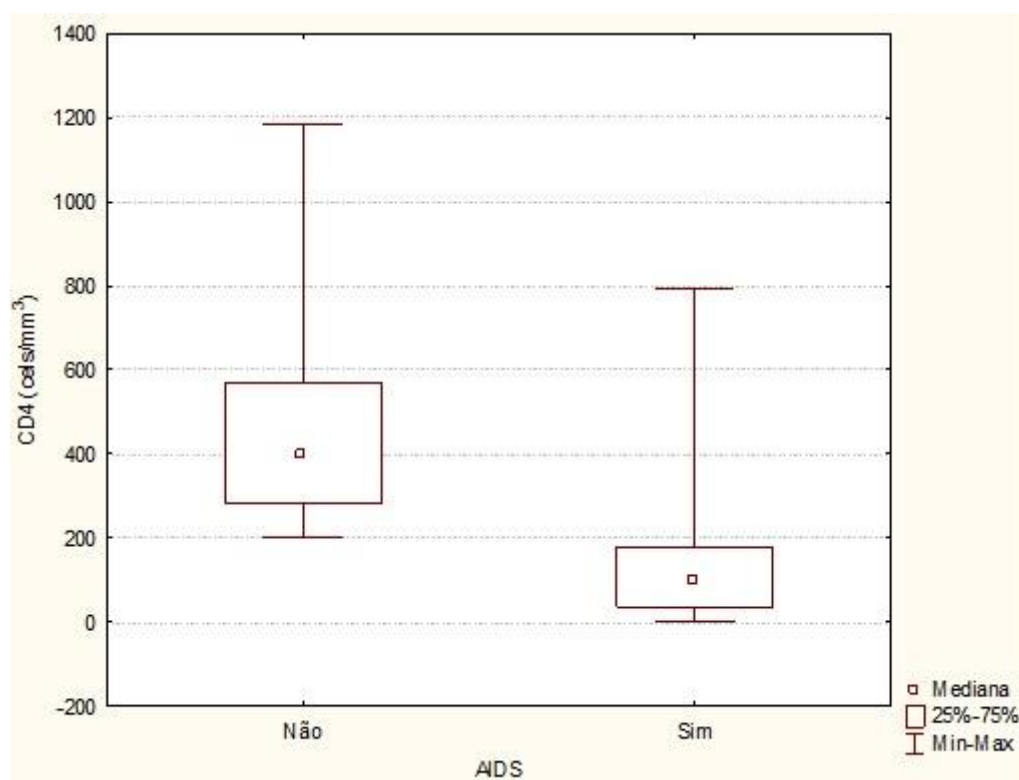


GRÁFICO 8 - CONTAGEM DE CD4<sup>+</sup> NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

NOTA: Teste de Mann-Whitney

Os 183 (100%) pacientes com AIDS receberam TARV, enquanto que 68/103 (66,0%) pacientes do grupo NÃO AIDS receberam a terapia ( $p < 0,001$ ). Doenças oportunistas ocorreram em 149/183 (81,4%) pacientes com AIDS. As doenças oportunistas registradas no grupo AIDS estão listadas na tabela 4. As doenças oportunistas encontradas com maior frequência foram candidíase oral e esofágica (30,6%), neurotoxoplasmose (16,9%) e tuberculose 16,3%). Histoplasmose e neurocisticercose foram relatadas uma única vez.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE DOENÇAS OPORTUNISTAS NO GRUPO AIDS

DOENÇAS OPORTUNISTAS	GRUPO AIDS (n = 183)	
	n	%
Candidíase oral e esofágica	56	30,6
Neurotoxoplasmose	31	16,9
Tuberculose	30	16,3
Pneumocistose	19	10,3
Herpes Zoster	18	9,8
Criptococose	16	8,7
Sarcoma de Kaposi	13	7,1
Criptosporíase	5	2,7
Linfoma	4	2,1
Isosporíase	3	1,6
Citomegalovirose	2	1,1
Histoplasmose	1	0,5
Neurocisticercose	1	0,5

FONTE: O AUTOR

## 5.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para os *loci HLA-A*, *-B* e *-C* no grupo AIDS (Tabela 5). Os *loci HLA-A*, *-B* e *C* apresentaram altas taxas de heterozigosidade, com valores de 88,5%, 93,9% e 85,8%, respectivamente.

No grupo NÃO AIDS, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado para os *loci HLA-A* e *-B*, enquanto para o *HLA-C* verificou-se um leve desvio ( $p=0,032$ ), sugerindo um excesso de homozigose para este gene na população estudada (Tabela 6).

Genótipos HLA só podem ser definidos como verdadeiros homozigotos ou heterozigotos através da análise em nível alélico, obtida por método de tipificação de alta resolução. Deste modo, observa-se com frequência que indivíduos caracterizados como homozigotos, em nível de grupo alélico (primeiro e segundo dígito da nomenclatura *HLA*), passam a ser considerados heterozigotos, quando na

análise dos seus alelos específicos (terceiro e quarto dígito na nomenclatura *HLA*) (LI *et al*, 2007). Como os resultados da tipificação *HLA* por PCR-SSO não são considerados de alta resolução, e portanto, não definem o gene em nível alélico, a taxa de homozigose do *HLA-C* pode estar falsamente aumentada, o que pode explicar o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg observado para *HLA-C*.

TABELA 5 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG POR *LOCUS* NO GRUPO AIDS

<b>Locus</b>	<b>n</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>P</b>	<b>D. P.</b>
<i>HLA-A</i>	183	0.88525	0.88538	0.14414	0.00025
<i>HLA-B</i>	183	0.93989	0.93378	0.58563	0.00024
<i>HLA-C</i>	183	0.85792	0.88466	0.47321	0.00032

FONTE: Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010)

**LEGENDA:** n = número de pacientes; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão.

TABELA 6 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG POR *LOCUS* NO GRUPO NÃO AIDS

<b>Locus</b>	<b>n</b>	<b>Het. Obs.</b>	<b>Het. Esp.</b>	<b>P</b>	<b>D. P.</b>
<i>HLA-A</i>	103	0.82524	0.86957	0.10411	0.00024
<i>HLA-B</i>	103	0.92233	0.94544	0.70992	0.00032
<i>HLA-C</i>	103	0.87379	0.88061	0.03296*	0.00015

FONTE: Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010)

**LEGENDA:** n = número de pacientes; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão

Observou-se DL entre os *loci HLA-A*, *-B* e *-C* ( $p < 0,001$ ). Os DL mais intensos foram observados para os haplótipos *B\*51-C\*14* ( $D' = 0,738$ ;  $p = 0,000$ ), *B\*07-C\*07* ( $D' = 0,529$ ;  $p = 0,000$ ), *B\*40-C\*03* ( $D' = 0,488$ ;  $p = 0,000$ ), *B\*35-C\*04* ( $D' = 0,482$ ;  $p = 0,000$ ).

Considerando as frequências alélicas dos *loci* estudados, o teste exato de Raymond e Rousset (1995) foi aplicado para evidenciar a diferenciação populacional, revelando a existência de diferenças significativas entre os grupos AIDS e NÃO AIDS, em relação ao *HLA-B* ( $p = 0,02$ ) e *HLA-C* ( $p = 0,03$ ), e uma semelhança entre os grupos AIDS e NÃO AIDS em relação ao *HLA-A* ( $p > 0,05$ ).

(Tabela 7). Esses resultados sugerem a existência de associações para os *loci HLA-B* e *-C* com a manifestação de AIDS nos pacientes HIV+ em estudo.

TABELA 7 - TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS PARA *HLA DE CLASSE I*

		AIDS	NÃO AIDS
<b>HLA-A</b>	<b>AIDS</b>	-	0.72272 ± 0.017
	<b>NÃO AIDS</b>	0.72272 ± 0.017	-
<b>HLA-B</b>	<b>AIDS</b>	-	0.02771 ± 0.009
	<b>NÃO AIDS</b>	0.02771 ± 0.009	-
<b>HLA-C</b>	<b>AIDS</b>	-	0.03096 ± 0.003
	<b>NÃO AIDS</b>	0.03096 ± 0.003	-

FONTE: Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010)

#### 5.4 HOMOZIGOSE E HETEROZIGOSE PARA OS *LOCIS HLA-A, -B E -C*

Em relação à homozigose e heterozigose, caracterizadas segundo os resultados de baixa resolução (grupo alélico), dos 286 pacientes em estudo, 247 eram heterozigotos (86,3%) e 35 eram homozigotos (12,2%) para *HLA-A*. Para *HLA-B*, verificou-se que 268 pacientes eram heterozigotos (93,7%) e 16 eram homozigotos (5,6%), enquanto para *HLA-C*, foi observada homozigose em 37 pacientes (12,9%) e heterozigose em 247 pacientes (86,3%).

Na tabela 8 estão apresentados os dados de contagem de células T CD4+, carga viral, manifestação de doenças oportunistas e indicação de TARV dos pacientes HIV homozigotos e heterozigotos, para *HLA-A, -B e -C*.

Embora existam diferentes relatos na literatura (CARRINGTON et al., 1999, 2001; O'BRIEN et al., 2001), indicando associação entre homozigose nos genes *HLA* de classe I, e pior prognóstico na infecção pelo HIV (CARRINGTON; O'BRIEN, 2003), no presente estudo não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros de carga viral, contagem de células T CD4<sup>+</sup>, manifestação de doenças oportunistas e indicação de TARV, entre os pacientes heterozigotos e homozigotos para *HLA-A, -B e -C*.

TABELA 8 – CD4<sup>+</sup>, CV, DOENÇAS OPORTUNISTAS E TARV DE ACORDO COM A HOMOZIGOSE / HETEROZIGOSE PARA *HLA-A*, *B* e *C* NOS PACIENTES HIV+

<b>PACIENTES HIV (286)</b>			
HLA- A			p
	HOMOZIGOTOS (n = 35)	HETEROZIGOTOS (n = 247)	
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	234,0 (12-1183)	179,0 (3-1034)	0,07*
Carga viral	44.200,0 (50-750.000)	63.062,0 (50-840.000)	0,47*
Doenças oportunistas	16 (45,7%)	131 (53,0%)	0,44**
TARV	33 (94,3%)	214 (86,6%)	0,31**
<b>PACIENTES HIV (286)</b>			
HLA-B			p
	HOMOZIGOTOS (n = 16)	HETEROZIGOTOS (n =268)	
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	198,0 (9-927)	192,0 (3-1183)	0,58*
Carga viral	58.000 (230-750.000)	57.900 (50-840.000)	0,80*
Doenças oportunistas	07 (43,7%)	142 (52,9%)	0,67**
TARV	15 (93,7%)	235 (87,6%)	0,74**
<b>PACIENTES HIV (286)</b>			
HLA-C			p
	HOMOZIGOTOS (n = 37)	HETEROZIGOTOS (n = 247)	
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	211,5 (9-1000)	187,0 (3-1183)	0,96*
Carga viral	86.200,0 (50-840.000)	56.000,0 (50-750.000)	0,32*
Doenças oportunistas	22 (59,4%)	126 (51,0%)	0,39**
TARV	31 (83,8%)	219 (88,7%)	0,56**

NOTA: \*Teste de Mann-Whitney \*\*Teste qui-quadrado de Pearson/Yates

Analisando os pacientes do grupo AIDS, foi observada taxa de heterozigose de 88,5% para *HLA-A*, e 35 (12,2%) dos demais pacientes foram homozigotos para este locus. Para o *HLA-B*, verificou-se a presença de 11 homozigotos (6,0%) e 172 heterozigotos (93,9%) no grupo AIDS. Já para o *HLA-C*, o grupo com AIDS apresentou as seguintes taxas: heterozigose de 85,7% e homozigose de 13,6%. As taxas de homozigose e heterozigose para os loci *HLA-A-B* e *-C* não apresentaram diferenças significativas entre o grupo AIDS e o total de pacientes ( $p > 0,05$ ), o que está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg verificado anteriormente.

A tabela 9 apresenta os dados de contagem de CD4+, carga viral e manifestação de doenças oportunistas dos pacientes homozigotos e heterozigotos do grupo AIDS, para *HLA-A*, *-B* e *-C*.

TABELA 9 - CD4<sup>+</sup>, CV E DOENÇAS OPORTUNISTAS DE ACORDO COM A HOMOZIGOSE / HETEROZIGOSE PARA *HLA-A*, *-B* E *-C* NO GRUPO AIDS

<i>HLA-A</i>	AIDS (n = 183)		p
	HOMOZIGOTOS (n = 18)	HETEROZIGOTOS (n = 162)	
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	122 (12-739)	94 (3-791)	0,33*
Carga viral	90.500 (3120-750.000)	130.000 (59-840.000)	0,77*
Doenças oportunistas	16 (88,8%)	131 (80,8%)	0,67**

<i>HLA-B</i>	AIDS (n = 183)		p
	HOMOZIGOTOS (n = 11)	HETEROZIGOTOS (n = 172)	
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	139 (9-766)	96 (3-780)	0,14*
Carga viral	38.550 (230-750.000)	131.000 (60-840.000)	0,39*
Doenças oportunistas	07 (63,6%)	142 (82,5%)	0,18**

<i>HLA-C</i>	AIDS (n = 183)		p
	HOMOZIGOTOS (n = 25)	HETEROZIGOTOS (n = 157)	
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	122,5 (9-279)	94 (3-791)	0,34*
Carga viral	110.000 (370-840.000)	128.000 (59-750.000)	0,79*
Doenças oportunistas	22 (88%)	126 (80,29%)	0,39**

NOTA: \*Teste de Mann-Whitney \*\*Teste qui-quadrado de Pearson/Yates

Os pacientes do grupo AIDS também não apresentaram associação entre homozigose para *HLA-A*, *-B* e *-C* com a contagem de células T CD4+, carga viral, presença de doenças oportunistas. Tang *et al* (2002) não observaram efeito da homozigose na progressão para AIDS e modulação da carga viral. No entanto, Carrington *et al* (1999), relataram, em um estudo com 498 pacientes HIV+ caucasianos, que a homozigose para *HLA-A*, *-B* e *-C* estava relacionada com progressão mais rápida para AIDS, associada com maiores taxas de mortalidade, dados corroborados por Gao *et al.* (2001), em estudo com 592 pacientes HIV+ norte-americanos. A ausência de associação entre homozigose nos genes *HLA* de classe I

com os dados de contagem de CD4+, carga viral, presença de doenças oportunistas, tanto para os pacientes HIV+ quanto para o grupo AIDS pode estar relacionado com o pequeno tamanho amostral de indivíduos homocigotos no presente estudo.

### 5.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS

#### 5.3.1 Pacientes HIV

Na tabela 10 estão apresentados os resultados das frequências alélicas do *locus HLA-A* nos pacientes HIV+. Verificou-se a presença de 20 diferentes grupos alélicos do *HLA-A*. Em quatro pacientes (1,4%), não foi obtido resultado na tipificação para *HLA-A*. Os grupos alélicos mais frequentes do *HLA-A* foram A\*02 (26,9%), A\*24 (12,2%) e A\*01 (8,39%). Estas frequências alélicas encontradas não diferem significativamente das frequências do A\*02 (28,9%), A\*24 (14,1%) e A\*01 (10,1%), obtidas por Braun-Prado *et al* (2000) em uma população caucasiana do estado do Paraná. No estudo de frequências alélicas realizado por Ruiz *et al* (2005), em uma população de etnia caucasiana de Curitiba, Paraná, apresentou as seguintes frequências para *HLA-A*: A\*02 (22,8%), A\*24 (10,4%) e A\*01 (9,5%).

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-A* NOS PACIENTES HIV+

GRUPO ALÉLICO ( <i>HLA-A</i> )	PACIENTES HIV+ (286)	
	N	freq. relativa
A*02	155	0,270
A*24	70	0,122
A*01	48	0,083
A*03	45	0,078
A*31	42	0,073
A*68	32	0,055
A*30	31	0,054
A*11	27	0,047
A*29	26	0,045
A*26	21	0,036
A*23	20	0,035



A*32	16	0,028
A*33	11	0,019
A*25	5	0,0087
A*66	4	0,0069
A*34	3	0,0052
A*74	3	0,0052
A*36	2	0,0035
A*69	2	0,0035
A*80	1	0,0017
Sem tipificação	8	0,014

FONTE: O AUTOR

A tabela 11 apresenta os resultados das frequências alélicas do *HLA-B* nos pacientes HIV+. Um total de 32 grupos alélicos do *HLA-B* foram observados nos resultados, e em dois pacientes (0,7%) não foi obtido resultado na tipificação do *HLA-B*. Os grupos alélicos mais freqüentes para os *HLA-B* foram os grupos *B\*15* (11,5%), *B\*51* (10,1%), *B\*44* (9,79%) e *B\*35* (9,44%). As frequências dos grupos *B\*51*, *B\*44* e *B\*35* foram semelhantes com os dados de Braun-Prado *et al* (2000) e Ruiz *et al* (2005). No entanto, a freqüência alélica encontrada para o *B\*15* (11,5%) diferiu das frequências de 5,3% e 7,0% relatadas, respectivamente, por Braun-Prado *et al* (2000) e Ruiz *et al* (2005), o que pode representar uma possível associação de suscetibilidade para infecção pelo HIV envolvendo o *HLA-B\*15*.

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-B* NOS PACIENTES HIV+

GRUPO ALÉLICO ( <i>HLA-B</i> )	PACIENTES HIV (286)	
	n	freq. relativa
<i>B*15</i>	66	0,115
<i>B*51</i>	58	0,101
<i>B*44</i>	56	0,097
<i>B*35</i>	54	0,094
<i>B*07</i>	42	0,073
<i>B*14</i>	25	0,043
<i>B*39</i>	25	0,043
<i>B*18</i>	24	0,042
<i>B*40</i>	22	0,038
<i>B*08</i>	21	0,036

B*57	20	0,035
B*49	17	0,029
B*27	15	0,026
B*45	15	0,026
B*38	14	0,024
B*53	13	0,022
B*58	12	0,021
B*41	11	0,019
B*50	10	0,017
B*52	9	0,015
B*48	7	0,012
B*13	6	0,010
B*42	6	0,010
B*55	6	0,010
B*81	4	0,0069
B*37	3	0,0052
B*56	2	0,0035
B*46	1	0,0017
B*47	1	0,0017
B*67	1	0,0017
B*73	1	0,0017
B*78	1	0,0017
Sem tipificação	4	0,0069

FONTE: O AUTOR

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados das frequências alélicas do *HLA-C* nos pacientes HIV+. Não foi obtido resultado na tipificação para *HLA-C* em dois pacientes (0,7%). Do total de 14 grupos alélicos observados nos resultados, os grupos C\*07 (24,1%), C\*04 (14,2%), C\*03 (11,2%) e C\*06 (7,17%) foram aqueles com maior frequência alélica. Braun-Prado *et al* (2000) relataram frequências alélicas de 17%, 9%, 6% e 5,7% para C\*07, C\*04, C\*03 e C\*06, respectivamente.

TABELA 12 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-C* NOS PACIENTES HIV+

GRUPO ALÉLICO ( <i>HLA-C</i> )	PACIENTES HIV (286)	
	n	freq. relativa
C*07	138	0,241
C*04	81	0,142
C*03	64	0,112

C*06	41	0,071
C*15	35	0,061
C*16	34	0,059
C*12	33	0,057
C*05	32	0,055
C*02	31	0,054
C*08	22	0,038
C*01	18	0,031
C*14	17	0,029
C*17	17	0,029
C*18	5	0,0087
Sem tipificação	4	0,0069

FONTE: O AUTOR

De um total de 389 diferentes haplótipos *HLA-A-B-C* observados, 12 haplótipos (3%) tinham mais de cinco cópias, e 303 (77,9%) estavam representados por uma única cópia. Somente 7 (1,8%) haplótipos apresentaram frequência haplotípica superior a 1%. Na Tabela 13 estão apresentadas as frequências haplotípicas dos pacientes HIV, para os haplótipos que apresentavam cinco cópias ou mais.

TABELA 13 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS PACIENTES HIV+

HAPLÓTIPOS <i>HLA-ABC</i>	PACIENTES HIV (286)	
	n	freq. relativa
<i>A*02 B*35 C*04</i>	11	0.0192
<i>A*02 B*15 C*03</i>	10	0.0175
<i>A*02 B*07 C*07</i>	10	0.0175
<i>A*01 B*08 C*07</i>	8	0.014
<i>A*03 B*07 C*07</i>	8	0.014
<i>A*31 B*51 C*15</i>	7	0.012
<i>A*11 B*35 C*04</i>	6	0.010
<i>A*29 B*44 C*16</i>	5	0.0087
<i>A*01 B*35 C*04</i>	5	0.0087
<i>A*31 B*39 C*07</i>	5	0.0087
<i>A*02 B*15 C*02</i>	5	0.0087
<i>A*02 B*15 C*04</i>	5	0.0087

FONTE: O AUTOR

Os haplótipos mais frequentes nos pacientes HIV foram: *A\*02-B\*35-C\*04* (1,9%), *A\*02-B\*15-C\*03* (1,75%), *A\*02-B\*07-C\*07* (1,75%), *A\*01-B\*08-C\*07* (1,4%) e *A\*03-B\*07-C\*07* (1,4%). Braun-Prado *et al* (2000) relataram que os haplótipos mais comuns na população caucasiana de Curitiba eram os haplótipos *A\*01-B\*08-C\*07* (5,6%), *A\*02-B\*07-C\*07* (3,5%), *A\*11-B-35-C\*04* (3,1%) e *A\*03-B\*35-C\*04* (3,0%). Comparando os dados dos estudos, observa-se a existência de diferenças representativas entre as frequências haplotípicas, especialmente para o haplótipo *A\*01-B\*08-C\*07* (1,4% x 5,6%). No entanto, o haplótipo *A\*02-B\*35-C\*04*, o mais frequente entre os pacientes HIV+, com frequência de 1,9%, não foi encontrado no estudo de Braun-Prado *et al* (2000). O haplótipo *B\*35-C\*04* tem sido amplamente associado como fator de risco para infecção pelo HIV e progressão rápida para AIDS (CARRINGTON *et al.*, 1999, 2001; GHODKE *et al.*, 2005; JUST, 1995), e pode estar se comportando como marcador de suscetibilidade para infecção pelo HIV. Uma possível explicação para essas disparidades observadas, pode ser devido à diferença do tamanho amostral entre o presente estudo (271 indivíduos caucasianos), e o estudo de Braun-Prado *et al* (2000), que apresentava 144 indivíduos de etnia caucasiana.

### 5.3.2 Grupos AIDS e NÃO AIDS

Na tabela 14 estão apresentados os resultados das frequências alélicas do *HLA-A* dos grupos AIDS e Não AIDS.

TABELA 14 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-A* NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

GRUPO ALÉLICO ( <i>HLA-A</i> )	AIDS (183)		SEM AIDS (103)		*p	OR	IC (95%)
	n	freq. relativa	n	freq. relativa			
<i>A*01</i>	35	0,095	13	0,063	0,20	1,56	0,81-3,04
<i>A*02</i>	92	0,251	63	0,306	1,00	0,76	0,52-1,11
<i>A*03</i>	34	0,092	11	0,053	0,10	1,81	0,89-3,66
<i>A*11</i>	16	0,043	11	0,053	0,68	0,81	0,36-1,78
<i>A*23</i>	9	0,024	11	0,053	0,09	0,44	0,18-1,09
<i>A*24</i>	49	0,134	21	0,102	0,28	1,36	0,79-2,34

A*25	3	0,008	2	0,009	1,00	0,84	0,13-5,08
A*26	13	0,035	8	0,038	0,82	0,91	0,37-2,23
A*29	18	0,049	8	0,038	0,67	1,28	0,54-2,99
A*30	19	0,051	12	0,058	0,84	0,88	0,42-1,86
A*31	26	0,071	16	0,077	0,86	0,9	0,47-1,73
A*32	10	0,027	6	0,029	1,00	0,93	0,33-2,61
A*33	6	0,016	5	0,024	0,53	0,67	0,20-2,22
A*34	3	0,008	0	0	0,55	1,69	0,17-16,39
A*36	1	0,0027	1	0,0048	1,00	0,56	0,03-9,02
A*66	2	0,0054	2	0,0097	0,62	0,56	0,07-4,00
A*68	19	0,0519	13	0,0631	0,57	0,81	0,39-1,68
A*69	2	0,0054	0	0	0,53	1,12	0,10-12,49
A*74	2	0,0054	1	0,0048	1,00	1,12	0,10-12,49
A*80	1	0,0027	0	0	1,00	0,56	0,03-9,02
Sem tipificação	6	0,0164	2	0,0097	0,71	1,7	0,34-8,50

NOTA: \*Teste exato de Fisher

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências alélicas do *HLA-A* entre os grupos AIDS e NÃO AIDS ( $p > 0,05$ ), de modo que nenhuma associação de proteção ou suscetibilidade foi observada para este *locus*. Entre os genes *HLA* de classe I, o *HLA-A* é aquele que apresenta menor associação com o HIV/AIDS (STEPHENS, 2012). Algumas associações já descritas incluem os grupos alélicos *A\*01* (WESTBY *et al.*, 1996), *A\*23* (O'BRIEN *et al.*, 2001), *A\*25* (GECZY *et al.*, 2000) *A\*31* (CRUSE *et al.*, 1991), *A\*32* (O'BRIEN *et al.*, 2001), *A\*74* (KOEHLER *et al.*, 2010). As associações mais consistentes para *HLA-A* apontam o *HLA-A\*23* como fator de risco, e os grupos *A\*32* e *A\*74* como fatores de proteção na infecção pelo HIV e progressão para AIDS (GHODKE *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2001; STEPHENS, 2005, 2012). Nossos dados não confirmaram essas associações, e tal fato pode ser devido à baixa frequência destes alelos, *A\*23* (3,5%), *A\*32* (2,8%) e *A\*74* (0,5%), nos pacientes em estudo.

Na tabela 15 estão apresentados os resultados das frequências alélicas do *HLA-B* dos grupos AIDS e Não AIDS.

TABELA 15 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-B* NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

GRUPO ALÉLICO ( <i>HLA-B</i> )	AIDS (183)		SEM AIDS (103)		*p	OR	IC (95%)
	n	freq. relativa	n	freq. relativa			
<i>B*07</i>	30	0,082	12	0,0583	0,32	1,44	0,72-2,88
<i>B*08</i>	13	0,035	8	0,0388	0,82	0,91	0,37-2,23
<i>B*13</i>	5	0,013	1	0,0048	0,42	2,83	0,32-24,47
<i>B*14</i>	12	0,032	13	0,0631	0,09	0,5	0,22-1,12
<i>B*15</i>	43	0,117	23	0,112	0,89	1,05	0,61-1,81
<i>B*18</i>	18	0,049	6	0,0291	0,28	1,72	0,67-4,41
<b><i>B*27</i></b>	<b>6</b>	<b>0,016</b>	<b>9</b>	<b>0,0437</b>	<b>0,05</b>	<b>0,36</b>	<b>0,12-1,03</b>
<i>B*35</i>	33	0,090	21	0,102	0,65	0,87	0,49-1,55
<i>B*37</i>	1	0,0027	2	0,0097	0,29	0,27	0,02-3,10
<i>B*38</i>	10	0,0273	4	0,0194	0,77	1,41	0,43-4,58
<i>B*39</i>	15	0,041	10	0,0485	0,67	0,83	0,36-1,89
<i>B*40</i>	13	0,0355	9	0,0437	0,65	0,8	0,33-1,91
<i>B*41</i>	7	0,0191	4	0,0194	1	0,98	0,28-3,40
<i>B*42</i>	4	0,0109	2	0,0097	1	0,55	0,13-2,25
<i>B*44</i>	34	0,0929	22	0,107	0,66	0,39	0,21-0,70
<i>B*45</i>	11	0,0301	4	0,0194	0,58	1,56	0,49-4,97
<i>B*46</i>	0	0	1	0,0048	1	0,56	0,03-9,02
<i>B*47</i>	0	0	1	0,0048	1	0,56	0,03-9,02
<i>B*48</i>	3	0,0082	4	0,0194	0,25	0,41	0,09-1,88
<i>B*49</i>	10	0,0273	7	0,034	0,62	0,79	0,29-2,13
<i>B*50</i>	8	0,0219	2	0,0097	0,34	2,27	0,47-10,83
<b><i>B*51</i></b>	<b>48</b>	<b>0,131</b>	<b>10</b>	<b>0,0485</b>	<b>&lt; 0,01</b>	<b>2,95</b>	<b>1,46-5,98</b>
<b><i>B*52</i></b>	<b>3</b>	<b>0,0082</b>	<b>6</b>	<b>0,0291</b>	<b>0,07</b>	<b>0,27</b>	<b>0,06-1,11</b>
<i>B*53</i>	6	0,0164	7	0,034	0,24	0,47	0,15-1,42
<i>B*55</i>	3	0,0082	3	0,0146	0,67	0,55	0,11-2,79
<i>B*56</i>	1	0,0027	1	0,0048	1	0,56	0,03-9,02
<i>B*57</i>	14	0,0383	6	0,0291	0,64	1,32	0,50-3,50
<i>B*58</i>	10	0,0273	2	0,0097	0,22	2,86	0,62-13,20
<i>B*67</i>	0	0	1	0,0048	1	0,56	0,03-9,02
<i>B*73</i>	1	0,0027	0	0	1	0,56	0,03-9,02
<i>B*78</i>	1	0,0027	0	0	1	0,56	0,03-9,02
<i>B*81</i>	3	0,0082	1	0,0048	1	1,69	0,17-16,39
Sem tipificação	0	0	4	0,0194	1	0,56	0,03-9,02

NOTA: \*Teste exato de Fisher

Para o *locus HLA-B*, foi observada a existência de associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos AIDS e NÃO AIDS. O grupo alélico *B\*27* apresentou maior frequência alélica no grupo NÃO AIDS, comparado ao grupo AIDS (4,3% x 1,6%), se comportando como fator de proteção (OR=0,36; IC 95% 0,12-1,03), embora no limite da significância estatística ( $p=0,05$ ). A associação de proteção do *HLA-B\*27* com a infecção pelo HIV tem sido amplamente relatada (CHATTERJEE, 2010; GAO et al., 2005; O'BRIEN et al., 2001; STEPHENS, 2012), e associada com controle da replicação viral (SAAH et al, 1998; AL JABRI, 2002) e retardo no tempo de progressão para AIDS (MCMICHAEL; JONES, 2010; AL JABRI, 2002; CARRINGTON et al., 2001). Gao e cols.(2005) relatam que o efeito protetor atribuído ao *HLA-B\*27* se deve à apresentação do epítipo da região conservada do antígeno Gag, denominado KK10, aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que induzem a produção de variantes de escape do HIV, com baixa capacidade de replicação.

Além disso, a frequência alélica do *HLA-B\*51* no grupo AIDS foi de 13,1%, enquanto no grupo NÃO AIDS, a frequência foi de apenas 4,85% ( $p < 0,01$ ). Desta forma, foi observada uma associação de suscetibilidade para AIDS (OR=2,95; IC95% 1,46-5,98), envolvendo o *HLA-B\*51*. Alguns autores têm relatado o *HLA-B\*51* como fator de proteção para infecção pelo HIV (GHODKE et al., 2005; KASLOW et al., 2001; KOGA et al., 2010), e progressão para AIDS (O'BRIEN et al., 2001), embora alguns trabalhos ressaltem a existência de associações de suscetibilidade envolvendo este grupo alélico (CADOGAN; DALGLEISH, 2008; KAUR; MEHRA, 2009). Este achado está de acordo com o relato de Kawashima et al (2009), que observou que a resposta citotóxica dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> restritos ao *HLA-B\*51* exerce uma pressão seletiva no HIV, que gera uma mutação de escape denominada I135X. Esta mutação escape não diminui o *fitness* viral, e o epítipo mutante não é apresentado de maneira adequada pelas moléculas *HLA-B\*51*, de modo que as células T CD8<sup>+</sup> não são ativadas de maneira adequada. A diminuição da resposta citotóxica das células T CD8<sup>+</sup>, decorrente da apresentação ineficaz do epítipo mutante, está relacionada com aumento da viremia e maior progressão para AIDS. Esta adaptação do HIV à resposta citotóxica do hospedeiro, mediada pelas moléculas *HLA-B\*51*, explica a mudança no padrão de associação dos genes *HLA-B\*51*, antes relatados como fatores de proteção para AIDS, e atualmente considerados alelos de suscetibilidade para AIDS (KAWASHIMA et al, 2010).

A frequência alélica aumentada do *HLA-B\*52* no grupo NÃO AIDS em comparação com a frequência do grupo AIDS (2,9% x 0,8%) ( $p=0,07$ ), revelou tendência deste grupo alélico se comportar como fator de proteção (OR=0,27; IC 95% 0,06-1,11). Al Jabri (2002) e Carrington e Walker (2012) relataram o *HLA-B\*52* como fator de proteção, achado corroborado por Lazaryan e cols.(2011), que observaram uma tendência ( $p=0,07$ ) do *HLA-B\*52* agir como fator de proteção na progressão para AIDS, em pacientes HIV+ afro-americanos.

Na tabela 16 estão apresentados os resultados das frequências alélicas do *HLA-C* dos grupos AIDS e NÃO AIDS.

TABELA 16 - FREQUENCIAS ALÉLICAS DO *HLA-C* NOS GRUPOS AIDS E NÃO AIDS

GRUPO ALÉLICO ( <i>HLA-C</i> )	AIDS (183)		NÃO AIDS (103)		*p	OR	IC (95%)
	n	freq. relativa	n	freq. relativa			
<i>C*01</i>	13	0,035	5	0,024	0,61	1,48	0,52-4,21
<b><i>C*02</i></b>	<b>14</b>	<b>0,038</b>	<b>17</b>	<b>0,082</b>	<b>0,03</b>	<b>0,44</b>	<b>0,21-0,91</b>
<i>C*03</i>	42	0,115	22	0,107	0,89	1,08	0,62-1,87
<b><i>C*04</i></b>	<b>43</b>	<b>0,117</b>	<b>38</b>	<b>0,184</b>	<b>0,03</b>	<b>0,58</b>	<b>0,36-0,94</b>
<i>C*05</i>	16	0,043	16	0,077	0,12	0,54	0,26-1,10
<i>C*06</i>	31	0,084	10	0,048	0,12	0,17	0,04-0,64
<i>C*07</i>	91	0,249	47	0,228	0,61	1,11	0,74-1,67
<i>C*08</i>	12	0,032	10	0,048	0,36	0,66	0,28-1,56
<i>C*12</i>	21	0,057	12	0,058	1,00	0,98	0,47-2,04
<b><i>C*14</i></b>	<b>15</b>	<b>0,041</b>	<b>2</b>	<b>0,0097</b>	<b>0,03</b>	<b>4,35</b>	<b>0,98-19,25</b>
<i>C*15</i>	25	0,0683	10	0,0485	0,37	1,43	0,67-3,05
<b><i>C*16</i></b>	<b>27</b>	<b>0,0738</b>	<b>7</b>	<b>0,034</b>	<b>0,06</b>	<b>2,26</b>	<b>0,96-5,29</b>
<i>C*17</i>	11	0,0301	6	0,029	1,00	1,03	0,37-2,83
<i>C*18</i>	3	0,0082	2	0,0097	1,00	0,84	0,13-5,08
Sem tipificação	2	0,0054	2	0,0097	0,62	0,56	0,07-4,00

NOTA: \*Teste exato de Fisher

Foi observada a existência de associações estatisticamente significativas para o *locus HLA-C* entre os grupos AIDS e NÃO AIDS. Associações de proteção foram observadas para os grupos *C\*02* (OR=0,44; IC 95% 0,21-0,91;  $p=0,03$ ) e *C\*04*



(OR=0,58; IC 95% 0,36-0,94; p=0,03). O grupo C\*14, no entanto, se comportou como fator de suscetibilidade para AIDS (OR=4,35; IC 95% 0,98-19,25; p=0,03). Além das associações mencionadas, foi verificada uma tendência do *HLA-C\*16* atuar como fator de risco para AIDS (OR=2,26; IC 95% 0,96-5,29; p=0,06).

O papel do *HLA-C\*02* como alelo de proteção tem sido pouco relatado na literatura. Nossos resultados são corroborados por O'Brien e cols. (2001), que observaram uma associação significativa entre o *HLA-C\*02* com retardo no tempo de evolução para AIDS, em um estudo com 600 pacientes HIV+ norte-americanos.

Diferentemente do *HLA-C\*02*, associações com o grupo alélico C\*04 tem sido amplamente descritas na literatura, tanto como fator de suscetibilidade (CARRINGTON *et al.*, 1999; KASLOW *et al.*, 1996; LAZARYAN *et al.*, 2011; O'BRIEN *et al.*, 2001; SAAH *et al.*, 1998; TRACHTENBERG *et al.*, 2003), como de proteção para AIDS (FELLAY *et al.*, 2007; KOEHLER *et al.*, 2010; KULPA; COLLINS, 2011; LESLIE *et al.*, 2010). Gao *et al* (2001) relatam que todo o efeito de suscetibilidade atribuído ao *HLA-C\*04* deve-se ao forte desequilíbrio de ligação do *HLA-C\*04* com o *HLA-B\*35* (CARRINGTON *et al.*, 1999), grupo que é amplamente reconhecido como fator de risco para progressão para AIDS. Em um estudo multicêntrico com 592 pacientes HIV+ americanos, Gao *et al* (2001) relataram que, na ausência do *B\*35*, o efeito de suscetibilidade do *C\*04* torna-se nulo. Fellay *et al* (2007), no entanto, relataram que a associação do *HLA-C\*04* com o SNP 9264942, localizado na região 5' (-35C/T) de transcrição inicial do *HLA-C* e que aumenta a expressão celular das moléculas HLA, está diretamente relacionada com controle efetivo da replicação viral, podendo explicar as associações de proteção atribuídas ao *HLA-C\*04*.

Embora tenhamos observado uma associação do grupo alélico C\*14 como fator de suscetibilidade (OR=4,35; IC 0,98-19,25; p=0,03), diferentes relatos relacionam o *HLA-C\*14* como fator de proteção para AIDS (GAO *et al*, 2001; GHODKE *et al*, 2005; STEPHENS, 2012). O forte desequilíbrio de ligação ( $D' = 0,738$ ; p=0,000) verificado entre *HLA-C\*14* e o grupo *B\*51* (OR=2,95; p<0.01), pode ser o responsável pela associação de suscetibilidade atribuída ao grupo alélico C\*14 neste estudo. Em relação ao C\*16, nossos dados indicaram tendência (p=0,06) desse grupo estar associado a suscetibilidade para AIDS (OR=2,26; IC 95% 0,96-5,29), o que é corroborado pelos relatos de Hendel *et al* (1999) e Tang *et al* (2010).

## 5.5 ANÁLISE MULTIVARIADA POR REGRESSÃO LOGÍSTICA

Na análise multivariada por regressão logística considerando como variável dependente o grupo AIDS e NÃO AIDS observou-se entre os grupos alélicos do *HLA-A*, que os grupos *A\*01* e *A\*03* foram os selecionados com maior poder de discriminação. Os dois alelos conferiram grau de acerto dos grupos de 63,8% ( $p = 0,05$ ) (Tabela 17). Para os grupos alélicos do *HLA-B*, que os grupos *B\*14*, *B\*27* e *B\*51* foram os selecionados com maior poder de discriminação. Os três alelos conferiram grau de acerto dos grupos de 65,5% ( $p < 0,001$ ). O risco de HIV foi 3,1 vezes maior na presença do alelo *B\*51*. O alelo *B\*27* se comportou como fator de proteção. Em relação aos os grupos alélicos do *HLA-C*, os grupos *C\*02*, *C\*04* e *C\*05* foram os selecionados com maior poder de discriminação. Os três alelos conferiram grau de acerto dos grupos de 64,4% ( $p < 0,01$ ). O três alelos se comportaram como fatores de proteção (Tabela 17).

Após a análise multivariada por regressão logística, somente o grupo *B\*51* (OR=3,1;  $p < 0,01$ ) se manteve como fator de suscetibilidade para AIDS. Os grupos alélicos *HLA-B\*27* (OR=0,3;  $p=0,03$ ), *HLA-C\*02* (OR=0,3;  $p < 0,01$ ) e *HLA-C\*04* (OR=0,5;  $p=0,01$ ) se mantiveram como fatores de proteção para AIDS.

A tendência ( $p=0,06$ ) para suscetibilidade para AIDS atribuída para o *HLA-C\*16* não se manteve significativa após a análise multivariada. No entanto, os grupos alélicos *A\*03*, *B\*14* e *C\*05*, que não apresentaram significância estatística na análise univariada, passaram a apresentar tendência, tanto para suscetibilidade (*A\*03*; OR=1,8;  $p=0,06$ ), quanto para proteção (*B\*14*; OR=0,4;  $p=0,06$ ; *C\*05* - OR=0,4;  $p=0,07$ ), após a realização da a análise multivariada por regressão logística. Não existem relatos na literatura associando o *HLA-A\*03* como fator de suscetibilidade, nem o *HLA-C\*05* como fator de proteção. O papel do *HLA-B\*14* como alelo de proteção, por sua vez, tem sido pouco relatado na literatura. McMichael e Jones (2010) relataram o *HLA-B\*14* como alelo de proteção, informação corroborada por Stephens (2012).

O fato da associação de suscetibilidade envolvendo o *HLA-C\*14* não ter permanecido estatisticamente significativa após a análise multivariada por regressão logística, confirma que a associação obtida pela análise univariada era devido ao

forte desequilíbrio de ligação ( $D'=0,738$ ;  $p=0,000$ ) verificado entre *HLA-C\*14* e o grupo *B\*51*, grupo alélico que apresentou significância estatística tanto na análise univariada ( $OR=2,95$ ;  $p<0.01$ ), quanto na análise multivariada ( $OR=3,1$ ;  $p<0.01$ ).

TABELA 17 – REGRESSÃO LOGÍSTICA PARA AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-A, B E - C* (GRUPOS AIDS E NÃO AIDS)

GRUPO ALÉLICO	OR	IC 95%	p
<i>A*01</i>	2,0	0,9 – 4,2	0,11
<i>A*03</i>	1,8	0,9 – 3,6	0,06
GRUPO ALÉLICO	OR	IC 95%	P
<i>B*14</i>	0,4	0,2 – 1,0	0,06
<b><i>B*27</i></b>	<b>0,3</b>	<b>0,1 – 0,9</b>	<b>0,03</b>
<b><i>B*51</i></b>	<b>3,1</b>	<b>1,5 – 6,5</b>	<b>&lt; 0,01</b>
GRUPO ALÉLICO	OR	IC 95%	p
<b><i>C*02</i></b>	<b>0,3</b>	<b>0,1 – 0,7</b>	<b>&lt; 0,01</b>
<b><i>C*04</i></b>	<b>0,5</b>	<b>0,3 – 0,9</b>	<b>0,01</b>
<i>C*05</i>	0,4	0,2 – 1,0	0,07

FONTE: O AUTOR

### 5.5.1 Modulação da contagem de CD4+ pelas associações de suscetibilidade e proteção

Para verificar se as associações de proteção e suscetibilidade encontradas na análise multivariada por regressão logística apresentavam relevância imunológica, foi testado se a presença e ausência destes grupos alélicos modulavam a contagem de células T CD4<sup>+</sup>. A tabela 20 descreve os resultados das medianas da contagem de CD4<sup>+</sup> e IC 95% na presença e ausência dos grupos alélicos *B\*51*, *C\*04* e *C\*02*. Esta verificação não foi realizada para *HLA-B\*27* devido a sua baixa frequência alélica (2,6%) nos pacientes em estudo.

Para o grupo alélico de suscetibilidade *HLA-B\*51*, foi verificado que sua presença modula negativamente a contagem de células T CD4<sup>+</sup>. Os pacientes que

não possuem o *HLA-B\*51* apresentaram mediana de contagem de células T CD4<sup>+</sup> significativamente maior que os indivíduos com o *HLA-B\*51* (218,0 células/mm<sup>3</sup> x 93,0 células/mm<sup>3</sup>) ( $p < 0,001$ ). Este resultado confirma a associação de suscetibilidade encontrada para o *HLA-B\*51*, tanto na análise univariada (OR=2,95;  $p < 0,01$ ) quanto na análise multivariada (OR=3,1;  $p < 0,01$ ), e relatada recentemente por Kawashima *et al* (2009; 2010).

TABELA 20 – MODULAÇÃO DA CONTAGEM DE CD4<sup>+</sup> (MEDIANA E IC 95%) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS GRUPOS ALÉLICOS *B\*51*, *C\*04* E *C\*02*

	<i>B*51</i> PRESENTE (n = 54)	<i>B*51</i> AUSENTE (n = 223)	*p
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	<b>93 (121-244)</b>	<b>218 (236-296)</b>	<b>&lt; 0,001</b>
	<i>C*04</i> PRESENTE (n = 72)	<i>C*04</i> AUSENTE (n = 206)	*p
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	<b>228,5 (245-373)</b>	<b>179 (200-258)</b>	<b>0,04</b>
	<i>C*02</i> PRESENTE (n = 31)	<i>C*02</i> AUSENTE (n = 247)	*p
Contagem de CD4 <sup>+</sup>	221 (181-323)	183 (220-279)	0,55

NOTA: \* Teste de Mann-Whitney

Foi observado que a presença do *HLA-C\*04* modulou positivamente a mediana de contagem de células T CD4<sup>+</sup>. Os pacientes que possuem o *HLA-C\*04* apresentaram valores de mediana de contagem de células T CD4<sup>+</sup> maiores que aqueles que não possuem este grupo alélico (228,5 células/mm<sup>3</sup> x 179,0 células/mm<sup>3</sup>) ( $p=0,04$ ). Este achado fortalece a associação de proteção encontrada na análise multivariada (OR=0,5;  $p=0,01$ ) e confirma as associações de proteção relatadas na literatura (FELLAY *et al.*, 2007; JUST, 1996; KOEHLER *et al.*, 2010; KULPA; COLLINS, 2011; LESLIE *et al.*, 2010).

Não foi observada modulação na mediana de contagem de células T CD4<sup>+</sup> para o *HLA-C\*02*. Embora o *HLA-C\*02* tenha apresentado associação de proteção

após análise multivariada por regressão logística (OR 0,3;  $p < 0,01$ ), não houve diferença na mediana de contagem de células T CD4<sup>+</sup> quando na presença e ausência do grupo alélico (221,0 células/mm<sup>3</sup> x 183,0 células/mm<sup>3</sup>) ( $p=0,55$ ). O fato do *HLA-C\*02* apresentar menor frequência alélica (5,4%), quando comparado com os grupos *C\*04* (14,2%) e *B\*51* (10,1%), pode ser a causa desta ausência de modulação.

Estes resultados corroboram a associação de suscetibilidade atribuída ao *HLA-B\*51*, e de proteção envolvendo *HLA-C\*04*, reafirmando o importante papel que os alelos *HLA* de classe I exercem na infecção pelo HIV e progressão para AIDS.

## 6 CONCLUSÕES

- I. Não foi observada associação entre homozigose para *HLA-A*, *-B* e *-C* com a modulação da carga viral, contagem de células T CD4<sup>+</sup> e progressão para AIDS;
- II. Não foi observada associação do *HLA-A* entre os grupos de pacientes AIDS e NÃO AIDS;
- III. Foi observada associação do *HLA-B\*27* (OR=0,36; p=0,05) e *HLA-B\*51* (OR=2,95; p<0.01) com AIDS;
- IV. Foi observada associação do *HLA-C\*02* (OR=0,44; p=0,03), *HLA-C\*04* (OR=0,58; p=0,03) e *HLA-C\*14* (OR=4,35; p=0,03) com AIDS;
- V. Após análise multivariada por regressão logística, foi verificada existência de associação de suscetibilidade para AIDS para o grupo alélico *HLA-B\*51* (OR=3,1; p<0,01);
- VI. Após análise multivariada por regressão logística, foi verificada existência de associação de proteção para AIDS para os grupos alélicos *HLA-B\*27* (OR=0,3; p=0,03), *HLA-C\*02* (OR=0,3; p<0,01) e *HLA-C\*04* (OR=0,5; p=0,01);
- VII. A presença do grupo alélico *B\*51* modulou negativamente a contagem de células T CD4<sup>+</sup> (p<0,01), corroborando a associação de suscetibilidade para AIDS;
- VIII. A presença do grupo alélico *C\*04* modulou positivamente a contagem de células T CD4<sup>+</sup> (p=0,04), fortalecendo os achados de associação de proteção para AIDS.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AL JABRI, A. A. HLA and in vitro susceptibility to HIV infection. **Molecular immunology**, v. 38, n. 12-13, p. 959-67, maio 2002.
- AN, P.; WINKLER, C.A. Host genes associated with HIV&AIDS: advances in gene discovery. **Trends in genetics**, v. 26, n.3, p. 119-131, 2010.
- BASHIROVA, A.A.; THOMAS, R.; CARRINGTON, M. HLA/KIR Restraint of HIV: Surviving the Fittest. **Annual Review of Immunology**, v.29, p.295-317, 2011.
- BLACKWELL, J.M.; JAMIESON, S.E.; BURGNER, D. HLA and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.2, p.370-385, 2009
- BLANKSON, J.N. Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: highly active immune responses?. **Antiviral Research**, v.85, p. 295-302, 2010.
- BONTADINI, A. HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 56, n. 4, p. 471-6, 28 abr 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Informações da Saúde: Epidemiológicas e Morbidade**. Disponível em <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em 05/04/2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria SVS/MS Nº 51, de 14 de outubro de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2009. Seção 1, p.40-43. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS873A3DC1ITEMIDFB46666CCC844CD687CFA1933D73E118PTBRIE.htm>. Acesso em: 25/07/2010.
- BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A. L.; FARAH PEREIRA, N.; CULPI, L.; PETZLERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue antigens**, v. 56, n. 5, p. 417-27, nov 2000.
- CADOGAN, M.; DALGLEISH, A. G. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 11, p. 675-84, nov 2008.
- CARRINGTON, M.; NELSON, G.; MARTIN, M. P. *et al.* HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5408, p. 1748-52, 12 mar 1999.
- CARRINGTON, M.; NELSON, G.; O'BRIEN, S. J. Considering genetic profiles in functional studies of immune responsiveness to HIV-1. **Immunology letters**, v. 79, n. 1-2, p. 131-40, 1 nov 2001.

CARRINGTON, M.; O'BRIEN, S.J. The influence of HLA genotypes on AIDS. **Annual Review of Medicine**, v.54, p. 535-551, 2003.

CARRINGTON, M; WALKER, B. D. Immunogenetics of spontaneous control of HIV. **Annual review of medicine**, v. 63, p. 131-45, jan 2012.

CHATTERJEE, K. Host genetic factors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. **Journal of genetics**, v. 89, n. 1, p. 109-16, abr 2010.

CHOO, S.Y. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. **Yonsei Medical Journal**, v.48, n.1, p.11-23, 2007.

CORGUI, D.B.; GONÇALES, N.S.L.; MARQUES, S.B.D.; GONÇALES JR, F.L. Distribution of the human leukocyte antigen class II alleles in Brazilian patients with chronic hepatitis C virus infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p.884-889, 2008.

CRUSE, J. M.; BRACKIN, M. N.; LEWIS, R. E. *et al.* HLA disease association and protection in HIV infection among African Americans and Caucasians. **Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 59, n. 5, p. 324-8, jan 1991.

DEEKS, S. G.; VERDIN, E.; MCCUNE, J. M. Immunosenescence and HIV. **Current opinion in immunology**, p. 2-7, 1 jun 2012.

DUNN, P. P. J. Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. **International journal of immunogenetics**, v. 38, n. 6, p. 463-73, dez 2011.

EBERLE, J.; GÜRTLER, L. HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies. **Intervirolgy**, v. 55, n. 2, p. 79-83, jan 2012.

ERLICH, H.A.; OPELZ, G.; HANSEN, J. HLA DNA Typing and Transplantation. **Immunity**, v.14, p.347-356, 2001.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M.; SULIGOI, B.; BUTTÒ, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v.46, p.5-14, 2010.

FELLAY, J.; SHIANNAN, K. V.; GE, D. *et al.* A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5840, p. 944-7, 17 ago 2007.

FERREIRA, A.C.S.; GOMES, K.B.; SAMPAIO, I.B.M.; OLIVEIRA, V.C.; PARDINI, V.C.; GODARD, A.L.B. Type 1 diabetes susceptibility determined by HLA alleles and



CTLA-4 and insulin genes polymorphisms in Brazilians. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n3, p. 368-373, 2009.

GAO, X.; BASHIROVA, A.; IVERSEN, A. K. N. *et al.* AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. **Nature medicine**, v. 11, n. 12, p. 1290-2, dez 2005.

GAO, X.; NELSON, G. W.; KARACKI, P. *et al.* Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 22, p. 1668-75, 31 maio 2001.

GECZY, A F.; KUIPERS, H.; COOLEN, M. *et al.* HLA and other host factors in transfusion-acquired HIV-1 infection. **Human immunology**, v. 61, n. 2, p. 172-6, fev 2000.

GHODKE, Y.; JOSHI, K.; CHOPRA, A.; PATWARDHAN, B. HLA and disease. **European Journal of Epidemiology**, v.20, p.475-488, 2005.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Immunology**. 4 ed. New York, USA: W.H. Freeman and Company, 2000.

GOUDET, J. *et al.* Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v. 144, p. 1933-1940, 1996.

GOULDER, P.J.R.; WATKINS, D.I. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.8, p.619-630, 2008.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, pp.361-372, 1992.

GUPTA, V.; GUPTA, S. Laboratory markers associated with progression of HIV infection. **Indian journal of medical microbiology**, v. 22, n. 1, p. 7-15, 2004.

HAN, Y.N.; YANG, J.L.; ZHENG, S.G.; TANG, Q.; ZHU, W. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV infected patients. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n.36, p.5721-5724, 2005

HEINEMANN, F.M. HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.36, p.273-278, 2009.

HENDEL, H.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; LEBUANEC, H. *et al.* New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 162, n. 11, p. 6942-6, 1 jun 1999.

HIGH, K. P.; AKBAR, A. N.; NIKOLICH-ZUGICH, J. Translational research in immune senescence: Assessing the relevance of current models. **Seminars in immunology**, 23 maio 2012.

HOWELL, W.M.; CARTER, V.; CLARK, B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v.63, p. 387-390, 2010.

HUANG, X.; LING, H.; FENG, L. *et al.* Human leukocyte antigen profile in HIV-1 infected individuals and AIDS patients from Chongqing, China. **Microbiology and immunology**, v. 53, n. 9, p. 512-23, set 2009.

HUNT, P.W.; CARRINGTON, M. Host genetic determinants of HIV pathogenesis: an immunologic perspective. **Current opinion in HIV and AIDS**, v.3, p.342-348, 2008.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. **Imunobiologia**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JUST, J. J. Genetic predisposition to HIV-1 infection and acquired immune deficiency virus syndrome: a review of the literature examining associations with HLA [corrected]. **Human immunology**, v. 44, n. 3, p. 156-69, nov 1995.

KASLOW, R. A.; CARRINGTON, M; APPLE, R. *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. **Nature medicine**, v. 2, n. 4, p. 405-11, abr 1996.

KASLOW, R. A.; DORAK, M. T.; TANG, J. J. Is protection in HIV infection due to Bw4 or not to Bw4? **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 4, p. 221-2, nov 2001.

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

KAWASHIMA, Y.; KUSE, N.; GATANAGA, H. *et al.* Long-Term Control of HIV-1 in Hemophiliacs Carrying Slow-Progressing Allele HLA-B\*5101. **Journal of Virology**, v. 84, n. 14, p. 7151-7160, 21 abr 2010.

KAWASHIMA, Y; PFAFFEROTT, K.; FRATER, J. *et al.* Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 641-5, 2 abr 2009.

KLIMAS, N.; KONERU, A.O.; FLETCHER, M.A. Overview of HIV. **Psychosomatic Medicine**, v.70, p.523-530, 2008.

KOEHLER, R. N.; WALSH, A. M.; SAATHOFF, E. *et al.* Class I HLA-A\*7401 is associated with protection from HIV-1 acquisition and disease progression in Mbeya, Tanzania. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, n. 10, p. 1562-6, 15 nov 2010.

KOGA, M.; KAWANA-TACHIKAWA, A.; HECKERMAN, D. *et al.* Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. **Microbiology and immunology**, v. 54, n. 4, p. 196-205, abr 2010.

KULPA, D. A; COLLINS, K. L. The emerging role of HLA-C in HIV-1 infection. **Immunology**, v. 134, n. 2, p. 116-22, out 2011.

LAZARYAN, A.; SONG, W.; LOBASHEVSKY, E. *et al.* The influence of human leukocyte antigen class I alleles and their population frequencies on human immunodeficiency virus type 1 control among African Americans. **Human immunology**, v. 72, n. 4, p. 312-8, abr 2011.

LESLIE, A.; MATTHEWS, P. C.; LISTGARTEN, J. *et al.* Additive contribution of HLA class I alleles in the immune control of HIV-1 infection. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9879-88, out 2010.

LEVY, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. **AIDS (London, England)**, v. 23, n. 2, p. 147-60, 14 jan 2009.

LI, S.; JIAO, H.; YU, X. *et al.* Human leukocyte antigen class I and class II allele frequencies and HIV-1 infection associations in a Chinese cohort. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 44, n. 2, p. 121-31, 1 fev 2007.

MALHOTRA, U.; *et al.* Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment. **The Journal of Clinical Investigation**, v.107, n.4, p.505-517, 2001.

MANAVI, K. A review on infection with human immunodeficiency virus. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.20, n.6, p.923-40, 2006.

MARSH, S.G.E.; *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. **Tissue Antigens**, v.35, p.291-455, 2010.

MARTIN, M.P.; CARRINGTON, M. Immunogenetics of viral infections. **Current Opinion in Immunology**, v.17, p.510-516, 2005.

MASSEY, H.D.; McPHERSON, R.A. Human Leukocyte Antigen: The Major Histocompatibility Complex of Man. In: McPHERSON, R.A.; PINCUS, M.R. (Ed.). **McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 21st Ed. [S.L.]: W. B. Saunders Company, 2006.

MCMICHAEL, A. J.; JONES, E. Y. First-class control of HIV-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6010, p. 1488-90, 10 dez 2010.

MICKELSON, E.; PETERSDORF, E.W. Histocompatibility. In: APPELBAUM, F.R.; FORMAN, S.J.; NEGRIN, R.S.; BLUME, K.G. (Ed.). **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation: Stem Cell Transplantation**. 4<sup>th</sup> ed. [S.L.]: Blackwell Publishing, 2004.

MOIR, S.; CHUN, T.W.; FAUCI, A.S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. **Annual Review of Pathology**, v.28, n.6, p.223-248, 2011.

O'BRIEN, S. J.; GAO, X.; CARRINGTON, M. HLA and AIDS: a cautionary tale. **Trends in molecular medicine**, v. 7, n. 9, p. 379-81, set 2001.

O'BRIEN, S.J.; NELSON, G.W. Human genes that limit AIDS. **Nature Genetics**, v.36, n. 6, p. 565-574, 2004.

PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of HIV infection. **Annual review of microbiology**, v. 50, p. 825-54, jan 1996.

PETERSDORF, E.W. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. **Current Opinion in Hematology**, v.11, p.386-391, 2004.

PETERSDORF, E.W.; ANASETTI, C.; MARTIN, P.J.; HANSEN, J.A. Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation. **Tissue Antigens**, v.61, p.1-11, 2003.

PHILLIPS, E.J.; CHUNG, W.H.; MOCKENHAUPT, M.; ROUJEAU, J.C.; MALLAL, S.A. Drug hypersensitivity: pharmacogenetics and clinical syndromes. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.127, suppl. 3, p.60-66, 2011.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

RUIZ, T. M.; COSTA, S. M. C. M. DA; RIBAS, F. *et al.* Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. **Transplantation proceedings**, v. 37, n. 5, p. 2293-6, jun 2005.

SAAH, A. J.; HOOVER, D. R.; WENG, S. *et al.* Association of HLA profiles with early plasma viral load, CD4+ cell count and rate of progression to AIDS following acute HIV-1 infection. Multicenter AIDS Cohort Study. **AIDS (London, England)**, v. 12, n. 16, p. 2107-13, 12 nov 1998.

SAGE, D. My approach to the immunogenetics of haematopoietic stem cell transplant matching. **Journal of Clinical Pathology**, v.63, p. 194-198, 2010.

SCHNEIDER, E.; WHITMORE, S.; GLYNN, K. M. *et al.* Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years--United States, 2008. **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control**, v. 57, n. RR-10, p. 1-12, 5 dez 2008.

SHANKARKUMAR, U. The Human Leucocyte Antigen (HLA) System. **International Journal of Human Genetic**, v.4, n. 2, p. 91-103, 2004.

SHARMA, G.; KAUR, G.; MEHRA, N. Genetic correlates influencing immunopathogenesis of HIV infection. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. 6, p. 749-68, dez 2011.

SILVA, E.M.; *et al.* HLA-Bw4-B\*57 and Cw\*18 alleles are associated with plasma viral load modulation in HIV-1 infected individuals in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.5, p.468-475, 2010.

SIMON, V.; HO, D.D.; KARIM, Q.A. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v.368, p.489-504, 2006.

STEPHENS, H. A. F. HIV-1 diversity versus HLA class I polymorphism. **Trends in immunology**, v. 26, n. 1, p. 41-7, jan 2005.

STEPHENS, H. A. F. Immunogenetic surveillance of HIV/AIDS. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 7, p. 1481-91, 7 out 2012.

TAIT, B.D. The ever-expanding list of HLA alleles: changing HLA nomenclature and its relevance to clinical transplantation. **Transplantation Reviews (Orlando)**, v. 25, n.1, p.1-8, 2011.

TANG, J.; TANG, S.; LOBASHEVSKY, E. *et al.* Favorable and unfavorable HLA class I alleles and haplotypes in Zambians predominantly infected with clade C human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 76, n. 16, p. 8276-84, ago 2002.

THORSBY, E. A short history of HLA. **Tissue Antigens**, v.74, n.2, p.101-16, 2009.

THORSBY, E.; LIE, B.A. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. **Transplant Immunology**, v.14, n.3-4, p.175-82. 2005.

TRACHTENBERG, E.; KORBER, B.; SOLLARS, C. *et al.* Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 928-35, jul 2003.

TRIVEDI, V.B.; DAVE, A.P.; DAVE; J.M.; PATEL; B.C. Human Leukocyte Antigen and its Role in Transplantation Biology. **Transplantation Proceedings**, v.39, p. 688-693, 2007.

WESTBY, M.; MANCA, F.; DALGLEISH, A. G. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. **Immunology today**, v. 17, n. 3, p. 120-6, mar 1996.

WILLIAMS, T. M. Human Leukocyte Antigen Gene Polymorphism and the Histocompatibility Laboratory. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.3, n.3, p.98-104, 2001.

## ANEXOS

### ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você está sendo convidado a participar como parte do grupo controle de um estudo intitulado “**Investigação do polimorfismo gênico de marcadores da resposta imune inata na infecção por HIV**”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.

b) O objetivo desta pesquisa é conhecer a associação entre proteínas que participam da resposta imunológica às infecções e a evolução da AIDS.

c) Caso você participe da pesquisa, será utilizada apenas uma parte do sangue que você irá coletar para realizar os exames laboratoriais de rotina.

d) Como em qualquer exame você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados com a coleta de sangue.

e) Os riscos que envolvem sua participação no estudo são relacionados apenas com a coleta de sangue e podem ser dor no local da punção ou hematoma.

f) Contudo os benefícios esperados são: contribuir para o melhor conhecimento da resposta imunológica ao HIV.

g) Os mestrandos Alberto Cardoso Martins Lima e Caroline Grisbach, sob a orientação da Dra. Iara José Tabora de Messias-Reason, telefone 41 3360-1800 ramal 6537/6523, responsável por este estudo, estarão sempre a sua disposição para qualquer esclarecimento.

h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem liberdade de recusar ou se aceitar a participar do estudo, retirar seu consentimento a qualquer momento.

j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são da sua responsabilidade.

m) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura

Pesquisador:

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Curitiba, 02 de agosto de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Melissa Negro Luciano**  
Iara J. T. de Messias-Reason  
Hospital de Clínicas da UFPR  
Curitiba - Paraná

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que a **Solicitação de Aprovação do Novo Cronograma e Inclusão de Dois Novos Pesquisadores** ( Alberto Cardoso Martins Lima, Caroline Grisbach ), referente ao Projeto de Pesquisa intitulado "INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DE MARCADORES DA RESPOSTA IMUNE INATA NA INFECÇÃO POR HIV (VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA)", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em 29 de julho de 2011.

O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e suas complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0079.0.208.000-07  
Registro CEP: 1409.074/2007-04

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato Tambara Filho".

**Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR