

Iris Mattos Santos

Análise de possíveis fatores relacionados à resistência ao HIV em parceiros soronegativos de casais HIV-sorodiscordantes da região da grande Florianópolis

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências, área de concentração Microbiologia e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Iris Mattos

Análise de possíveis fatores relacionados à resistência ao HIV em parceiros soronegativos de casais HIV-sorodiscordantes da região da grande Florianópolis / Iris Mattos Santos ; orientador, Aguinaldo R. Pinto - Florianópolis, SC, 2014.

122 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. HIV. 3. aids. 4. casais sorodiscordantes. 5. resistência natural. I. Pinto, Aguinaldo R.. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

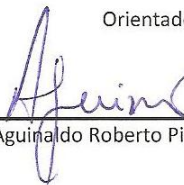
“Análise de possíveis fatores relacionados à resistência ao HIV em parceiros soronegativos de casais HIV-sorodiscordantes da região da grande Florianópolis”

Por

Iris Mattos Santos

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (28/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Aguinaldo Roberto Pinto (MIP/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



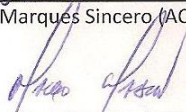
Dr(a) Cristina Beatriz C. Bonorino (PUCRS)



Dr(a) Maria Luiza Bazzo (ACL/CCS/UFSC)



Dr(a) Thais Marques Sincero (ACL/CCS/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 10 de dezembro de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus pais e a todas as pessoas que vivem com
HIV/aids.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a elaboração deste trabalho. Gostaria de poder retribuir a todas as pessoas que estiveram comigo durante esta caminhada, sem as quais eu não teria alcançado o meu objetivo. Em especial, gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Aguinaldo Roberto Pinto, pela confiança e por disponibilizar todos os recursos necessários ao desenvolvimento deste trabalho. Por me orientar e apoiar quando novas oportunidades surgiram em minha vida.

Ao Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura da UFSC e ao doutor Jair Alexander Téllez Meneses pelo apoio técnico. O auxílio de vocês foi essencial para a elaboração deste trabalho.

À Prof. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes do Departamento de Análises Clínicas da UFSC pelo auxílio com as análises estatísticas e, além disso, pelos seus conselhos científicos e sua amizade.

Ao doutorando Tiago Graf pela realização das análises dos subtipos de HIV e do tropismo viral.

À prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche da Universidade Estadual de Londrina pela realização da pesquisa da mutação CCR5 Δ 32.

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar esta dissertação. Gostaria de agradecer de forma especial à professora Dra. Maria Luiza Bazzo que, assim como a atual chefe da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC, a professora Dra. Maria Cláudia Santos da Silva, permitiu a conciliação das atividades do mestrado com minhas funções no HU.

Aos colegas e professores do Laboratório de Virologia Aplicada, em especial à Gislaíne Fongaro e à Mariana Rangel Pilotto pelas conversas e pelo auxílio durante os experimentos.

Aos funcionários do LAMEB pela boa vontade de sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC e demais órgãos (CAPES e FAPESC).

Aos integrantes e ex integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada da UFSC em especial à Mariane, à Vânia, à Amanda e à Renata pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus colegas de turma na Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pelo convívio durante as disciplinas.

Às melhores amigas, em especial à Leticia que sempre acreditou em mim, muitas vezes, mais do que eu mesma. À Chandra com quem divido a vida profissional e também a pessoal e à Camila pelos almoços e momentos de desabafo.

À minha família, minhas tias e minha irmã, pelo amor, suporte e incentivo. Toda a minha gratidão à Lú e à Léa pelo carinho, dedicação, apoio e por tudo que já fizeram e ainda fazem por nós.

Ao meu noivo Renan, meu amor e meu melhor amigo pelo amor, carinho e paciência. Obrigada pelo apoio nas horas mais difíceis e por compreender os momentos de ausência.

RESUMO

Atualmente, existem diversos relatos de indivíduos que se expuseram ao HIV e não se infectaram, sugerindo a existência de mecanismos de resistência natural. Esses indivíduos podem ser representados por parceiros soronegativos de casais sorodiscordantes. O objetivo deste estudo foi analisar possíveis fatores que podem conferir resistência à infecção pelo HIV em indivíduos expostos ao HIV e não infectados, que foram comparados com indivíduos HIV-soropositivos e com um grupo controle composto por indivíduos saudáveis não expostos ao vírus. Foi realizada análise do subtipo e do tropismo do vírus presente nos pacientes soropositivos e a pesquisa da mutação CCR5Δ32 em todos os indivíduos estudados. Identificou-se a presença do subtipo C do HIV em quatro (44,4%) dos nove indivíduos soropositivos analisados, subtipo B em dois indivíduos (22,2%), forma recombinante BC em dois pacientes (22,2%) e forma recombinante CFB em apenas um paciente (11,1%). Dessa forma, observou-se um predomínio do subtipo C. No entanto, devido ao pequeno número de indivíduos analisados, não foi possível realizar uma análise de prevalência ou uma relação de categoria de exposição com o subtipo encontrado. Não foi observado nenhum indivíduo homocigoto para a mutação CCR5Δ32, sendo dois (22,2%) indivíduos heterocigotos para essa mutação entre os nove HIV-soropositivos, dois (22,2%) entre os nove indivíduos soronegativos expostos ao HIV e um (9,1%) entre os indivíduos controle. Entre os pacientes infectados pelo HIV somente um apresentava infecção por um vírus X4; interessante, nesse mesmo paciente foi encontrada a forma heterocigota para a mutação CCR5Δ32, assim como para seu parceiro soronegativo. Esse resultado indica forte evidência de adaptação viral. Além disso, foi realizada a quantificação dos níveis dos transcritos de genes cujas proteínas estão envolvidas na infecção pelo HIV (APOBEC3G, CFLAR, TRIM5α, LEDGF/p75, BST-2 e SAMHD1) em linfócitos T CD4+ e monócitos de todos os grupos estudados. Não foram observadas diferenças significativas na expressão desses genes em linfócitos T CD4+ e monócitos de pacientes soropositivos, soronegativos e expostos e indivíduos controle. Dessa forma, considera-se que a capacidade de controlar a infecção ou retardar a progressão da doença é regulada por um equilíbrio entre fatores virais e do hospedeiro, sendo o estudo desses fatores muito importante para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na resistência ao HIV.

Palavras-chaves: HIV; aids; casais sorodiscordantes; resistência natural.

ABSTRACT

Currently there are many reports of individuals who were exposed to HIV and were not infected, suggesting the existence of mechanisms that lead to natural resistance to this virus. These individuals can be represented by seronegative partners of serodiscordant couples. The aim of this study was to analyze possible factors of resistance to HIV infection in HIV-exposed seronegative individuals when compared to HIV positive individuals and a control group of healthy individuals. Analysis of subtype and tropism viral present in HIV-seropositive patients and presence of CCR5 Δ 32 in all individuals were performed. Four (44.4%) out of nine HIV-1 isolates analyzed were classified as subtype C, 2 (22.2%) as B/C inter-subtype recombinants, 2 (22.2%) as subtype B, and one (11.1%) as B/C/F mosaic form. The most frequent HIV genetic form was subtype C. However, due to the small sample number, it was not possible to conduct a prevalence analysis or establish a relationship between exposure category and subtype found. The absence of the homozygous deletion CCR5 Δ 32 among HIV-seropositive, exposed seronegative subjects and HIV-seronegative volunteers was observed. In addition, two individuals (22.2%) among the nine HIV-positive were heterozygous for this mutation. Considering the HIV-seropositive individuals, only one showed infection by X4 virus. Interestingly, the same patient showed heterozygosity for the CCR5 Δ 32, as well as their HIV-negative partner. This result indicates strong evidence of viral adaptation. In addition, study of mRNA levels of genes whose proteins are involved in HIV infection (APOBEC3G, CFLAR, TRIM5 α , LEDGF/p75, BST-2 and SAMHD1) in T CD4+ lymphocytes and monocytes was performed. Similar mRNA levels of these genes were found in T CD4+ lymphocytes and monocytes from HIV-infected patients, HIV-exposed seronegative subjects, and healthy controls. Thus, it might be considered that the ability to control infection or delay disease progression is regulated by a balance between viral and host factors. Hence, the study of these factors is very important for the elucidation of mechanisms involved in the resistance to HIV-infection.

Key words: HIV; AIDS; serodiscordant couple; natural resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Indivíduos vivendo com HIV na América Latina em 2013 26
- Figura 02.** Taxa de detecção de casos de aids entre os estados brasileiros em 2014 27
- Figura 03.** Árvore filogenética de máxima verossimilhança de seqüências da região do Envelope (A) e da Polimerase (B) do HIV-1 66
- Figura 04.** Perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse 71
- Figura 05.** Gel de agarose 2,5% demonstrando os tamanhos dos produtos gerados a partir da amplificação por RT- qPCR dos genes de interesse 72
- Figura 06.** Perfis das curvas de dissociação dos possíveis genes de referência 73
- Figura 07.** Gel de agarose 2,5% demonstrando os tamanhos dos produtos gerados a partir da amplificação por RT-qPCR dos genes de referência 74
- Figura 08.** Gráfico gerado pela ferramenta disponível online *RefFinder* indicando os genes mais e menos estáveis em linfócitos T CD4+ 77
- Figura 09.** Gráfico gerado pela ferramenta disponível online *RefFinder* indicando os genes mais e menos estáveis para monócitos 77
- Figura 10.** Gráficos demonstrando média e desvio padrão da expressão relativa dos genes *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *SAMHD1*, *TRIM5a* e *LEDGF/p75* em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV-soropositivos, HESN e indivíduos controle utilizando os genes *B2M*, *RPL13A*, *TBP* e *UBC* como normalizadores 79
- Figura 11.** Gráficos demonstrando média e desvio padrão da expressão relativa dos genes *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *SAMHD1*, *TRIM5a* e

LEDGF/p75 em monócitos de pacientes HIV-soropositivos, HESN e indivíduos controle utilizando os genes *B2M*, *TBP* e *UBC* como normalizadores

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Características dos iniciadores utilizados	56
Quadro 02. Subtipo viral e tipo de exposição ao HIV	67
Quadro 03. Genotipagem do correceptor CCR5 nos membros dos casais sorodiscordantes e tropismo viral dos pacientes infectados pelo HIV	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Gênero e idade dos indivíduos estudados	63
Tabela 02. Tempo de diagnóstico da infecção, utilização de tratamento antirretroviral, carga viral e contagem de linfócitos T CD4+ dos pacientes HIV positivos	64
Tabela 03. Tempo de união e utilização de preservativo	65
Tabela 04. Polimorfismo do <i>CCR5</i>	68
Tabela 05. Valores dos coeficientes de correlação (R^2), inclinação da reta, eficiência da reação e temperatura de dissociação	75

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- Aids - Síndrome da imunodeficiência humana (do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*)
- APOBEC3G - do inglês *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex*
- BST-2 - do inglês *bone marrow stromal cells 2*
- B2M - Beta 2 microglobulina (do inglês *beta-2 microglobulin*)
- CCR5 - Receptor de quimiocina C-C do tipo 5
- CCR5Δ32 - Mutaco delta 32 no gene *CCR5*
- CFLAR* - Gene que codifica uma proteína reguladora da apoptose, semelhante à caspase 8
- CMV - Citomegalovírus
- CRF - Forma recombinante circulante (do inglês *circulating recombinant form*)
- Cq - Ciclo de quantificaco
- CXCR4 - Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4
- dNTPs - Deoxinucleosdeos trifosfatos (do inglês *deoxyribonucleotide triphosphates*)
- dGTP - Desoxiguanosina trifosfato (do inglês *2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate*)
- EBV - Epstein-Barr vírus
- Fw - Senso (do inglês *foward*)
- GalC - Galactosil ceramida
- GAPDH - *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (do inglês *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
- GPI - Glicosil-fosfatidil-inositol (do inglês *glycosylphosphatidylinositol*)
- HCV - Vírus da hepatite C (do inglês *hepatitis C virus*)
- HEMOSC - Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
- HESN - do inglês *highly exposed seronegative subjects*
- HLA - Antígeno leucocitário humano (do inglês *human leukocyte antigen*)
- HSH - Homens que fazem sexo com homens
- HSV-1 - Herpes vírus tipo 1
- HTLV - vírus T-linfotrópico humano (do inglês *Human T lymphotropic virus type 1*)
- IFN - Interferon
- IL - Interleucina
- IN - Integrase
- IP - Inibidores da protease viral
- ITR - Inibidores da transcriptase reversa

ITRN - Inibidores da transcriptase reversa nucleosídicos
ITRNN - Inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos
LEDGF/p75 - do inglês *lens epithelium-derived growth factor*
LTR - Repetições terminais longas (do inglês *long terminal repetitions*)
NFκβ - fator nuclear kappa beta (do inglês *nuclear factor κβ*)
pb - pares de base
PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cell*)
PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)
PR - Protease
qPCR - PCR quantitativa em tempo real
RPL13A - Proteína ribossomal L13a (do inglês *ribosomal protein L13a*)
RT-qPCR - qPCR precedida de Transcrição Reversa
Rv - Antissenso (do inglês *reverse*)
SAMHD1 - do inglês *sterile alpha motif and HD domain 1*
SDF-1 - do inglês *stromal derived factor 1*
SDF1-3'A - Mutação no gene *SDF1*
SIV - Vírus da imunodeficiência s mia (do inglês *Simian immunodeficiency virus*)
TARV - Terapia antirretroviral
TBP - Proteína de liga o TATA (do inglês *TATA box binding protein*)
TNF-  - Fator de necrose tumoral   (do inglês *tumor necrosis factor*)
TR - Transcriptase reversa
TRIM5  - do inglês *TRIPartite Motif 5 alpha*
UBC - Ubiquitina C (do inglês *ubiquitin C*)
UNAIDS - Programa das Na es Unidas para HIV/aids
URF - Forma recombinante única (do inglês *unique recombinant form*)
x g – Força gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Epidemiologia do HIV/aids	25
2.2 Estrutura, classificação e genoma viral	27
2.3 Infecção pelo HIV e progressão da doença	29
2.4 Resistência natural ao HIV.....	32
2.4.1 Fatores genéticos	34
2.4.2 Fatores imunológicos	35
2.5 Estudos com coortes de casais sorodiscordantes conduzidos no Brasil	41
3 HIPÓTESE	45
4 OBJETIVOS.....	47
4.1 Objetivo geral	47
4.2 Objetivos específicos	47
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA	49
5.1 Aspectos éticos	49
5.2 Local, população de estudo e critérios de inclusão.....	49
5.3 Coleta e processamento das amostras biológicas.....	50
5.4 Análise dos subtipos e predição do tropismo viral	51
5.5 Genotipagem do correceptor CCR5	52
5.6 Avaliação dos níveis de transcritos dos genes APOBEC3G, BST-2, CFLAR, SAMHD1, TRIM5α e LEDGF/p75	53
5.6.1 Extração e purificação do RNA total	53
5.6.2 Tratamento das amostras de RNA com DNase	53

5.6.3	Quantificação do RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)	54
5.6.4	Escolha e desenho de iniciadores	55
5.6.5	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	58
5.6.5.1	<i>Análise da especificidade dos iniciadores e das eficiências das reações de qPCR</i>	58
5.6.5.2	<i>Escolha dos genes de referência</i>	59
5.6.5.3	<i>Análise dos níveis de transcritos por RT-qPCR</i>	60
5.7	Análises estatísticas	60
6	RESULTADOS	63
6.1	Características da população estudada	63
6.2	Análise dos subtipos e predição do tropismo viral	65
6.3	Genotipagem do correceptor CCR5	67
6.4	Avaliação das quantidades de transcritos dos genes APOBEC3G, BST-2, CFLAR, SAMHD1, TRIM5α e LEDGF/p75	69
6.4.1	Análise da especificidade dos iniciadores e das eficiências das reações de qPCR e escolha dos genes de referência	69
6.4.2	Análise dos níveis de transcritos por RT-qPCR em linfócitos T CD4 + e monócitos	78
7	DISCUSSÃO	81
8	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	93
9	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o lentivírus responsável pelo desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência humana (aids) (BARRE-SINOUSI et al., 1983; LEVY et al., 1984), caracterizada por uma falência do sistema imune que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de infecções oportunistas (BARTLETT & MOORE, 1999). A identificação do HIV e sua relação com a aids foi uma das principais contribuições científicas do século passado e, atualmente, a infecção pelo HIV e a aids (HIV/aids) configuram uma importante pandemia. O HIV é transmitido por meio do contato com sangue e outros fluidos corporais através de relações sexuais desprotegidas, transfusão sanguínea e compartilhamento de seringas ou outros objetos cortantes e de forma vertical, principalmente no momento do parto ou da amamentação (LEVY, 2009). Atualmente, a principal forma de transmissão do vírus e manutenção da epidemia é através de relações sexuais desprotegidas entre indivíduos heterossexuais e é crescente o número de adolescentes e jovens do sexo feminino infectados (UNAIDS/WHO, 2014).

No Brasil, o diagnóstico dessa infecção é regulamentado pela Portaria 29, de 14 de dezembro de 2013, que aprovou o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças. Esse manual considera uma diversidade de cenários de infecção pelo vírus, uma vez que não é possível a utilização de apenas um fluxograma para cobrir todas as situações que se apresentam para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Após ser diagnosticado como portador da infecção pelo HIV, o indivíduo deve ser encaminhado prontamente para atendimento em uma Unidade Básica de Saúde do Sistema Único de Saúde ou para um Serviço de Assistência Especializada para que seja iniciado o tratamento (BRASIL^a, 2013). Recentemente, o Brasil alterou seu protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV, passando a disponibilizar tratamento gratuito através do Sistema Único de Saúde a todas as pessoas infectadas pelo HIV, independentemente da contagem de células T CD4+. Essa decisão visa alcançar níveis elevados de linfócitos T CD4+, evitar o desenvolvimento da doença e garantir uma melhor qualidade de vida aos indivíduos infectados, sendo baseada em evidências de benefícios clínicos e de redução da transmissão do HIV (BRASIL^b, 2013).

Existem diversos estudos a respeito da resistência natural ao HIV. No entanto, ainda não há consenso sobre quais fatores são determinantes para a diminuição da suscetibilidade ao vírus. É importante que se

estude as diferenças biológicas encontradas em indivíduos que se expõem ao vírus e não desenvolvem a infecção, pois, isso poderá possibilitar a elucidação dos mecanismos relacionados à resistência ao HIV. Nesse contexto, diversos trabalhos têm avaliado casais sorodiscordantes para a infecção pelo HIV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia do HIV/aids

Segundo relatório publicado pela UNAIDS (Programa das Nações Unidas para HIV/aids), existem aproximadamente 35 milhões de pessoas vivendo com HIV/aids em todo o mundo, sendo a África Sub-Saariana a região mais afetada, com 24,7 milhões de infectados. No entanto, aproximadamente 19 milhões de pessoas desconhecem sua condição sorológica. Estima-se que aproximadamente 0,8% dos indivíduos adultos com idade entre 15 e 49 anos e que 3,2 milhões de crianças com menos de 15 anos estejam infectados pelo HIV. Diferentemente do que acontece na África Sub-Saariana, em outras regiões do mundo, a maioria das pessoas que vive com HIV/aids é do sexo masculino.

Em 2013, foram registrados cerca de 2,1 milhões de novos casos de infecção em todo o mundo e a aids foi responsável por cerca de 1,5 milhões de mortes. Apesar de o número de novos casos no mundo ter diminuído cerca de 38% nos últimos doze anos e a quantidade de mortes associadas ao HIV ter sido reduzida em aproximadamente 37% desde 2005, alguns países, dentre eles o Brasil, ainda apresentam uma tendência contrária à global apresentando aumento nesses números. O número de novos casos de infecção pelo HIV cresceu 11% no Brasil entre 2005 e 2013, quando cerca de 42 mil pessoas contraíram o vírus. Em relação às mortes associadas ao HIV, esse aumento foi de 7%, chegando a aproximadamente 15 mil óbitos em 2013. Estima-se que atualmente 734 mil pessoas estejam infectadas pelo HIV no Brasil. Esse número representa quase metade do total de casos na América Latina, que é de aproximadamente 1,6 milhão (Figura 01). A maioria das pessoas infectadas na América Latina é do sexo masculino e vive em áreas urbanas. Além disso, cerca de um terço dos novos casos da doença ocorrem entre jovens de 15 a 24 anos (BRASIL, 2014; UNAIDS/WHO, 2014).

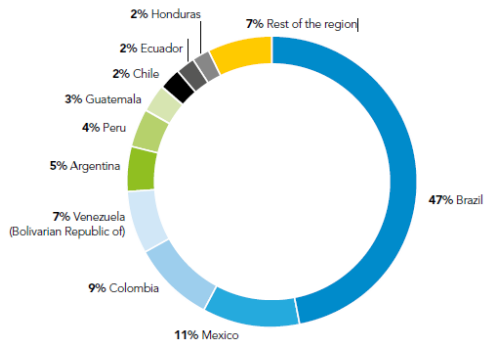


Figura 01. Indivíduos vivendo com HIV na América Latina em 2013
 Fonte: UNAIDS/WHO, 2014

Considerando os dados acumulados de 1980 a junho de 2014, foram notificados 757.042 casos de aids no Brasil, dos quais 65,0% são em pessoas do sexo masculino e 35,0% em pessoas do sexo feminino. Do total de casos registrados, 54,4% são provenientes da região Sudeste, 20,0% da região Sul, 14,3% da região Nordeste, 5,8% da região Centro-Oeste e 5,4% da região Norte (BRASIL, 2014). No Brasil, eram notificados apenas os casos de aids ou infecção pelo HIV em gestantes e crianças expostas ao risco de transmissão vertical (Portaria n° 2325/GM de 2003). No entanto, com o advento da Portaria n° 1.271, de 6 de junho de 2014, devem ser notificados não apenas os casos de aids, mas também todos os casos de infecção pelo HIV em todos os indivíduos.

Até o momento foram notificados mais de 270 mil óbitos em decorrência da aids, sendo que os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina apresentam as maiores taxas de detecção de casos de aids. No entanto, o estado do Amazonas ocupou o segundo lugar, deixando Santa Catarina em terceiro (Figura 02). Dentre as capitais brasileiras, até o ano de 2012, Porto Alegre e Florianópolis apresentavam as maiores taxas de casos da doença. Em 2012, Florianópolis passou a ocupar o quarto lugar, ficando atrás de Porto Velho e Manaus. Em Santa Catarina foram registrados 38.283 casos de aids e 10.463 mortes em decorrência do vírus até 2014. Em 2013 a incidência foi de 32,2 casos por grupo de 100 mil habitantes, uma das maiores entre os

estados brasileiros, sendo que os municípios com maiores números de casos da doença são Florianópolis, Brusque, Itajaí, Lages, Palhoça, Balneário Camboriú, São José, Joinville, Criciúma e Chapecó (BRASIL, 2014).



Figura 02. Taxa de detecção de casos de aids entre os estados brasileiros em 2014

Fonte: BRASIL, 2014

Outra particularidade da epidemia de HIV/aids no sul do Brasil é quanto ao subtipo viral circulante. Enquanto nas demais regiões do país, o subtipo B é responsável por 70 a 90% das infecções, na região sul, há o predomínio da infecção pelo subtipo C do HIV, seguido do subtipo F e recombinantes BC (GRÄF & PINTO, 2013). Corroborando esses dados, um estudo recente demonstrou, entre os pacientes infectados da região da grande Florianópolis, a prevalência de 65,8% de vírus subtipo C, 18,3% de subtipo recombinante BC, 13,4% do subtipo B, 1,2% do subtipo F1 e 1,2% do recombinante BCF1. Esse estudo também correlacionou o HIV do subtipo C e os recombinantes BC com a categoria de exposição heterossexual e o subtipo B com a categoria de exposição homossexual (GRÄF et al, 2011).

2.2 Estrutura, classificação e genoma viral

O HIV é um vírus envelopado esférico, com aproximadamente 100 nm de diâmetro, da família Retroviridae e gênero *Lentivirus*. O envelope é formado por uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro e pelas glicoproteínas gp120 e gp41. Internamente, o vírus contém uma matriz proteica que envolve o capsídeo viral, dentro do qual está localizado o genoma viral. Este é constituído por duas fitas simples de RNA de senso positivas associadas a três enzimas virais,

denominadas transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (BARRE-SINOUSSE, 1996).

De acordo com análise filogenética, o HIV é classificado nos tipos 1 e 2, sendo o HIV-1 responsável pela atual pandemia. O HIV-1 compreende os grupos M, N, O e P (ROBERTSON et al., 2000). O grupo M é responsável pela maior parte das infecções no mundo, sendo dividido em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) que são classificados conforme a similaridade de seus genomas. Existem também subdivisões, sendo o subtipo A composto de quatro sub-subtipos (A1, A2, A3 e A4) e o subtipo F de dois sub-subtipos (F1 e F2) (HIV-1 Database, 2012). Além disso, existem ainda formas recombinantes circulantes (CRFs), que são formas híbridas descendentes de um mesmo evento de recombinação entre dois subtipos diferentes que não apresentam vínculo epidemiológico entre os indivíduos comparados, bem como, formas recombinantes únicas (URF), cujas cepas virais não constituem um grupo filogenético definido (ROBERTSON et al., 2000). Essas formas recombinantes são geradas quando há co-infecção de um indivíduo com duas ou mais cepas virais, podendo levar à permuta de material genético entre elas resultando em vírus com genoma recombinante (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007).

O genoma do HIV-1 contém três genes estruturais e seis genes funcionais que codificam um total de quinze proteínas. Os genes estruturais são *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas do capsídeo viral através da formação de uma proteína de 55 kilodaltons (kD) que, após clivagem, origina proteínas virais da matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo. O gene *env* codifica as proteínas de superfície do envelope viral, gp120 e gp 41, que são responsáveis pela entrada do vírus na célula do hospedeiro. O gene *pol* codifica uma poliproteína de 160 kD que, após clivagem proteolítica, origina as enzimas envolvidas na replicação viral (TR, IN e PR). A TR é responsável pela síntese de DNA a partir do RNA viral e não é capaz de corrigir erros durante a transcrição, levando a altas taxas de mutações. A PR viral está envolvida no processamento pós-traducional das poliproteínas para produzir as proteínas estruturais do capsídeo viral e enzimas essenciais como TR e IN. A IN é essencial para incorporação do DNA viral ao DNA da célula do hospedeiro e também é responsável por outras funções, tais como: auxiliar na transcrição reversa, importação nuclear dos complexos, pré-integração e produção de partículas virais (CONNOR & HO, 1992; WATTS et al., 2009; MULDER et al., 2002). No genoma do HIV, também podem ser encontradas repetições terminais longas, conhecidas

como LTRs, que são sequências idênticas localizadas nas extremidades do genoma, que regulam a integração do DNA viral ao genoma da célula do hospedeiro, a expressão de genes virais e a replicação do vírus (PENG et al., 1989).

Além das proteínas estruturais, o genoma do HIV contém genes que codificam proteínas regulatórias e acessórias (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*). A proteína Tat regula a transcrição das LTRs e a Rev promove o transporte do RNAm do núcleo para o citoplasma. A proteína Nef está envolvida na patogênese do HIV-1, sendo capaz de diminuir o reconhecimento das células T CD4+ infectadas pelas células T CD8+. Vif está envolvida na capacidade infectiva dos vírions, a Vpr se liga ao complexo de pré-integração facilitando o transporte do material genético até o núcleo e atua na replicação viral em células que não estão em divisão e a Vpu facilita a liberação de vírions de células infectadas (FRANKEL & YOUNG, 1998; FREED, 2001). Atualmente, sabe-se que essas proteínas são responsáveis por proteger o vírus de fatores de restrição presentes nas células alvo do hospedeiro (VICENZI & POLI, 2013), regulando a replicação e a patogenicidade viral (CHEN, ZHANG & YING, 2012).

2.3 Infecção pelo HIV e progressão da doença

O HIV é capaz de infectar células do sistema imune através da fusão de glicoproteínas do envelope viral (gp120 e gp41) com a molécula CD4 e com os correceptores como CCR5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5) ou CXCR4 (receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4). Esses receptores localizam-se na membrana celular e são encontrados principalmente em linfócitos T, sendo comuns também em monócitos, macrófagos e outras células (BLUMENTHAL, DURELL & VIARD, 2012). A entrada do vírus se inicia com a ligação da gp120 a um domínio da molécula CD4 que resulta em uma reconfiguração da molécula gp120 e permite sua ligação aos correceptores CCR5 ou CXCR4. Após interação com o correceptor, peptídeos de fusão da gp41 são inseridos na membrana da célula alvo. Dessa forma, o vírus permanece ancorado à membrana celular e a gp41 catalisa a reação de fusão entre as bicamadas lipídicas virais e do hospedeiro, desencadeando a formação de poros de fusão e a liberação do capsídeo no citoplasma da célula (WONG-STAAAL, 1991; ECKERT & KIM, 2001). O HIV pode entrar nas células alvo do intestino, da mucosa vaginal e do cérebro utilizando a molécula GalC (galactosil ceramida) como receptor (FURUTA et al, 1994).

Os correceptores CXCR4 e CCR5 são considerados os mais importantes para mediar infecção pelo HIV. O CXCR4 é um receptor para quimiocinas, cujo ligante natural é o SDF-1 (do inglês, *stromal derived factor 1*) e o CCR5 é o receptor natural para as quimiocinas RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL2) e MIP-1 β (CCL4) que são produzidas e secretadas por células do sistema imune. Entretanto, existem outros correceptores para HIV-1 descritos, como o CCR2 e o CCR3 que são receptores fisiológicos para as quimiocinas MIP-1 α , RANTES, MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), eotaxina-2 (CCL24), eotaxina-3 (CCL26) expresso em eosinófilos e nas células da microglia (LEVY, 1993; RUCKER et al., 1996; ROSS & CULLEN, 1998).

No citoplasma, o vírus é desencapsulado e o RNA viral é transcrito pela TR em uma fita de cDNA que permanece associada a proteínas virais e celulares. O cDNA é transportado até o núcleo e a integração se dá através da ligação da IN às regiões LTR do cDNA recém transcrito e do reconhecimento de seqüências específicas no DNA do hospedeiro (LEWINSKI et al, 2006; VANDEGRAAFF & ENGELMAN, 2007). O genoma viral integrado ao genoma da célula hospedeira é denominado “pró-vírus”. Após ativação da expressão gênica e da RNA polimerase desencadeadas por citocinas da resposta imune celular provenientes do processo infeccioso gerado pelo HIV, ocorre a formação de RNA mensageiros, que são transportados para fora do núcleo, para serem traduzidos e processados pela PR (CONNOR & HO, 1992; FREED, 2001). Durante a tradução, inicialmente são sintetizados os genes reguladores e acessórios e depois, os genes estruturais (TURNER & SUMMERS, 1999; SWANSON et al., 2004). A seguir, ocorre o empacotamento do genoma viral, juntamente com as proteínas e enzimas virais para formarem os vírions, que se deslocam para a superfície da célula e brotam da membrana celular, levando parte da mesma para originar o envelope viral (WONG-STAAAL, 1991). As novas partículas virais liberadas são capazes de infectar outras células após o processo de maturação que ocorre no meio extracelular, dando continuidade ao ciclo infeccioso (TURNER & SUMMERS, 1999; FREED, 2001).

O curso normal da infecção pelo HIV pode ser dividido em três fases: aguda, crônica e tardia. A infecção aguda ou primária é caracterizada pelo período compreendido entre o momento da infecção até o desenvolvimento de uma resposta imune humoral, que leva de duas a seis semanas. Geralmente, é assintomática, podendo apresentar sintomas inespecíficos como febre, linfadenopatia, rash cutâneo, alterações gastrointestinais e alterações neurológicas (DAAR et al.,

1991). Esta fase corresponde a um período de alta replicação viral que alcança o pico aproximadamente, seis semanas após a infecção (BARTLETT & MOORE, 1999; LEVY, 2009). Também ocorre uma diminuição transitória na contagem de células T CD4+ (CLARK & SHAW, 1993; MELLORS et al., 1995). Antes da soroconversão, não é possível a detecção de anticorpos por testes laboratoriais, sendo essa fase conhecida como janela imunológica (STAPRANS & FEINBERG, 2004).

Aproximadamente seis meses após a soroconversão, o indivíduo infectado entra na fase de latência clínica na qual ocorre um equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro. Nessa fase, a viremia estabiliza-se em função de respostas antivirais desempenhadas pelos anticorpos anti-HIV, células natural killer (NK) e linfócitos T (CLARK & SHAW, 1993; LEVY, 2009). No entanto, a replicação do vírus se mantém nos órgãos linfoides e ocorre uma diminuição de células T CD4+ em decorrência da lise celular devido à intensa replicação viral, do efeito citopático do vírus nessas células, da permeabilidade da membrana celular devido ao brotamento de novas partículas virais, da destruição mediada por linfócitos T citotóxicos e NK, do comprometimento da medula óssea que inibe a produção de novas células, do estímulo da produção de anticorpos específicos, da autofagia e da indução da apoptose via ativação imune (LEVY, 2009; FORD, PURONEM & SERETI, 2009). Esse período é assintomático e corresponde à fase crônica da infecção, podendo durar muitos anos.

Na fase tardia, que ocorre ao final do período de latência, acontece uma ativação imune, que é demonstrada pela produção de citocinas pró-inflamatórias as quais estimulam a replicação viral e depleção constante dos linfócitos T CD4+ (FORD, PURONEM & SERETI, 2009). A diminuição do número de células T auxiliares desencadeia um quadro de imunossupressão muito acentuado e o indivíduo infectado desenvolve a aids (BARTLETT & MOORE, 1999; STAPRANS & FEINBERG, 2004). Além disso, ocorre proliferação de células B e uma hipergamaglobulinemia (LEVY, 2009) e, em consequência de todos esses eventos, o organismo passa a apresentar quadros infecciosos causados por agentes oportunistas, como pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii*, infecções na orofaringe por *Candida spp.*, encefalite por *Toxoplasma gondii*, meningite criptococócica, retinite por citomegalovírus, criptosporidiose, microsporidiose e infecções disseminadas pelo complexo *Mycobacterium avium*, candidíase mucocutânea, além de neoplasias

como o Sarcoma de Kaposi e linfomas de células B (DE COCK, JAFFE & CURRAN, 2011).

2.4 Resistência natural ao HIV

A história natural da infecção pelo HIV é complexa e variável, podendo apresentar diferentes padrões de progressão da doença (MIYAZAWA et al., 2009; RUGELES, VELILLA & MONTOYA, 2011). Ainda não há um consenso na categorização dos pacientes, no entanto, algumas classificações baseadas na duração da fase assintomática têm sido descritas e incluem as seguintes categorias: progressores típicos, progressores rápidos, progressores lentos e controladores de elite (SOOGOR & DAAR, 2005). Aproximadamente, 70 a 80% dos indivíduos infectados são considerados progressores típicos, ou seja, desenvolvem aids de 8 a 10 anos após a infecção pelo HIV (SHARMA, KAUR & MEHRA, 2011). Os pacientes que após a soroconversão apresentam rápido declínio de células TCD4+ e progridem para aids em um período de tempo inferior a cinco anos são denominados progressores rápidos e correspondem a cerca de 10% do total de infectados (TABORDA-VANEGAS, ZAPATA & RUGELE, 2011). Por outro lado, 5 a 10% dos indivíduos soropositivos permanecem assintomáticos por períodos superiores a 10 anos e apresentam níveis de células T CD4+ relativamente altas (> 500 células por μL) na ausência de TARV e são denominados de progressores lentos. Além desses, existem indivíduos que apresentam um controle espontâneo da replicação viral durante, pelo menos, um ano sem a terapia antiviral. São chamados de controladores de elite quando capazes de manter a carga viral indetectável, ou, controladores de viremia quando mantêm a carga viral menor que 2.000 cópias por mL. Os controladores de elite representam aproximadamente 1% dos casos e apresentam características que permitem uma resposta imune celular robusta capaz de controlar a replicação e os reservatórios virais (DEEKS & WALKER, 2007; AUTRAN et al., 2011).

Existem relatos de indivíduos que se expuseram ao vírus e não se infectaram, sugerindo a existência de mecanismos de resistência natural ao HIV (SHARMA, KAUR & MEHRA, 2011; TABORDA-VANEGAS, ZAPATA & RUGELE, 2011). Esses indivíduos que apresentam alto risco devido à exposição e não são infectados são denominados HESN (do inglês, *highly exposed seronegative subjects*) e tem sido estudados desde o final da década de 80 quando foram identificados linfócitos T CD8+ específicos contra o HIV em parceiros

não infectados de pessoas soropositivas (RANKI et al., 1989). Sabe-se que essas pessoas já se expuseram por via vertical ou expõem-se de forma repetida por via sexual e/ou parenteral, ou, apresentam comportamento de alto risco em áreas de alta prevalência e, mesmo assim, não demonstram sinais de imunodeficiência ou evidências sorológicas da infecção (HORTON et al., 2010; TABORDA-VANEGAS, ZAPATA & RUGELE, 2011). Esses indivíduos expostos e não infectados podem ser representados por parceiros heterossexuais e homossexuais de pacientes soropositivos, profissionais do sexo e pessoas que apresentam formas de exposição não sexual como bebês saudáveis nascidos de mães HIV-soropositivas que não receberam tratamento antirretroviral, usuários de drogas injetáveis e outros que se expuseram a materiais contaminados (SHEARER & CLERICI, 1996; FOWKE et al., 1996; SUY et al., 2007; MIYAZAWA et al., 2009, SHARMA, KAUR & MEHRA, 2011; TABORDA-VANEGAS, ZAPATA & RUGELE, 2011). Os HESN, assim como os controladores de elite e os progressores lentos, são indicativos da existência de respostas imunes que levam à proteção contra o HIV.

Atualmente a transmissão do HIV pela via sexual é responsável por 80% de todas as infecções notificadas no mundo (RUGELES, VELILLA & MONTOYA, 2011). Dessa forma, o estudo de casais sorodiscordantes, ou seja, casais em que apenas um dos parceiros está infectado, é muito importante para a elucidação de mecanismos de resistência ao vírus (MIYAZAWA et al., 2009). O estudo de fatores com potenciais ações antivirais nem sempre é fácil, tendo em vista que muitos componentes podem influenciar na transmissão do vírus, como a carga viral do indivíduo infectado, vírus com baixa capacidade infectiva, utilização de preservativos, gravidez, circuncisão e administração de medicamentos antirretrovirais (CURRAN et al., 2012). A resistência natural ao HIV tem sido objeto de muitos estudos. No entanto, ainda não existe um consenso a respeito de quais são os fatores determinantes na diminuição da suscetibilidade ao vírus e se essa resistência pode estar associada a fatores genéticos do hospedeiro, ou à sua resposta imune perante a infecção, ou se a características inerentes ao próprio vírus (SORIANO et al., 2002; PIACENTINI et al., 2008; MIYAZAWA et al., 2009; TABORDA-VANEGAS, ZAPATA & RUGELE, 2011; TOMESCU, ABDULHAQQ & MONTANER, 2011).

2.4.1 Fatores genéticos

Como descrito anteriormente, para que ocorra a infecção pelo HIV, é necessário que um correceptor esteja localizado na membrana da célula, além do receptor CD4. Os vírus que apresentam tropismo ao correceptor CCR5 são chamados R5 e predominam durante a fase assintomática da infecção (CHENG-MAYER et al., 1997; BERGER, MURPHY & FARBER, 1999). A mutação delta 32 (CCR5 Δ 32) é uma deleção de 32 nucleotídeos do gene *CCR5* que tem sido amplamente estudada, por ser relacionada à resistência a esse vírus gerando uma proteína diferente do receptor de quimiocina CCR5. Indivíduos homocigotos apresentam resistência à infecção pelo HIV, enquanto indivíduos heterocigotos demonstram menores índices de progressão para a aids (SAMSON et al., 1996; SORIANO et al., 2002). Essa mutação é considerada rara na população (REICHE et al., 2008; SHARMA, KAUR & MEHRA, 2011). Outros polimorfismos na região regulatória do gene *CCR5* também podem ser responsáveis por uma resistência ao HIV, pois são capazes de gerar diferentes haplótipos que podem estar envolvidos com uma diminuição da transmissão da doença (GONZALEZ et al., 1999). Além disso, o aumento da expressão de genes que codificam ligantes naturais de CCR5, como as quimiocinas MIP1- α P (CCL3L1), RANTES, MIP1- α e MIP1- β (MACKAY, 2005; PILOTTI et al., 2007) também podem contribuir para a resistência ao HIV, uma vez que essas moléculas competem com o vírus pela ligação ao correceptor. Os vírus que apresentam afinidade ao correceptor CXCR4 são denominados X4. Uma substituição de guanina por adenina na posição 801 de uma região não traduzida do gene *CXCR4* pode gerar um alelo polimórfico SDF1-3'A que codifica um ligante de CXCR4 capaz de regular negativamente a sua expressão podendo, desta maneira, estar associado à resistência (SORIANO et al., 2002).

Também há relatos na literatura de que a presença de certos alelos do complexo principal de histocompatibilidade humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) possam estar associados com um padrão de resistência natural ao HIV, bem como no retardamento da progressão da doença, provavelmente por potencializar a ação das células T citotóxicas (CARRINGTON & BONTRON, 2002). Como

exemplos desses polimorfismos, pode-se citar HLAB*27, HLAB*57, HLABw4, HLAB*51, HLAB*58:01, HLAB*13, HLAB*81:01, 13-DQB1*06, DRB1*01 e DRB1*13:03 (HEENEY, DALGLEISH & WEISS, 2006; PIACENTINI et al., 2008; FEINBERG & AHMED, 2012).

2.4.2 Fatores imunológicos

A maioria dos casos de transmissão do HIV ocorre pela exposição de mucosas ricas em células dendríticas (DC) e macrófagos. A presença das quimiocinas RANTES, MIP1- α e MIP1- β no local da infecção pode diminuir a suscetibilidade à infecção. Além dos ligantes naturais dos receptores utilizados pelo HIV, outras quimiocinas podem estar relacionadas com a resistência à infecção pelo vírus, como eotaxina-1 (CCL11) e MCP-1 (CCL2) (DESHMANE et al., 2009; PROMADEJ-LANIER et al., 2010). Peptídeos antimicrobianos secretados pelas células epiteliais de mucosas, como as α e β -defensinas, também têm sido relacionados com um papel protetor na infecção pelo HIV, pois, podem inibir a entrada do vírus na célula e a replicação viral (SUN et al., 2005; KLOTMAN & CHANG, 2006; SEIDEL et al., 2010). Células do sistema imune como as DC e NK podem reforçar a barreira natural contra a infecção pelo HIV (MAILLIARD et al., 2003). As DCs são células apresentadoras de antígenos e produzem diversas citocinas, tais como IL-12, IL-15, IL-18 e IFN tipo I (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). As células NK apresentam atividade antiviral mediante a produção de citocinas, como IFN- γ e IL-12, e através da lise de células infectadas ou alteradas, além de interagirem com células T modulando a resposta imune adaptativa (MAILLIARD et al., 2003). A ativação e a quantidade das células NK têm sido associadas a mecanismos protetores naturais contra a infecção pelo HIV em HESN (SCOTT-ALGARA et al., 2003; BOULET et al., 2008). No início da infecção, macrófagos são rapidamente infectados pelo HIV e, dessa maneira, a apoptose sofrida por essas células pode ser considerada um dos mecanismos de prevenção à infecção por este vírus (VELILLA et al., 2005). No entanto, quando esse tipo de célula é infectada, formam-se os reservatórios virais latentes, pois, são relativamente resistentes ao

efeito citopático do HIV. Ademais, quando essas células são infectadas, passam a apresentar defeitos na apresentação de antígenos e secreção de citocinas (KELLY et al., 2008).

A imunidade inata compreende também fatores intracelulares responsáveis pela defesa do hospedeiro contra determinados agentes infecciosos. As células apresentam fatores que são induzidos pela infecção pelo HIV e influenciam no processo de resistência ao vírus. Esses fatores podem apresentar atividades antivirais como é o caso da APOBEC3G, TRIM5 α , BST-2, CFLAR e SAMHD1 ou pró-virais como LEDGF/p75. As proteínas antivirais também podem ser chamadas de fatores de restrição e são constitutivamente expressas ou induzidas por interferons (BLANCO-MELO, VENKATESH & BIENIASZ, 2012).

A APOBEC3G (do inglês *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex*) foi uma das primeiras proteínas descritas com atividade anti-HIV (SHEEHY, GADDIS & MALIM, 2003). Ela faz parte do grupo das citidina deaminases que agem convertendo as citosinas em uracilas na fita de DNA ou RNA. Essa proteína tem sua ação baseada no bloqueio da replicação através de uma potente habilidade em gerar mutações no DNA que acarretam uma redução da síntese de DNA e degradação do DNA viral (BIASIN et al., 2007; MBISA et al., 2007). Isso acontece porque após a entrada do vírus na célula e seu desencapsulamento, a TR inicia a transcrição do RNA em cDNA e, durante a síntese da primeira fita de DNA proviral, a deaminação dos resíduos de citosina dependente da APOBEC3G resulta em um acúmulo de uracila que é reconhecida como timina pela TR e, conseqüentemente, a adenina é incorporada à segunda fita de DNA no lugar de guanina. Essa mutação no genoma viral bloqueia a replicação do vírus uma vez que pode ocorrer a produção de proteínas virais não-funcionais, além de comprometer a integração do provírus ao DNA do hospedeiro (MANGEAT et al., 2003; YU et al., 2004; NEWMAN et al., 2005). A APOBEC3G pode ser incorporada aos novos vírions formados na célula (SHEEHY et al., 2002) e sua atividade antiviral pode ser inibida pela proteína Vif (SHEEHY et al., 2003; MILLER, PRESNYAK & SMITH, 2007).

A TRIM5 α pertence à família de proteínas TRIM (do inglês *TRIPartite Motif*) e tem função de E3-ubiquitina-ligase. Além disso, apresenta uma função espécie-específica de restrição de retrovírus (STREMLAU et al., 2004; LUKIC & CAMPBELL, 2012). Essa proteína reconhece o HIV imediatamente após sua entrada na célula e liga-se ao capsídeo viral formando uma rede que bloqueia o desencapsulamento e, dessa maneira, inibe a fase precoce da replicação viral (WOLF & GOFF, 2008). Além disso, o contato com o HIV potencializa a condução de uma resposta imune inata mediada pela TRIM5 α . Isso ocorre porque após a ligação ao capsídeo, em conjunto com o complexo enzimático UBC-13-UEV1A, essa proteína catalisa a síntese de cadeias de ubiquitina que ativam o complexo quinase TAK1 por autofosforilação. A ativação do complexo TAK1 resulta na indução e expressão de genes dependentes de NF- κ B (STREMLAU et al., 2006; LUBAN, 2012; KUTLUARY, PEREZ-CABALLERO & BIENIASZ, 2013). Em seres humanos, essa capacidade de reconhecimento de retrovírus e inibição da infecção é pequena e pode ser aumentada através da substituição de apenas um aminoácido. Polimorfismos na região de TRIM5 α podem afetar a suscetibilidade à infecção pelo HIV (YAP, NISOLE & STOYE, 2005; SPEELMON et al., 2006).

A molécula BST-2 (do inglês *bone marrow stromal cells*) é uma proteína transmembrana que apresenta um domínio N-terminal uma âncora C-terminal de glicosil-fosfatidil-inositol e é induzida por interferons do tipo I. Foi identificada em células B maduras e nomeada devido à sua expressão em células estromais da medula óssea e, recentemente, tem sido demonstrado que possui uma função na organização do citoesqueleto (GOTO et al., 1994; ROLLASON et al., 2009). Em células T infectadas pelo HIV, age como fator de restrição, pois, retém partículas virais nascentes na membrana da célula bloqueando a liberação de novos vírions (NEIL, ZANG & BIENIASZ, 2008; VAN DAMME, 2008). BST-2 exerce essa função através da inserção da GPI no envelope viral ou da dimerização de duas moléculas de BST-2, sendo que uma conecta-se à membrana viral e outra à membrana celular. Os vírions capturados são internalizados por endocitose e degradados nos lisossomos (EVANS et al., 2010; HARRIS,

HULTQUIST & EVANS, 2012). Além disso, a BST-2 atua como um sensor de reconhecimento do vírus que desencadeia a expressão de genes pró-inflamatórios como os dependentes de NFκB (GALÃO et al., 2012; HOTTER, SAUTER & KIRCHHOFF, 2013). O gene acessório *vpu* do HIV codifica uma proteína transmembrana responsável pela degradação do receptor CD4 e facilita a liberação de novos vírions de células infectadas (KLIMKAIT et al., 1990), agindo como antagonista da BST-2 (MALIM & BIENIASZ, 2012). A proteína Vpu é capaz de internalizar e seqüestrar a BST-2 em compartimentos distantes dos locais de brotamento dos vírions. Além disso, a Vpu pode recrutar um complexo ubiquitina ligase E3 que promove a ubiquitinação da BST-2, deixando-a suscetível à degradação em lisossomos (LAU, KWAN & GUATELLI, 2011; HARRIS, HULTQUIST & EVANS, 2012).

A proteína SAMHD1 (do inglês *sterile alpha motif and HD domain 1*) é composta de um domínio N-terminal SAM responsável pela interação com outras proteínas e um domínio C-terminal HD que contém resíduos conservados de histidina e aspartato. Sua função parece estar vinculada à mediação de respostas inflamatórias mediadas por TNF-α e, em células infectadas pelo HIV, apresenta atividade antirretroviral indireta. A SAMHD1 inibe a replicação viral em monócitos/macrófagos e DCs através da depleção dos desoxinucleosídeos trifosfatos (dNTPs) necessários à síntese do DNA retroviral (SCHALLER, GOUJON & MALIM, 2012; LAHOUASSA et al., 2012). Dímeros de SAMHD1 ligam-se a moléculas de dGTP no núcleo celular e desenvolvem uma atividade de trifosfohidrolase. Essa SAMHD1 ativa faz a hidrólise dos dNTPs a desoxinucleosídeos e trifosfatos inorgânicos no núcleo, o que resulta em uma depleção do repertório de dNTPs citoplasmáticos a níveis tão baixos que bloqueia a transcrição reversa do HIV (CHEN, ZHANG & YING, 2012). Sabe-se que o HIV-2 e o SIV (vírus da imunodeficiência símia) são capazes de codificar a Vpx, uma proteína nuclear que interage com a SAMHD1, inibindo-a. A Vpx migra até o núcleo e liga-se a SAMHD1, fazendo com que ela seja recrutada por um complexo CRL4 no citoplasma que induz sua ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal (HRECKA et al., 2011; LAGUETTE et al., 2011).

A molécula CFLAR é uma proteína caracterizada por inibir a apoptose induzida por receptores de morte, como Fas, ou relacionados ao fator de necrose tumoral. A forma completa de CFLAR contém dois domínios N-terminal DEDs e um domínio C-terminal semelhante à caspase que a torna estruturalmente similar às caspases 8 e 10. No entanto, não tem função de caspase por carecer de um resíduo de cisteína. As células infectadas com HIV podem sofrer apoptose através de duas vias principais: extrínseca (mediada por um receptor de morte, como Fas) e intrínseca (mediada pela mitocôndria) (YUE et al., 2005). Atualmente, acredita-se que moléculas com atividade pró-apoptótica, como ligante de Fas (FasL), FADD e p53, estimulam a replicação do HIV em células infectadas (WANG et al., 2009; WANG et al., 2011). Dessa forma, a inibição da apoptose seria capaz de reduzir a replicação viral. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está bem elucidado, mas sugere-se que a CFLAR seja capaz influenciar em vários estágios do ciclo de infecção, como na liberação do RNA viral, transcrição reversa e montagem de novas partículas virais por meio do aumento da expressão de APOBEC3G, TRIM5α e BST-2, diminuição da expressão do fator nuclear 1C, inativação de quinases como a p38 e a ERK (via MAPK), diminuição da expressão de Fas e redução da ativação da apoptose por FADD (TAN et al., 2013).

Durante a replicação do HIV, após a transcrição reversa, ocorre a integração do DNA recém transcrito no genoma da célula hospedeira. Esse processo depende de fatores virais e de fatores do indivíduo infectado. A LEDGF/p75 (do inglês *lens epithelium-derived growth factor*) age facilitando a infecção pelo HIV por auxiliar a integração do DNA viral em regiões específicas do cromossomo da célula hospedeira (CHEREPANOV et al., 2003). Essa integração ocorre em regiões do genoma que contêm genes ativos, provavelmente para promover uma expressão eficiente de genes virais (ENGELMAN & CHEREPANOV, 2008; CHRIST & DEBYSER, 2013). A integrase viral interage com outras proteínas para formar o complexo de pré-integração após a formação do DNA, ocasionando a hidrólise de um dinucleotídeo do fim de cada molécula de DNA e conseqüente transferência da fita de DNA até o local de integração no núcleo da célula, originando um

intermediário de DNA recombinante descontínuo que é reparado para formar o pró-vírus (CIUFFI & BUSHMAN, 2006; CHRIST & DEBYSER, 2013). A LEDGF liga-se à IN e à cromatina da célula hospedeira, facilitando esse processo e, um bloqueio nessa interação, seja por mutação na IN ou na LEDGF, pode inibir a replicação do HIV (MADLALA et al., 2011).

Após ultrapassar a barreira natural imposta pelas defensinas, β -quimiocinas, DCs e células NK, o HIV-1 infecta as células T CD4+. A ação dessas células baseia-se na produção de citocinas e ativação das células T CD8+ e sua depleção diminui a resposta imune do organismo à infecção (NORRIS et al., 2004). Linfócitos T CD4+ específicos foram descritos em HESN (EYESON et al, 2003) e demonstraram secreção aumentada de citocinas como IL-17 e a IL-22 (CHEGE et al., 2012). Essas células parecem produzir menores quantidades de IL-10 e altos níveis de IL-2, RANTES e MIP-1 β , além de ser capazes de suprimir *in vitro* a replicação do vírus em macrófagos. Além disso, foram detectadas quantidades superiores de transcritos de TNF- α e TNF- β em linfócitos de HESN quando comparados com pacientes HIV-soropositivos e indivíduos saudáveis (MIYAZAWA et al., 2009).

Os linfócitos T CD8+ específicos (CTLs) são capazes de fazer o controle da replicação viral na resposta imune inata e adaptativa. Durante a resposta imune inata, os CTLs desenvolvem uma resposta mediada por um fator antiviral (CAF) que bloqueia a transcrição viral sem destruir a célula infectada. Esse sistema parece estar aumentado em indivíduos infectados que apresentam padrão de progressão lenta à doença (LEVY, 2003). Já na resposta imune adaptativa, sua ação baseia-se em sua capacidade citotóxica após reconhecer epítomos virais específicos expressos na membrana das células infectadas. Existem relatos da presença de CTLs HIV-específicos em indivíduos que já se expuseram ao vírus e não se infectaram (RANKI et al., 1989; PIACENTINI et al., 2008). Isso pode ser explicado pelo mecanismo no qual as células dendríticas agem no processamento viral e realizam a apresentação desses epítomos às CTLs, sem que haja replicação viral. Nesse caso, a formação de CTLs específicas não é proveniente de uma infecção pelo HIV. O conteúdo dos grânulos citotóxicos dos linfócitos T

CD8+, composto de perforinas e granzimas, é essencial para o controle da infecção pelo HIV e linfócitos isolados de HESN apresentam altos níveis desses grânulos, quando comparados ao parceiro soropositivo (MIYAZAWA et al., 2009). Estudos, como os que incluem profissionais do sexo do Quênia, demonstraram que a persistência de células T CD4+ e T CD8+ específicas em indivíduos que têm contato ao HIV é fortemente relacionada à exposição contínua, pois, a resposta desempenhada por essas células cessa de 6 a 9 meses após a exposição (MARMOR et al., 2006).

Por fim, a infecção pelo HIV gera uma imunidade humoral que tem sido associada à hiperativação crônica dos linfócitos B, devido à presença de altas concentrações de citocinas e à interação com células T CD4+ ou com a partícula viral (MARTINEZ-MAZA et al., 1987). A resposta inicial de anticorpos anti-HIV é essencialmente dirigida contra epítopos das glicoproteínas de envelope e não tem ação neutralizante. A produção de anticorpos neutralizantes é tardia devido à depleção das células T CD4+ (TOMARAS et al. 2008). Em HESN, tem sido observados anticorpos anti-HLA, anti-CCR5 e anti-CD4 (MIYAZAWA et al., 2009), além dos anticorpos IgA HIV-específicos presentes na secreção vaginal, saliva, soro, leite materno e líquido uretral (CHOY et al., 2012; TRABATTONI, BIASIN & CLERICI, 2012).

2.5 Estudos com coortes de casais sorodiscordantes conduzidos no Brasil

No Brasil existem poucos estudos com grupos de casais sorodiscordantes para a infecção pelo HIV e isso pode ser resultado da dificuldade em recrutar tais indivíduos. Em 2005 foi realizado em Londrina, Paraná, um estudo a fim de avaliar características sociodemográficas e epidemiológicas associadas com a infecção pelo HIV em 1.061 indivíduos. Nesse estudo foram avaliados 136 indivíduos saudáveis, 147 HESN, 161 indivíduos soropositivos assintomáticos e 617 indivíduos soropositivos que apresentavam características laboratoriais compatíveis com o desenvolvimento da aids (naquele momento, número de linfócitos T CD4+ no sangue inferior a 350 células por mm³). A idade dos integrantes do estudo variou de 15 a 79 anos e a maioria dos soropositivos era do sexo masculino, heterossexuais e infectaram-se por meio de relação sexual desprotegida. Os pacientes

com aids demonstraram maiores porcentagens de outras doenças como sífilis, hepatite C e infecção por HTLV I e II do que os HESN e indivíduos saudáveis (REICHE et al., 2005). Dois outros estudos do mesmo grupo de pesquisa avaliaram a presença de mutações nos genes dos correceptores CCR5 e CXCR4 em indivíduos saudáveis, indivíduos HIV-soropositivos e HESN também do estado do Paraná. O primeiro foi publicado em 2006 e, utilizando amostras de DNA dos mesmos indivíduos do estudo anterior, avaliou a frequência do polimorfismo no gene *SDF1* e a presença do alelo *SDF1-3´A*. A partir desse trabalho, concluiu-se que apenas a presença do alelo *SDF1-3´A* não seria suficiente para prevenir a infecção pelo HIV, pois, foi encontrada uma baixa frequência entre os indivíduos e não foi encontrada diferença significativa entre os grupos avaliados (REICHE et al., 2006). Posteriormente, em 2008 foi publicado um estudo sobre a frequência da mutação *CCR5Δ32* em 134 indivíduos saudáveis, 145 HESN, 152 indivíduos soropositivos assintomáticos e 478 indivíduos soropositivos com aids. A maioria desses indivíduos fazia parte da coorte anterior. A mutação *CCR5Δ32* em sua forma homozigota foi observada em dois dos indivíduos saudáveis e 1 dos HESN, não sendo encontrada entre os soropositivos. A ausência da mutação *CCR5Δ32* na forma homozigota entre os indivíduos HIV-soropositivos sugere a importância desse fator genético na diminuição da suscetibilidade ao HIV. Também foi observada uma maior frequência dessa mutação em sua forma heterozigota nos indivíduos HIV-soropositivos assintomáticos em relação aos com aids e, dessa forma, pode-se associar a presença dessa alteração genética à diminuição da progressão da doença. No entanto, a baixa frequência da forma homozigota da mutação *CCR5Δ32* observada nos HESN demonstra que somente a presença desse alelo não explica a resistência natural à infecção pelo HIV (REICHE et al., 2008).

Outro trabalho investigou a transmissão sexual do HIV entre casais sorodiscordantes de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Para isso, foi avaliada uma coorte de 93 casais heterossexuais sorodiscordantes ao HIV. Esses indivíduos foram recrutados de fevereiro de 2000 a janeiro de 2006 em um centro de referência do sul do Brasil. Foi demonstrado que existe uma tendência maior para que a transmissão do HIV ocorra de indivíduos do sexo masculino para o sexo feminino e que a carga viral é um fator importante para a transmissão do vírus entre os casais. Dessa forma, demonstrou que a utilização de TARV pode desempenhar um papel na prevenção da transmissão do HIV entre indivíduos heterossexuais (MELO et al., 2008).

Em outro estudo, conduzido por Rosa (2013), foram recrutados 9 casais sorodiscordantes e 12 indivíduos saudáveis da região da grande Florianópolis, dos quais foram analisados fatores ambientais e comportamentais que pudessem estar relacionados ao controle da infecção, bem como a presença de quimiocinas e defensinas no plasma e na saliva destes voluntários. Observou-se que os parceiros soropositivos apresentavam menores concentrações da defensina HBD3 na saliva e maiores concentrações da quimiocina RANTES no plasma. Além disso, foi observado que as quimiocinas MCP-1 α e eotaxina-1 estavam presentes em maiores concentrações no plasma dos parceiros soronegativos. Quanto aos aspectos ambientais e comportamentais, observou-se que os valores de IMC, prática de atividade física, sono e consumo de álcool foram semelhantes entre os indivíduos estudados e que somente entre os casais sorodiscordantes houve transfusões sanguíneas, presença de tabagistas e usuários de drogas ilícitas. O grau de escolaridade, a renda familiar média e o consumo de cereais foram maiores entre os indivíduos do grupo controle (ROSA, 2013). As amostras coletadas foram utilizadas para a realização do presente estudo.

Mais recentemente, um estudo avaliou o perfil de ativação dos linfócitos T CD4 $^+$ e T CD8 $^+$ em 14 HESN que se apresentavam em uma relação de sorodiscordância ao HIV da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. A análise dos dados obtidos demonstrou uma maior ativação das células T CD4 $^+$ e T CD8 $^+$ virgens e de memória nos HESN quando comparados com indivíduos saudáveis, pois se verificou maior quantidade de células T CD4 $^+$ HLA-DR $^+$, CD8 $^+$ HLA-DR $^+$, CD4 $^+$ CD45RO $^+$, CD4 $^+$ CD45RO $^+$ CD62L $^+$, CD8 $^+$ CD45RA $^+$ HLA-DR $^+$ e CD8 $^+$ CD45RO $^+$ HLA-DR $^+$, além da redução de células T CD8 $^+$ CD28 $^+$ nos HESN avaliados. Além disso, não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão de CCR5 nos linfócitos T CD4 $^+$ entre os HESN e os indivíduos saudáveis e observou-se uma menor expressão de CD16 nos monócitos de HESN (SILVA et al, 2014).

Diante do que foi exposto, isto é, o grande número de casos de infecção pelo HIV no Brasil e a existência de mecanismos de resistência natural em HESN de casais sorodiscordantes, é de suma importância que se estude os fatores que influenciam na suscetibilidade à infecção pelo HIV nesses indivíduos. Além disso, é necessário que sejam realizados estudos de diversas coortes, pois a população brasileira é etnicamente muito diversificada. O presente trabalho foi realizado com casais sorodiscordantes provenientes da região de Florianópolis, Santa

Catarina e teve por objetivo a quantificação relativa de *APOBEC3G*, *CFLAR*, *TRIM5a*, *LEDGF/p75*, *BST-2* e *SAMHD1*. Essa avaliação é inédita em populações brasileiras. Além disso, este estudo diferencia-se de outros por avaliar também fatores genéticos e fatores inerentes ao próprio vírus. Dessa forma, pode-se tentar realizar uma correlação entre os múltiplos fatores imunológicos, genéticos e virológicos com a resistência à infecção.

3 HIPÓTESE

Indivíduos soronegativos expostos ao HIV apresentam diferenças biológicas que contribuem para a resistência à infecção.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a possíveis fatores relacionados com a resistência à infecção pelo HIV, como a presença da mutação CCR5 Δ 32 e a alteração da transcrição de APOBEC3G, CFLAR, TRIM5 α , LEDGF/p75, BST-2 e SAMHD1, em parceiros soronegativos de casais HIV-sorodiscordantes da grande Florianópolis.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar o subtipo viral encontrado nos pacientes HIV-soropositivos;
- Analisar a presença da mutação CCR5 Δ 32 em todos os indivíduos e o tropismo do vírus nos pacientes infectados;
- Quantificar os transcritos gênicos de APOBEC3G, CFLAR, TRIM5 α , LEDGF/p75, BST-2 e SAMHD1 em linfócitos T CD4+ e monócitos de indivíduos HIV-soropositivos, HESN e HIV-soronegativos (doadores de plaquetas);
- Inferir estatisticamente a possível relação desses genes com a resistência à infecção pelo vírus.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA

O estudo de possíveis fatores relacionados à resistência à infecção pelo HIV em parceiros HIV-soronegativos de casais sorodiscordantes foi iniciado em 2011, quando as amostras biológicas foram coletadas e processadas. No entanto, visando à compreensão dos métodos utilizados, todos os procedimentos realizados serão descritos a seguir.

5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (processo 1063/2011). Os voluntários que demonstraram interesse em participar foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e metodologia utilizada na coleta das amostras e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5.2 Local, população de estudo e critérios de inclusão

Foram recrutados casais heterossexuais e homossexuais com idade superior a 18 anos. Os casais estavam em união estável por no mínimo 12 meses, eram sorodiscordantes para a infecção pelo HIV e já haviam apresentado algum episódio de exposição ao vírus através de relação sexual desprotegida. Esses indivíduos são provenientes do Centro de Testagem e Aconselhamento (São José, SC), do Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes (São José, SC) e do Hospital Nereu Ramos (Florianópolis, SC). Além dos casais sorodiscordantes, como grupo controle foram recrutados indivíduos HIV negativos doadores regulares de plaquetas do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC (Florianópolis, SC), que também mantinham relacionamento estável por no mínimo 12 meses. A soronegatividade para HIV de um dos membros do casal foi comprovada através do Teste do Ácido Nucléico (NAT HIV Biomanguinhos - Fiocruz) e por um teste de quimioluminescência (Architect® HIV Ag/Ab Combo - Abbott), ambos realizados no HEMOSC. Teste sorológico positivo para hepatite C (HCV) e manifestações clínicas de infecções por Epstein-Barr vírus (EBV), citomegalovírus (CMV) e herpes vírus (HSV-1) foram considerados critérios de exclusão para qualquer um dos grupos descritos.

Seguindo os critérios de inclusão, os indivíduos foram divididos em três grupos distintos: (i) indivíduos soronegativos que já tiveram

contato com o HIV, membros dos casais sorodiscordantes (n=9); (ii) indivíduos HIV-soropositivos, membros dos casais sorodiscordantes (n=9); (iii) indivíduos HIV-soronegativos doadores regulares de plaquetas (n=12). No momento da coleta, foi realizada uma entrevista que abordou questões sobre o comportamento sexual dos indivíduos e, neste momento, os voluntários receberam orientações a respeito do uso de preservativo durante as relações sexuais. Os prontuários dos pacientes foram consultados para obter informações como carga viral, contagem de linfócitos T CD4+ e esquema terapêutico utilizado no tratamento.

5.3 Coleta e processamento das amostras biológicas

Profissionais de saúde habilitados realizaram a coleta das amostras de sangue por punção venosa no período de junho a dezembro de 2012. Foram coletados 30 mL de sangue de cada indivíduo em tubos Vacutainer® (BD Biosciences) contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante, bem como 4 mL em um tubo sem anticoagulante para obtenção de soro que foi utilizado na realização do teste de quimioluminescência e do teste NAT pelo HEMOSC. A partir dessas amostras foi utilizada uma alíquota de 4 mL de sangue total para extração de DNA das células mononucleares (PBMCs) e o restante foi utilizado para a obtenção do plasma do qual se quantificou quimiocinas e defensinas e também para a obtenção das populações celulares de linfócitos T CD4+ e monócitos.

A separação das populações celulares foi realizada utilizando-se os kits *RosetteSeP Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail* e *RosetteSeP Human Monocyte Cell Enrichment Cocktail* (StemCell Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante. Após separação, as frações purificadas de linfócitos T CD4+ e monócitos foram contadas em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade celular analisada através de coloração com *Trypan blue* 0,02% (Invitrogen®, Life Technologies).

Por fim, as amostras contendo linfócitos T CD4+ e monócitos purificados foram separadas da seguinte maneira: cerca de um quinto foi armazenado em solução para preservação do RNA (*RNAlater – Ambion®*, Life Technologies) e o restante foi submetido ao tratamento com o tampão de lise proveniente do kit *PARIS – Protein and RNA Isolation System* (Ambion®, Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante.

5.4 Análise dos subtipos e predição do tropismo viral

Amostras de DNA extraído de PBMCs dos voluntários soropositivos foram encaminhadas ao Centro de Desenvolvimento Científico e Técnico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEEPS) em Porto Alegre - RS e a análise dos subtipos virais foi realizada seguindo protocolo descrito por Gräf e colaboradores em 2011. A extração do DNA genômico foi realizada com o *kit QIAmpl Blood* (Qiagen Inc.), seguindo as instruções do fabricante. O DNA proviral foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com dois momentos de amplificação (*nested PCR*). Foram utilizados três pares de iniciadores específicos, sendo um para o gene *env* (região específica de 611 pares de bases (pb) da proteína gp120) e dois para o gene *pol* (uma região de 1270 pb correspondente ao gene completo da PR e parte da RT, e outra região de 866 pb correspondente à INT). Após o *nested PCR*, o produto da reação de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% que foi corado com uma solução de brometo de etídio 0,01% e revelado por exposição à luz UV em um transiluminador MacroVue UV20 (Hofer), sendo os resultados documentados de forma digital. O produto da PCR foi purificado utilizando-se o *kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), conforme instruções do fabricante.

Foi realizado o sequenciamento das regiões genômicas do HIV-1 amplificadas por *nested PCR* no equipamento *MegaBace 1000 DNA Analysis System* (GE/Amershan Biosciences), utilizando-se o *kit DYEnamic ET Dye Terminator* (GE/Amershan Biosciences), seguido da purificação dos produtos gerados na reação de sequenciamento com isopropanol 70%. As amostras foram eletroinjetadas a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídas a 9 KV por 1-2 horas. Após a eletroforese, as sequências geradas foram associadas em *contigs* utilizando-se o programa *SeqMan*, pertencente ao pacote de programas *LaserGene* (DNASTAR).

A subtipagem inicial foi realizada através da submissão das sequências a três ferramentas disponíveis na internet: a) *REGA HIV-1 subtyping tool* (disponível em: <http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html>); b) *Recombinant Identification Program* (*RIP*) (disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>); c) SCUEAL (disponível em: http://www.datamonkey.org/dataupload_scueal.php). Em caso de discordância dos resultados, uma análise filogenética de máxima verossimilhança foi utilizada como padrão ouro. Para tanto, as

sequências geradas neste trabalho foram alinhadas através da ferramenta *Muscle*, implementada no programa MEGA 5 (TAMURA et. al., 2011) - com sequências referências para os subtipos B, C, F1, D e A1, disponíveis no banco de dados de *Los Alamos HIV database*. A árvore filogenética foi construída através do algoritmo de máxima verossimilhança utilizando-se o programa *PhyML* e as sequências foram classificadas conforme o agrupamento específico para cada subtipo. Por fim, as sequências identificadas como recombinantes foram analisadas em maiores detalhes quanto ao padrão de recombinação através da análise de *bootscanning*, implementada no programa SIMPLOT 3.5.1.

A predição *in silico* do tropismo viral foi feita com base nas sequências do envelope viral (região C2-V3 da gp120) geradas por meio da metodologia anterior. As sequências nucleotídicas foram traduzidas para sequência de aminoácidos e submetidas à ferramenta Geno2pheno (disponível em: <http://www.geno2pheno.org>). As sequências subtipo C também foram submetidas à análise pela ferramenta CoRSeqV3-C (disponível em: <http://tools.burnet.edu.au/coreceptor/index.php>), especificamente desenvolvida para a predição de tropismo do HIV-1 subtipo C (GRÄF et al., 2011).

5.5 Genotipagem do correceptor CCR5

Para a genotipagem do correceptor CCR5 e pesquisa da mutação CCR5Δ32, as amostras de DNA extraídos de PBMCs foram enviadas ao Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina – UEL, sob a responsabilidade Prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche. Nesse procedimento, um fragmento do gene de interesse é amplificado pela técnica de PCR convencional, utilizando a metodologia descrita por Reiche e colaboradores em 2008. Para isso, foi utilizada uma solução de 25 µl contendo 100 ng de DNA genômico, 2,5 µM de cada iniciador específico, 1,25 µM de um mix de dNTPs (Invitrogen™ Life Technologies), 50 µM de MgCl₂, 2,5 µl de tampão 10x (500 mM KCl e 200 mM Tris-HCl, pH 8.4), 2 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e 12,25 µl água. Foram realizados 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto para desnaturação, 58° por 1 minuto para a hibridização dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para a extensão da fita). Ao final dos ciclos de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio a 1%. Para cada reação foi utilizado um controle negativo (sem

adição de DNA) e um controle positivo (CCR5 do tipo selvagem) a fim de evitar potenciais erros na genotipagem. As imagens foram realizadas e salvas no Programa Digit-Doc-It versão 1.1.25.

5.6 Avaliação dos níveis de transcritos dos genes APOBEC3G, BST-2, CFLAR, SAMHD1, TRIM5 α e LEDGF/p75

5.6.1 Extração e purificação do RNA total

Para a extração do RNA das amostras armazenadas em RNAlater foi utilizado o *PureLink® RNA Mini Kit* (Ambion®, Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante. Previamente à utilização do *kit* e com o objetivo de remover a solução de RNAlater foram acrescentados aproximadamente 600 μ l de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) às amostras de linfócitos T CD4+ e monócitos purificadas. Essas amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g e o sobrenadante foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta. A operação foi repetida e iniciou-se o processo de lise celular, no qual as amostras foram homogeneizadas em vórtex após a adição de 300 μ l do tampão de lise disponibilizado pelo *kit* para cada 5 x 10⁵ células e acrescido de 1% de 2-mercaptoetanol. A fim de reduzir a viscosidade do lisado obtido, o material foi transferido para um *homogenizer* (Ambion®, Life Technologies), inserido a um tubo de coleta e centrifugado por 2 minutos a 12.000 x g. Adicionou-se igual volume de etanol 70% ao eluato que passou pelo *homogenizer*, sendo esse material aplicado a uma coluna de purificação e centrifugado a 12.000 x g por 15 segundos. A coluna foi lavada com 700 μ L de *wash buffer 1* através de centrifugação por 15 segundos a 12.000 x g e, posteriormente, foram realizadas duas etapas de lavagem através da adição de 500 μ L da *wash buffer II* acrescido de etanol 96%, sendo a mesma centrifugada por 15 segundos a 12.000 x g. A eluição do RNA total foi realizada através da adição de 30 μ L de água RNase-*free* (Invitrogen™, Life Technologies) à coluna, seguida de centrifugação por 2 minutos a 12.000 x g à temperatura ambiente, sendo que RNA purificado foi mantido em gelo.

5.6.2 Tratamento das amostras de RNA com DNase

A remoção de possíveis contaminações das amostras de RNA com DNA genômico foi realizada através do tratamento com a enzima DNase utilizando-se o *kit DNase 1 Amplification Grade* (Invitrogen™, Life Technologies) conforme protocolo do fabricante. Imediatamente

após a extração do RNA, adicionou-se 4µL de 10x *DNase I reaction buffer*, 1 µL de *DNase I Amp Grade 1 U/µL* e 5 µL de água DNase/RNase- free (Invitrogen™, Life Technologies) às amostras de RNA. As amostras foram mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente, quando então se acrescentou 4 µL de solução de EDTA 25 nM a fim de inativar a enzima DNase. As amostras foram então incubadas por 10 minutos a 65°C e então armazenadas a -20°C.

5.6.3 Quantificação do RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A concentração do RNA total foi obtida através da leitura da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (Nanovue™ Plus, GE Healthcare) utilizando água DNase/RNase free (Invitrogen™, Life Technologies) para zerar o aparelho. A pureza das amostras foi avaliada através da análise da razão 260/280. Além das amostras, foi realizada a leitura da absorbância de um pool contendo 1 µL de cada amostra envolvida no estudo, o qual foi utilizado também na síntese de cDNA. As amostras que apresentaram concentrações muito baixas de RNA foram submetidas à precipitação em isopropanol na presença de acetato de sódio 3,0 M e o RNA foi novamente quantificado.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *SuperScript III First-Strand* (Invitrogen®, Life Technologies). Todas as amostras foram processadas no mesmo momento e as reações foram realizadas a partir da concentração fixa de 160 ng de RNA total. Para isso, foi adicionada a determinado volume de RNA, 1µL de *random hexamers e oligodT* (1:1), 1 µL de *annealing buffer* e completou-se para um volume final de 8 µL com água DNase/RNase free (Invitrogen™, Life Technologies). As amostras foram incubadas em termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf) a 65°C por 5 minutos, sendo em seguida transferidas imediatamente para o gelo e mantidas por, no mínimo, 1 minuto. Posteriormente foram adicionados 10 µL de *2X first-strand reaction mix* e 2 µL de *SuperScript III/RNaseOUT enzyme mix*, totalizando um volume final de reação de 20 µL. As amostras foram então incubadas por 10 minutos a 25°C, seguido por 50 minutos a 50°C. A reação foi encerrada através da inativação da enzima transcriptase reversa pela incubação durante 5 minutos a 85°C. Ao cDNA sintetizado foi adicionado 30 µL de água DNase/RNase free e todas as amostras foram armazenadas a -20°C.

Como controle negativo foi realizada uma reação conforme descrita acima utilizando o *pool* de RNA das amostras previamente quantificado. Nesse caso não foi adicionada a enzima transcriptase

reversa (*SuperScript III/RNaseOUT enzyme mix*), pois o objetivo desse controle é a verificação da presença de uma possível contaminação das amostras de RNA por DNA genômico.

Procedeu-se a síntese de cDNA também para as amostras utilizadas na confecção das curvas padrão. Para isso, foi utilizado um *pool* de RNA comercial (*Human Reference Total RNA*, Clontech) a partir da concentração de 180 ng de RNA total. Após a síntese, foram realizadas diluições seriadas (1:2) com água DNase/RNase *free* (InvitrogenTM, Life Technologies) totalizando sete amostras.

5.6.4 Escolha e desenho de iniciadores

Para a análise dos níveis de transcritos dos genes *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *SAMHD1*, *TRIM5a* e *LEDGF/p75* é necessária a utilização de genes de referência. Após pesquisa na literatura, foram escolhidos os cinco genes (*B2M*, *GAPDH*, *RPL13A*, *UBC* e *TBP*) que apresentaram alta estabilidade em leucócitos para serem utilizados como genes de referência (VANDESOMPELE et al, 2002).

As sequências dos iniciadores utilizados para a avaliação dos genes *APOBEC3G* (BIASIN et al, 2007), *BST-2*, *TRIM5a*, *LEDGF/p75*, *UBC* e *RPL13A* (MOUS et al, 2011), *B2M* (ASIOLI et al, 2011), *GAPDH* (POMBO-SUAREZ et al, 2008) e *TBP* (STEINAU, RAJEEVAN & UNGER, 2006) são oriundas da literatura, enquanto que para a investigação de *CFLAR* e *SAMHD1* foram desenhadas utilizando o programa Primer3 Input (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) com o auxílio do programa *CLC Sequence Viewer* 6.8.2 e avaliados através da ferramenta *PrimerBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), disponível no *GenBank*. Estes iniciadores foram desenhados de forma que fossem constituídos por exons diferentes e produzissem produtos pequenos de até 250 pb. Todos os iniciadores senso (Fw) e antissenso (Rv) estão listados no quadro 01, os quais foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies) e diluídos em água DNase/RNase *free* (InvitrogenTM, Life Technologies) a uma concentração estoque de 200 mM.

	ID GenBank		Sequências (5' → 3')	Exons	Produto (pb)
Genes de Interesse					
<i>APOBEC3G</i>	60489	Fw	CCGCTCTGGCTGTGCTACGAA	2	144
		Rv	GCTTCCTCCACTTGCTGAACCA	3	
<i>BST-2</i>	684	Fw	GAGTGTCGCAATGTCACCCAT	1	120
		Rv	GGAAGCCATTAGGGCCATCAC	1 e 2	
<i>CFLAR</i>	8837	Fw	GGACTTTTGTCCAGTGACAGC	1	219
		Rv	TTCCAGTGGGGGAGTTCGTC	2	
<i>LEDGF/p75</i>	11168	Fw	TCGACTTCAAAGGATACATGCTG	12	122
		Rv	GAGCTTGTTCATTGTGACCT	13	
<i>SAMHD1</i>	25939	Fw	TCGTCCGAATCATTGATACACC	4	150
		Rv	GTGCGTGAAGTAGACATCCTG	5	
<i>TRIM5a</i>	85363	Fw	TGCTGGCTTCCAACCTGAT	8	165
		Rv	ACAGAGAGGGGCACAATGAA	8	

Quadro 01. Características dos iniciadores utilizados

Genes de Referência					
<i>B2M</i>	567	Fw	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	2	101
		Rv	GGCATCTTCAAACCTCCATG	3	
<i>GAPDH</i>	2597	Fw	GAGCCACATCGCTCAGACAC	1	150
		Rv	CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	2 e 3	
<i>RPL13A</i>	23521	Fw	CGAGGTTGGCTGGAAGTACC	7	121
		Rv	CTTCTCGGCCTGTTTCCGTAG	8	
<i>TBP</i>	6908	Fw	GCCTCCCCACCCCCTTCTTT	8	106
		Rv	GCCACACCCTGCAACTCAACATCC	8	
<i>UBC</i>	7316	Fw	ATTTGGGTTCGCAGTTCTTG	1	123
		Rv	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	2	

Continuação Quadro 01. Características dos iniciadores utilizados

5.6.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A avaliação das quantidades dos transcritos gênicos em linfócitos T CD4+ e monócitos oriundos de casais sorodiscordantes e de indivíduos controle foi realizada através da técnica de RT-qPCR (qPCR precedida de transcrição reversa), utilizando o *kit SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®). Os ensaios foram realizados no aparelho *7900 HT Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems®), utilizando placas de 96 poços (Kasvi®). As reações foram otimizadas para serem realizadas em um volume final de 15 µL por poço; sendo assim, foram adicionados 14 µL do *mix*, seguido da adição de 1,0 µL de cDNA. O *mix* foi preparado de forma a conter 7,5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 1,2 µL do pool de iniciadores (contendo a mesma quantidade de iniciadores senso e antissenso, ambos na concentração de 0,4 pmol/µL) e 4,3 µL de água DNase/RNase free (Invitrogen™, Life Technologies) por poço. A placa foi selada com *MicroAmp® Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems®), sendo em seguida centrifugada por 2 minutos a 300 x g. As reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos para ativação da enzima, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para a desnaturação da fita de cDNA e 1 minuto a 60°C para hibridização dos iniciadores e extensão. A fluorescência foi capturada ao final de cada ciclo e, após os 40 ciclos, foi realizada a curva de dissociação através captação da fluorescência a cada 5 segundos durante o aumento da temperatura em 1°C até ser atingida a temperatura de 95°C. A avaliação da curva de dissociação foi utilizada para verificar a qualidade da amplificação e analisar o perfil dos produtos formados. Ao final, os dados foram visualizados e analisados através do *software ABI 7900HT Sequence Detection System* (SDS versão 2.4, Applied Biosystems).

5.6.5.1 Análise da especificidade dos iniciadores e das eficiências das reações de qPCR

Para a análise da especificidade dos iniciadores e das eficiências das reações foram realizadas, tanto para os genes de referência como para os genes de interesse, curvas padrão utilizando-se as sete amostras preparadas a partir do *pool* de RNA comercial (*Human Reference Total RNA*, Clontech). Os resultados obtidos foram utilizados para verificar a especificidade dos iniciadores através da análise da curva de

dissociação, bem como as eficiências das reações e as concentrações de iniciadores utilizadas.

Para complementar a análise da especificidade dos iniciadores utilizados, após a reação de qPCR e análise das curvas de dissociação, os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (agarose 2,5%, Tris-base 0,08%, ácido bórico 0,55%, EDTA 0,1 M, pH 8,0) e corados com brometo de etídio 0,1%. Os produtos da qPCR foram comparados a um padrão de tamanho molecular (NorGen) e a eletroforese foi realizada por 40 minutos a 80 volts e visualizada em um transiluminador de luz ultravioleta.

A verificação das eficiências das reações foi calculada utilizando-se o valor de inclinação da reta (*slope*) obtido nas reações da seguinte maneira:

$$\text{Eficiência} = 10^{-1/\text{slope}} - 1$$

Uma vez apresentando eficiências comparáveis, o método utilizado para determinar o nível de expressão dos genes de interesse em relação aos genes de referências é o método do Cq Comparativo (LIVAK; SCHIMITTGEN, 2001). Caso contrário, deve ser aplicado o método da curva padrão comparativa (LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005).

5.6.5.2 Escolha dos genes de referência

Foram realizadas reações de RT-qPCR utilizando-se os iniciadores específicos para os genes de referência. Em todas as reações estavam presentes as amostras em duplicata, um controle negativo da síntese de cDNA (sem a enzima transcriptase reversa) e um controle negativo da reação de PCR (composto apenas pelo *mix*, no qual foi acrescentado água DNase/RNase *free* (InvitrogenTM, Life Technologies) no lugar da amostra. Como as reações foram realizadas em duplicata, a média entre os valores de Cq (ciclo de quantificação) encontrados foram utilizadas para os cálculos. Estes valores foram transformados em 2^{-Cq} para as análises estatísticas a fim de verificar a variação na expressão dos genes de referência selecionados entre os pacientes HIV-soropositivos, os HESN e os indivíduos controle.

Segundo Vandersompele e colaboradores (2011), para se quantificar a expressão gênica com acurácia, devem ser utilizados múltiplos genes de referência, sendo que o mínimo ideal são os três genes de referência mais estáveis. Para selecionar os genes de referência

que apresentam maior estabilidade para linfócitos T CD4+ e monócitos, foi utilizado o RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), uma ferramenta disponível online que permite a avaliação da estabilidade de diferentes genes de referência através do *GeNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e métodos de Delta Cq, além de sugerir o melhor gene de referência entre os avaliados (VANDESOMPELE et al, 2002; ANDERSEN, JENSEN & ORNTTOFT, 2004; PFAFFL et al, 2004; SILVER et al, 2006).

5.6.5.3 Análise dos níveis de transcritos por RT-qPCR

Por fim, foram realizadas reações de RT-qPCR para a análise da expressão gênica relativa de *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *LEDGF/p75*, *SAMHD1* e *TRIM5a*. As reações foram procedidas como descritas anteriormente, utilizando-se as amostras em duplicata, um controle negativo da síntese de cDNA e um controle negativo da reação de PCR.

O resultado obtido foi expresso em Cq, que é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência atinja um limiar de detecção específico e apresente uma relação inversamente proporcional à quantidade inicial de RNA da amostra. Foi considerada a média dos valores de Cq obtidos para cada amostra e realizado o cálculo abaixo para a obtenção do ΔCq e para a normalização dos resultados, sendo que para o gene de referência foi considerada a média geométrica dos genes que apresentou maior estabilidade.

$$\Delta Cq = Cq \text{ Alvo} - Cq \text{ Referência}$$

Por fim, para a realização das análises estatísticas, os resultados obtidos foram transformados em $2^{-\Delta Cq}$ e comparados entre os grupos avaliados (HIV-soropositivos, HESN e HIV-soronegativos).

5.7 Análises estatísticas

A confecção do banco de dados e análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences* v. 17.0 (SPSS) e os gráficos foram construídos utilizando-se o *GraphPad Prism* v. 4.0. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados apresentavam uma distribuição paramétrica. A comparação de duas variáveis cuja distribuição foi paramétrica foi realizada através do teste t de Student, enquanto que as variáveis não-paramétricas foram comparadas através do teste de Mann-Whitney U. A comparação de três variáveis foi realizada pelos testes de análise de

variância (ANOVA) e do teste de Kruskal-Wallis. As frequências obtidas nas variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fischer. Foi adotado um nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Características da população estudada

O presente estudo foi realizado com nove casais sorodiscordantes e doze indivíduos controles, os quais foram entrevistados e responderam a um questionário. Dentre os casais sorodiscordantes, oito eram heterossexuais e um homossexual masculino. Os parceiros soropositivos apresentaram idade média de $41,7 \pm 9,2$ anos, sendo este grupo composto por quatro mulheres e cinco homens. O grupo composto de HESN apresentou uma idade média de $38,7 \pm 9,0$ anos, sendo constituído de cinco homens e quatro mulheres. O grupo controle foi composto por seis homens e seis mulheres, doadores de plaquetas por aférese, com idade média de $35,9 \pm 12,6$ anos, todos declaradamente heterossexuais. Não houve diferença significativa de gênero ou idade entre os grupos (Tabela 01).

Tabela 01. Gênero e idade dos indivíduos estudados

	Grupo controle	Parceiros	Parceiros	P
	n (%)	HIV+	HIV-	
		n (%)	n (%)	
Gênero				
Masculino	6 (50%)	5 (55,6%)	5 (55,6%)	1,0
Feminino	6 (50%)	4 (44,4%)	4 (44,4%)	
Idade \pm DP	$35,9 \pm 12,6$	$41,7 \pm 9,2$	$38,7 \pm 9,0$	0,75
(anos)				

Foi considerado significativo $p \leq 0,05$.

Para os pacientes HIV-soropositivos integrantes dos casais sorodiscordantes, foram obtidos dados como a média do tempo de diagnóstico ($9,2 \pm 4,9$ anos), a contagem de células T CD4+ por mm^3 ($519,3 \pm 287,5$ céls/ mm^3), a carga viral e a utilização de tratamento antirretroviral no momento da coleta do material. Todos os pacientes apresentavam carga viral indetectável, pois, estavam utilizando medicamentos antirretrovirais (Tabela 02). O esquema terapêutico mais frequentemente utilizado, encontrado em seis dos nove pacientes, era composto por efavirenz em associação com lamivudina e zidovudina. Também estavam sendo utilizados esquemas contendo efavirenz em associação com lamivudina e didanosina, efavirenz em associação com

lamivudina e tenofovir e um esquema terapêutico contendo darunavir, raltegravir, lamivudina, ritonavir e tenofovir.

Tabela 02. Tempo de diagnóstico da infecção, utilização de tratamento antirretroviral, carga viral e contagem de linfócitos T CD4+ dos pacientes HIV positivos

Média de tempo de diagnóstico \pm DP (anos)	9,2 \pm 4,9
Uso de antirretroviral no momento da coleta	
Sim	9 (100%)
Não	0
Carga viral indetectável	9 (100%)
Média de contagem de linfócitos T CD4+ (cels/mm ³) \pm DP	519 \pm 287,5

Todos os participantes do projeto relataram baixo percentual de utilização de preservativos durante as relações sexuais. Pode-se observar na tabela 03 que nenhum dos integrantes dos casais sorodiscordantes utilizavam preservativo durante sexo oral e que apenas um casal utiliza preservativo em todas as relações com penetração vaginal ou anal, sendo, essa última, frequente entre os casais sorodiscordantes. A prática de relações sexuais desprotegidas foi comum entre os indivíduos do grupo controle, no qual a maior parte dos indivíduos não utilizava preservativo durante sexo oral e sexo vaginal. Além disso, os três indivíduos do grupo controle que relataram praticar sexo anal não utilizavam preservativo.

Entre os indivíduos do grupo controle, cinco encontravam-se em relacionamentos com menos de dois anos de duração e sete em relacionamentos com mais de dois anos. No grupo dos casais sorodiscordantes a maioria dos indivíduos estava em relacionamentos mais longos, não havendo, entretanto, diferenças significativas após comparação entre os grupos (Tabela 03).

Tabela 03. Tempo de união e utilização de preservativo

	Grupo controle	Casais sorodiscordantes	p
	n (%)	n (%)	
Tempo de união			
Menos de 2 anos	5 (41,7%)	1 (11,1%)	0,178
2 anos ou mais	7 (58,3%)	8 (88,9%)	
Prática de sexo oral			
Uso esporádico do preservativo	2 (16,7%)	0 (0%)	0,471
Sem uso de preservativo	7 (58,4%)	8 (88,9%)	
Não pratica	3 (25,0%)	1 (11,1%)	
Prática de sexo com penetração vaginal			
Sempre com uso de preservativo	2 (16,7%)	1 (11,1%)	1,0
Sem uso de preservativo	10 (83,3%)	7 (77,8%)	
Não pratica	0 (0%)	1 (11,1%)	
Prática de sexo com penetração anal			
Sempre com uso de preservativo	0 (0%)	1 (11,1%)	1,0
Sem uso de preservativo	3 (25,0%)	6 (66,7%)	
Não pratica	9 (75,0%)	2 (22,2%)	

6.2 Análise dos subtipos e predição do tropismo viral

Com o objetivo de determinar o subtipo viral presente em cada um dos voluntários soropositivos, parte das regiões *env* e *pol* do DNA pró-viral foi amplificada e sequenciada. Para a classificação dos subtipos virais foi utilizada a sequência de pelo menos uma das duas regiões gênicas do HIV. Foi possível obter as sequências de ambos os genes de cinco dos nove pacientes soropositivos incluídos neste estudo. Dos outros quatro restantes pode-se analisar a presença de apenas uma das sequências, sendo possível a obtenção de parte do gene *pol* em dois pacientes e do gene *env* nos outros dois. As análises filogenéticas revelaram a presença do subtipo C em quatro (44,4%) dos nove indivíduos e do subtipo B em dois deles (22,2%). Também foi observada a presença da forma recombinante BC em dois pacientes (22,2%) e da CFB em apenas um (11,1%) (Figura 03). Dessa maneira,

foi evidenciada, mais uma vez, o predomínio do subtipo C do HIV na região Sul do país.

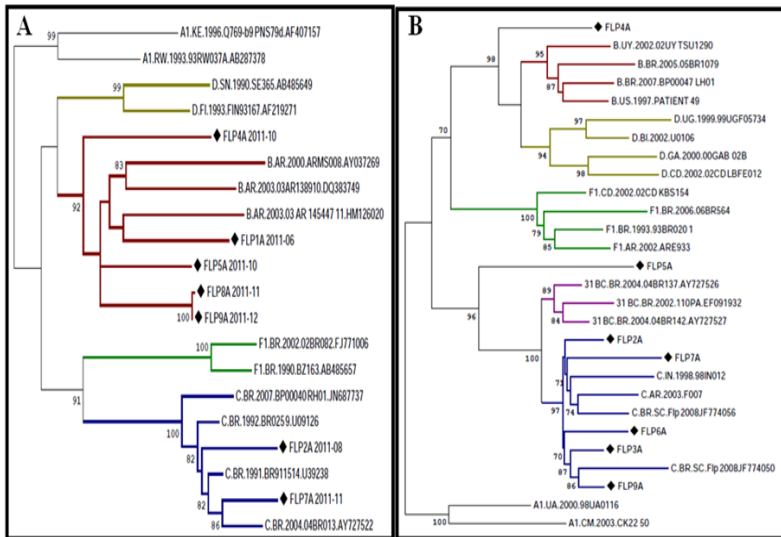


Figura 03. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de seqüências da região do Envelope (A) e da Polimerase (B) do HIV-1. Sequências isoladas dos parceiros HIV-soropositivos dos casais sorodiscordantes estão marcadas com um losângulo preto. Apenas valores de SH-aLRT acima de 70 aparecem nos nodos. Clado correspondente ao HIV-1 subtipo C está marcado em azul, do subtipo B em vermelho, do subtipo D em amarelo, do subtipo F1 em verde e da forma recombinante CRF31_BC em roxo

O quadro 02 demonstra os subtipos virais conforme categoria de exposição. O HIV subtipo C foi encontrado entre os indivíduos da categoria de exposição heterossexual e/ou usuário de drogas injetáveis. Dois indivíduos heterossexuais estavam infectados pelo subtipo B e o indivíduo pertencente à categoria de exposição homossexual (HSH – homens que fazem sexo com homens) estava infectado pelo subtipo BC. Além disso, foi observada uma infecção pela forma recombinante CFB em um indivíduo heterossexual.

Casais sorodiscordantes	Subtipo viral	Tipo de exposição
1	B	Sexual (heterossexual)
2	C	Sexual (heterossexual)
3	C	Sexual (heterossexual)
4	BC	Sexual (HSH)
5	CFB	Sexual (heterossexual)
6	C	Sexual (heterossexual)
7	C	Sexual (heterossexual)/usuário de drogas injetáveis
8	B	Sexual (heterossexual)
9	BC	Sexual (heterossexual)

Quadro 02. Subtipo viral e tipo de exposição ao HIV

A predição *in silico* do tropismo viral foi realizada com base nas sequências do envelope viral (região C2-V3 da gp120) geradas anteriormente. Como demonstrado na análise do subtipo viral, não foi possível a realização do sequenciamento da região *env* de todos os nove pacientes estudados. Dessa forma, procedeu-se a análise da região *env* do HIV de sete dos nove pacientes. Dos sete indivíduos soropositivos, seis apresentaram-se infectados por vírus com tropismo para o correceptor CCR5 e um para o CXCR4 (Quadro 03).

6.3 Genotipagem do correceptor CCR5

Para a genotipagem do correceptor CCR5, ou seja, a pesquisa pela mutação CCR5 Δ 32 foi realizada a amplificação de um fragmento do gene *CCR5* pela técnica de PCR convencional, na qual o alelo do tipo selvagem gera um fragmento de 225 pb e o alelo com a deleção gera um fragmento de 193 pb. A verificação da presença dessa mutação foi realizada em todos os indivíduos do estudo e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 04. Foram observados indivíduos heterozigotos para a mutação CCR5 Δ 32 em todos os grupos, sendo dois

(22,2%) entre os parceiros HIV-soropositivos, dois (22,2%) entre os HESN e um (9,1%) entre os indivíduos HIV-soronegativos utilizados como controle. A amostra de DNA de um dos indivíduos do grupo controle encontrava-se degradada e, portanto não foi possível realizar a genotipagem do correceptor presente nesse participante.

Tabela 04. Polimorfismo do *CCR5*

	Parceiros HIV+ n = 9	HESN n = 9	Grupo controle n = 11
Genótipo de CCR5*			
CCR5/CCR5	7	7	10
CCR5/ Δ 32	2	2	1
Δ 32/ Δ 32	0	0	0

*CCR5/CCR5, genótipo do tipo homozigoto selvagem; CCR5/ Δ 32, genótipo heterozigoto para a deleção; Δ 32/ Δ 32, genótipo homozigoto para a deleção

Para melhor visualização dos últimos resultados relatados, foi confeccionado um quadro que ilustra a presença da mutação CCR5 Δ 32 entre os membros dos casais sorodiscordantes e o tropismo viral encontrado nos indivíduos soropositivos para HIV (Quadro 03). Pode-se observar que o primeiro casal é composto de indivíduos que são heterozigotos para a mutação CCR5 Δ 32, enquanto o vírus presente no indivíduo infectado apresenta tropismo para o correceptor CXCR4.

Casais sorodiscordantes	Genotipagem de CCR5		Tropismo viral
	HIV- soropositivos	HESN	HIV- soropositivos
1	CCR5/Δ32	CCR5/Δ32	CXCR4
2	CCR5/CCR5	CCR5/Δ32	CCR5
3	CCR5/CCR5	CCR5/CCR5	Não realizado
4	CCR5/CCR5	CCR5/CCR5	CCR5
5	CCR5/CCR5	CCR5/CCR5	CCR5
6	CCR5/Δ32	CCR5/CCR5	Não realizado
7	CCR5/CCR5	CCR5/CCR5	CCR5
8	CCR5/CCR5	CCR5/CCR5	CCR5
9	CCR5/CCR5	CCR5/CCR5	CCR5

Quadro 03. Genotipagem do correceptor CCR5 nos membros dos casais sorodiscordantes e tropismo viral dos pacientes infectados pelo HIV

6.4 Avaliação das quantidades de transcritos dos genes APOBEC3G, BST-2, CFLAR, SAMHD1, TRIM5α e LEDGF/p75

6.4.1 Análise da especificidade dos iniciadores e das eficiências das reações de qPCR e escolha dos genes de referência

Para uma análise da expressão gênica por RT-qPCR que garanta confiabilidade é necessário que se avalie a especificidade dos iniciadores específicos utilizados e as eficiências das reações. Além disso, é preciso selecionar os melhores genes de referência a serem utilizados para cada tipo celular. Dessa maneira, após a extração do RNA total e tratamento com DNase, foi realizada a leitura da absorbância em um espectrofotômetro a fim de determinar a pureza e a concentração do material genético obtido. A pureza das amostras foi avaliada pela análise da razão 260/280 e considerada aceitável quando

se encontrava entre 1,7 e 2,1. Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada a partir de uma quantidade fixa de RNA (160 ng), que foi determinada baseando-se na amostra que apresentou menor concentração.

Posteriormente à escolha e desenho dos iniciadores a serem testados, realizou-se por qPCR a análise da especificidade dos iniciadores e das eficiências das reações. Para isso, foram realizadas curvas-padrão para cada par de iniciadores, utilizando-se sete concentrações diferentes da amostra de RNA comercial (*Human Reference Total RNA*, Clontech) diluídas de forma seriada (1:2), partindo-se da concentração inicial de 180 ng de RNA para a síntese da amostra mais concentrada de cDNA. A análise da especificidade dos iniciadores utilizados é de suma importância para garantir resultados fidedignos de amplificação unicamente do produto desejado e pode ser avaliada através da observação da curva de dissociação gerada após a reação de qPCR. A curva deve apresentar um pico único e específico que demonstra a temperatura de *melting* (T_M), ou seja, a temperatura na qual 50% das moléculas de DNA ali presentes estão desnaturadas. Conforme pode ser observado na Figura 04, as curvas de dissociação das reações não indicaram a presença de dímeros dos iniciadores e demonstrou-se a presença de um produto específico para todos os genes de interesse, representado por um pico único no gráfico. Esse resultado é importante, pois, garante a amplificação apenas do produto de interesse, uma vez que cada reação apresenta um pico único na curva de dissociação com temperaturas de dissociação específicas, as quais estão descritas na Tabela 05.

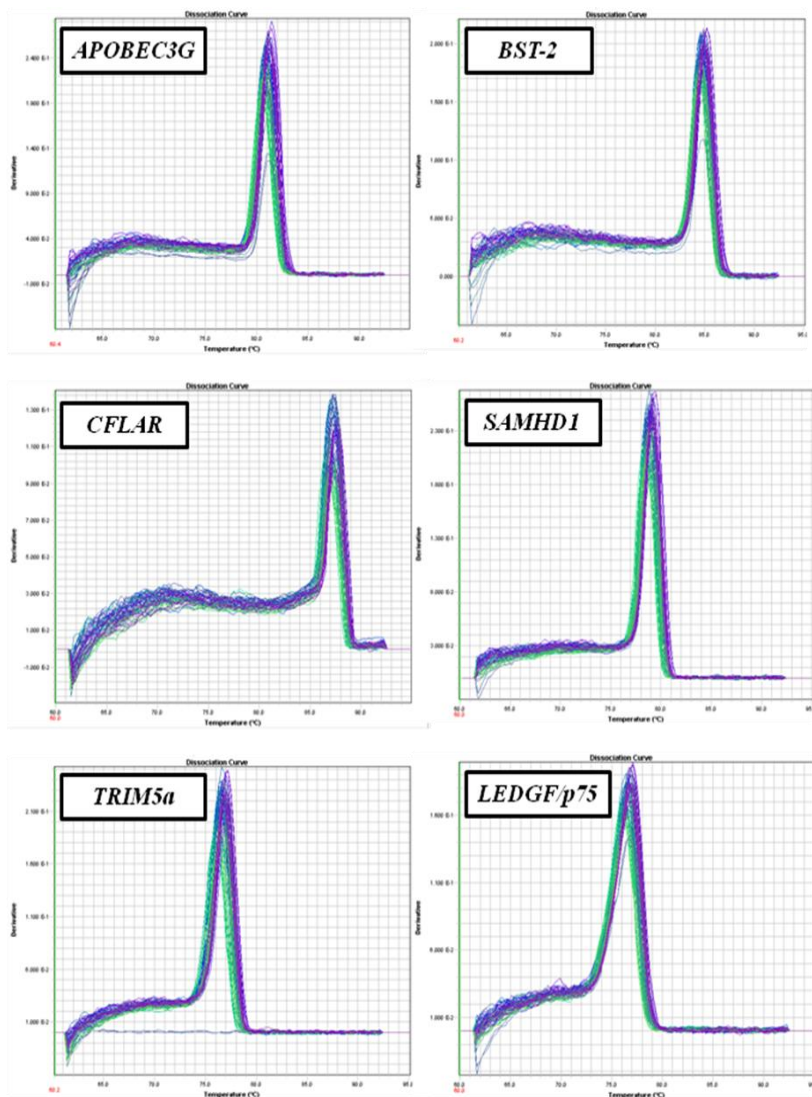


Figura 04. Perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse

Para confirmar a amplificação de um único produto e demonstrar o tamanho dos produtos gerados, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador, sendo possível a comparação das bandas dos produtos

amplificados com um padrão de tamanho molecular. Após análise do gel foi observada a presença de produtos que apresentavam o tamanho esperado para todos os genes de interesse (Figura 05).

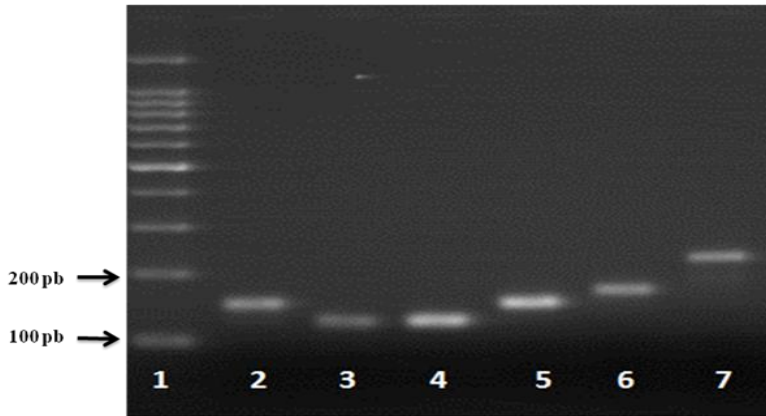


Figura 05. Gel de agarose 2,5% demonstrando os tamanhos dos produtos gerados a partir da amplificação por RT- qPCR dos genes de interesse

1) Padrão de Tamanho Molecular - 100 pb, 2) *SAMHDI* - 150 pb, 3) *LEDGF/p75* - 122 pb, 4) *BST-2* - 120 pb, 5) *APOBEC3G* - 144 pb, 6) *TRIM5a* - 165 pb, 7) *CFLAR* - 219 pb

Após a análise de especificidade dos iniciadores utilizados para os genes de referência (*B2M*, *GAPDH*, *RPL13A*, *UBC* e *TBP*), observou-se a presença de picos únicos (Figura 06) e temperaturas de dissociação específicas (Tabela 05) para os genes *B2M*, *RPL13A*, *UBC* e *TBP*. Conforme demonstrado na figura 06, apenas nas reações utilizando os iniciadores para amplificar uma sequência de *GAPDH* foi observada a presença de um pico inespecífico.

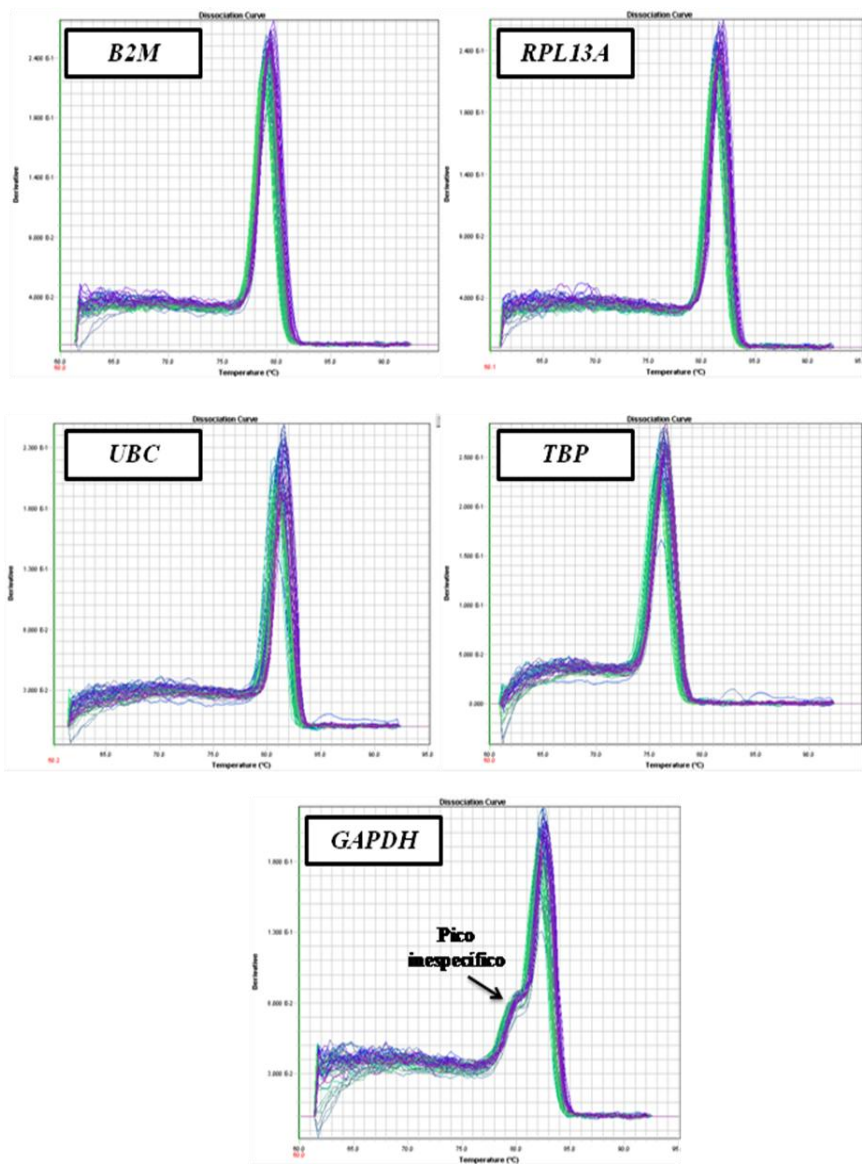


Figura 06. Perfis das curvas de dissociação dos possíveis genes de referência

Assim como para os genes de interesse, também foi realizada eletroforese em gel de agarose para determinar o tamanho molecular aparente dos produtos amplificados para genes de referência por meio da comparação com um padrão de tamanho molecular. Dessa maneira evidenciou-se a presença de produtos com os tamanhos esperados para todos os genes (Figura 07).

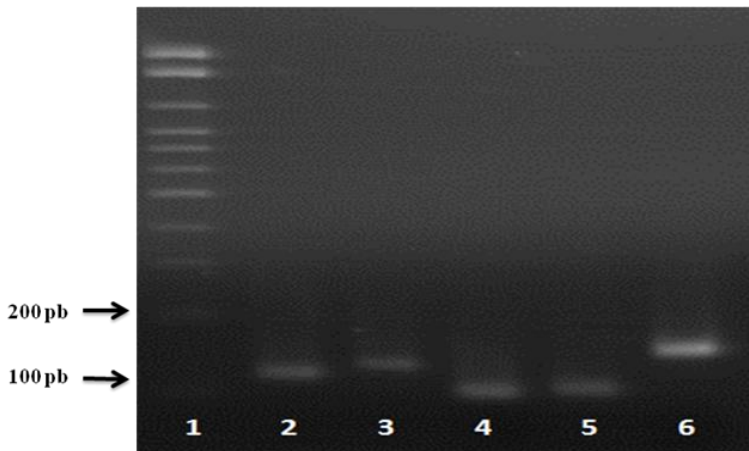


Figura 07. Gel de agarose 2,5% demonstrando os tamanhos dos produtos gerados a partir da amplificação por RT-qPCR dos genes de referência

1) Padrão de Tamanho Molecular - 100 pb, 2) *RPL13A* - 121 pb, 3) *UBC* - 123 pb, 4) *B2M* - 101 pb, 5) *TBP* - 106 pb, 6) *GAPDH* - 150 pb.

O primeiro critério utilizado na escolha dos genes de referência foi a especificidade dos iniciadores utilizados. Como demonstrado na Figura 06, todas as curvas de dissociação geradas para os genes de referência apresentaram um pico único, com exceção da curva do gene *GAPDH*. A observação de dois picos no gráfico de dissociação indica a presença de um produto inespecífico, caracterizado por uma T_M diferente. No entanto, a visualização das bandas contendo os produtos formados em gel de agarose não confirmou a presença de dois produtos. Isso pode ser explicado pelo fato de que a visualização das bandas em gel de agarose é uma técnica de menor sensibilidade quando comparada à observação da curva de dissociação da reação de RT-qPCR, uma vez que se trata de produtos com tamanhos semelhantes e indistinguíveis nas condições utilizadas. Dessa forma, devido à presença de dois picos na

curva de dissociação da reação utilizando os iniciadores para *GAPDH*, optou-se pela não utilização desse gene como gene de referência.

A verificação das eficiências das reações foi realizada por meio da utilização do valor de *slope* obtido após realização da curva padrão utilizando os pares de iniciadores específicos para cada gene. Na Tabela 05, estão indicados os valores de *slope* encontrados, assim como os índices de correlação (R^2), as eficiências calculadas de cada reação e as temperaturas de dissociação geradas para cada produto. Os valores de eficiência das reações variaram de 96,9% (*APOBEC3G* e *UBC*) a 99,6% (*B2M*), sendo os valores de correlação R^2 acima de 0,99. Dessa maneira, foi possível a escolha do método do Cq Comparativo para as análises dos resultados a serem obtidos.

Tabela 05. Valores dos coeficientes de correlação (R^2), inclinação da reta, eficiência da reação e temperatura de dissociação

	R^2	Inclinação da Reta	Eficiência	Temperatura de Dissociação
Genes de Interesse				
<i>APOBEC3G</i>	0,9965507	-3,397643	96,9%	78,7 °C
<i>BST2</i>	0,9978575	-3,3549914	98,6%	84,9 °C
<i>CFLAR</i>	0,9894317	-3,3473868	98,9%	87,2 °C
<i>LEDGF/p75</i>	0,9949211	-3,3458936	99,0%	76,4 °C
<i>SAMHD1</i>	0,991916	-3,397643	96,9%	78,7 °C
<i>TRIM5a</i>	0,99128973	-3,373976	97,9%	76,6 °C
Genes de Referência				
<i>B2M</i>	0,99945694	-3,332438	99,6%	79,2 °C
<i>RPL13A</i>	0,9962444	-3,3533351	98,7%	81,3 °C
<i>TBP</i>	0,9962619	-3,339699	99,3%	76,4 °C
<i>UBC</i>	0,9990411	-3,399163	96,9%	81,4 °C

A análise da curva de dissociação também foi determinante na escolha da concentração de iniciadores a serem utilizados nas reações de RT-qPCR, especialmente após a observação minuciosa dos controles negativos das reações, bem como a verificação da presença de dímeros de iniciadores. Utilizando-se a concentração de 0,4 μ M não foi visualizada a presença de nenhum pico de amplificação nos poços dos

controles negativos para todos os genes estudados. Além disso, através da análise dessas curvas, foi possível determinar a linearidade de cada reação e, conseqüentemente, os valores obtidos fora da linearidade foram excluídos dos testes estatísticos.

Para que um gene possa ser considerado como gene de referência, além da especificidade, é necessário que sua expressão não seja influenciada pelas diferentes condições estudadas, ou seja, sua expressão não deve variar entre os grupos envolvidos no estudo. Todas as amostras disponíveis (pacientes soropositivos para HIV, HESN e indivíduos controle) foram submetidas a reações de RT-qPCR utilizando-se iniciadores para os genes *B2M*, *RPL13A*, *TBP* e *UBC*. Como as reações foram feitas em duplicata, a média dos valores de Cq encontrada foi transformada em 2^{-Cq} para a realização das análises estatísticas e, tanto em linfócitos T CD4+ como em monócitos, não houve nenhuma diferença na expressão dos genes analisados. Dessa forma, considerando a estabilidade de expressão entre os três grupos avaliados, os quatro genes testados podem ser considerados como genes de referência.

Além disso, a ferramenta *RefFinder* foi utilizada com o objetivo de selecionar os genes de referência que apresentam maior estabilidade em linfócitos T CD4+ e monócitos. Nesse momento, foram testados os valores médios de Cq obtidos nas reações, assim como as médias geométricas obtidas entre os genes avaliados. Ao utilizar a média geométrica, é feita uma avaliação dos genes não apenas de forma individual, mas também considerando as médias que serão utilizadas no momento da normalização. De acordo com o resultado gerado pelo programa, considerou-se como genes de referência em linfócitos T CD4+ a média geométrica de *B2M*, *RPL13A*, *TBP* e *UBC* (Figura 08) e em monócitos a média geométrica de *B2M*, *TBP* e *UBC* (Figura 09).

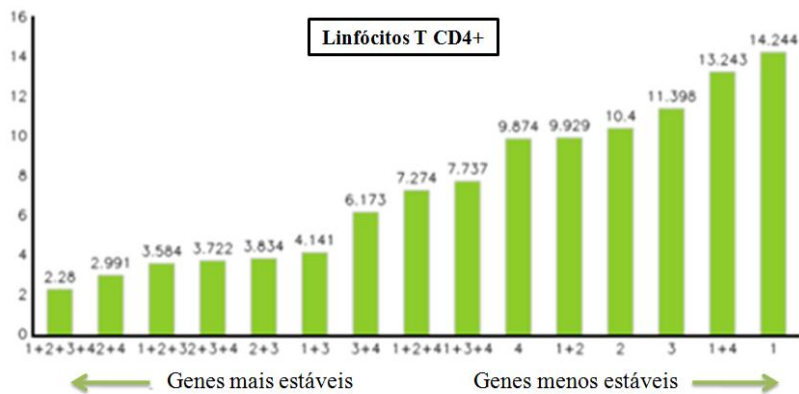


Figura 08. Gráfico gerado pela ferramenta disponível online *RefFinder* indicando os genes mais e menos estáveis em linfócitos T CD4+
1) *B2M*, 2) *RPL13A*, 3) *TBP* e 4) *UBC*

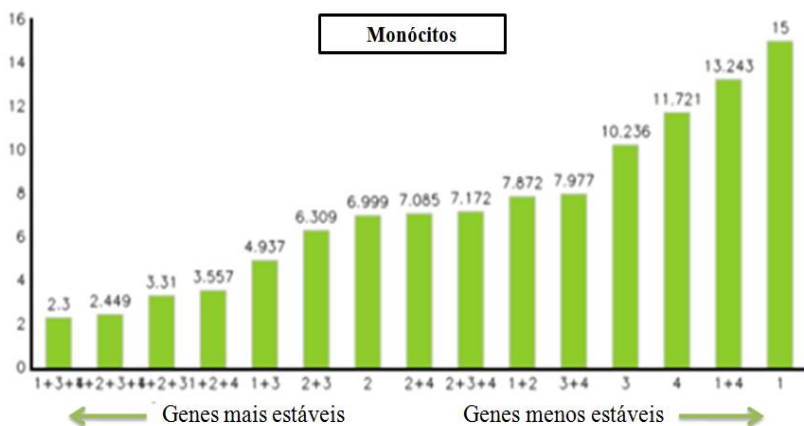


Figura 09. Gráfico gerado pela ferramenta disponível online *RefFinder* indicando os genes mais e menos estáveis para monócitos
1) *B2M*, 2) *RPL13A*, 3) *TBP* e 4) *UBC*

6.4.2 Análise dos níveis de transcritos por RT-qPCR em linfócitos T CD4+ e monócitos

Com o objetivo de avaliar a expressão gênica relativa de *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *LEDGF/p75*, *SAMHD1* e *TRIM5a* foram realizadas reações de qPCR como descrito anteriormente utilizando o cDNA de linfócitos T CD4+ e monócitos provenientes de nove casais sorodiscordantes (HIV-soropositivos e HESN) e doze indivíduos saudáveis utilizados como controle. A média dos valores de Cq gerados foi transformada em $2^{-\Delta Cq}$ para realização das análises estatísticas, considerando-se a média geométrica dos genes *B2M*, *RPL13A*, *TBP* e *UBC* como normalizador das amostras de linfócitos T CD4+ e a média geométrica dos genes *B2M*, *TBP* e *UBC* como normalizador das amostras de monócitos. Os valores de expressão gênica relativa dos genes analisados não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos linfócitos T CD4+ dos pacientes HIV-soropositivos, HESN e indivíduos controle (Figura 10).

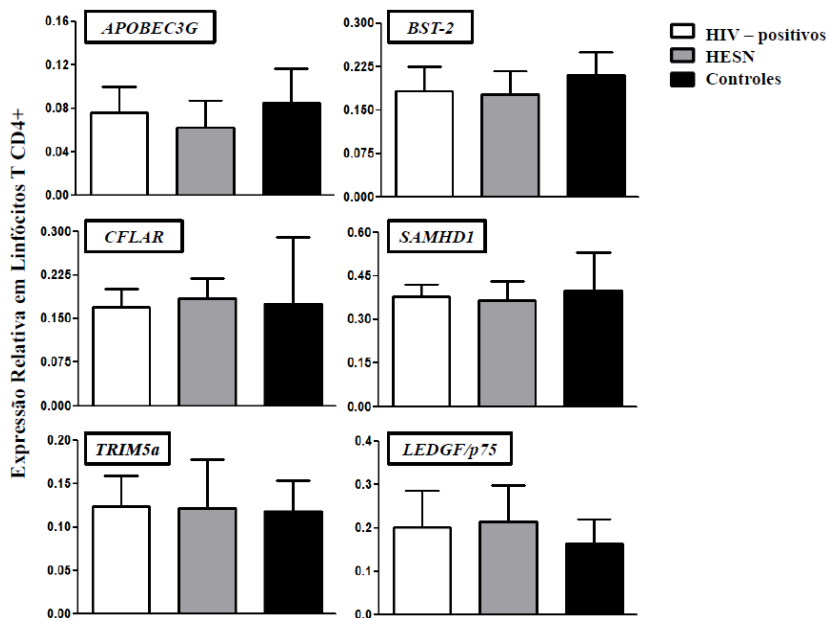


Figura 10. Gráficos demonstrando média e desvio padrão da expressão relativa dos genes *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *SAMHD1*, *TRIM5a* e *LEDGF/p75* em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV-soropositivos, HESN e indivíduos controle utilizando os genes *B2M*, *RPL13A*, *TBP* e *UBC* como normalizadores

Os valores de expressão gênica relativa dos genes *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *LEDGF/p75*, *SAMHD1* e *TRIM5a* em monócitos, normalizados a partir da média geométrica de *B2M*, *TBP* e *UBC*, não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os pacientes HIV-soropositivos, HIV-soronegativos expostos e indivíduos controle (Figura 11).

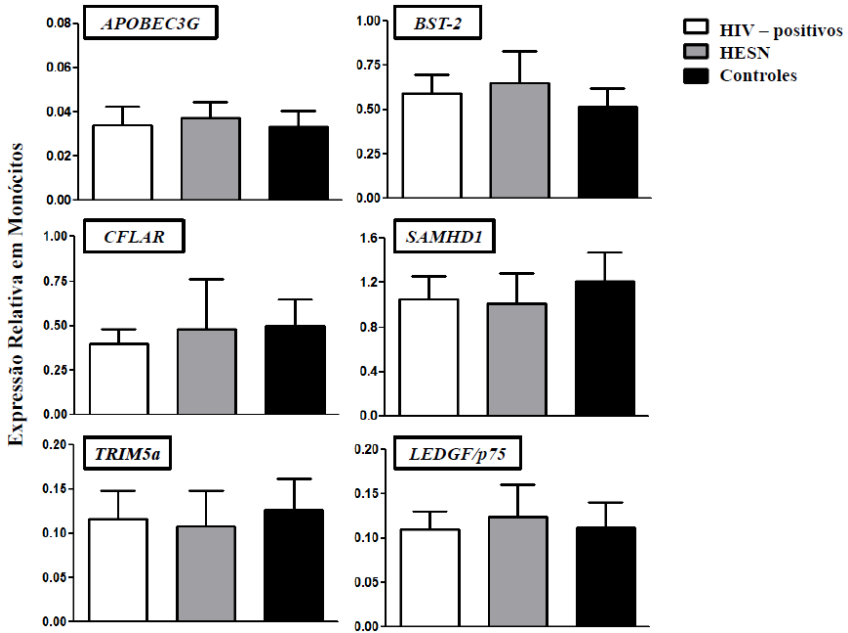


Figura 11. Gráficos demonstrando média e desvio padrão da expressão relativa dos genes *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *SAMHD1*, *TRIM5a* e *LEDGF/p75* em monócitos de pacientes HIV-soropositivos, HESN e indivíduos controle utilizando os genes *B2M*, *TBP* e *UBC* como normalizadores

7 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi identificar possíveis fatores naturais de resistência à infecção pelo HIV. Para tanto, foram recrutados nove casais sorodiscordantes para HIV e doze indivíduos saudáveis, doadores de plaquetas por aférese. Todos os integrantes se encontravam em relacionamentos estáveis por mais de um ano e eram residentes na região metropolitana de Florianópolis, Santa Catarina. A idade dos participantes e a proporção entre homens e mulheres foi semelhante nos três grupos avaliados. Sabe-se que o risco de transmissão do HIV é bastante variável e depende de múltiplos fatores que incluem propriedades biológicas do vírus, carga viral e a suscetibilidade do hospedeiro. Dessa forma, é muito importante a elucidação dos mecanismos envolvidos na resistência ao vírus.

Estudos envolvendo casais sorodiscordantes apresentam grande valor, pois, além de avaliar os possíveis fatores envolvidos na resistência à infecção, servem para o aperfeiçoamento de medidas de saúde pública. Os resultados desses estudos podem levar a uma alteração nos protocolos de tratamento utilizados. Artigos de revisão publicados reúnem estudos com casais sorodiscordantes de vários países, inclusive do Brasil, que avaliam a eficiência da utilização de TARV na transmissão viral (ANGLEMYER et al., 2009; LOUTFY et al, 2013). Outros estudos focam em fatores do hospedeiro, como a presença de polimorfismos em genes de algumas citocinas em casais sorodiscordantes de Mumbai (CHAUDHARI et al, 2013), na análise das respostas de células T em casais de Uganda (PALA et al, 2013) ou na presença de peptídeos catiônicos na secreção cervicovaginal de mulheres do Quênia que vivem em relações sorodiscordantes (LEVINSON et al, 2012).

No presente estudo foi feita uma análise de fatores inerentes ao vírus, como o subtipo e o tropismo viral, bem como de fatores genéticos e da imunidade inata do hospedeiro. Também havia sido realizada uma análise dos hábitos e comportamentos dos indivíduos envolvidos no estudo, permitindo assim uma análise global de vários mecanismos que podem interferir no processo de transmissão do HIV (ROSA, 2013).

Considerando a epidemiologia molecular do HIV, sabe-se que o subtipo mais prevalente no Brasil é o subtipo B, enquanto na região sul ocorre maior prevalência do subtipo C, sendo este também o de maior prevalência na África e em algumas regiões da Ásia (GRÄF & PINTO, 2013). Neste estudo, quatro (44,4%) dos nove indivíduos apresentavam-se infectados pelo subtipo C e dois deles (22,2%) pelo subtipo B.

Também foi observada a presença da forma recombinante BC em dois pacientes (22,2%) e da CFB em apenas um (11,1%). GRÄF e colaboradores (2011) demonstraram uma associação altamente significativa entre as categorias de exposição heterossexual e HSH com o subtipo C e o subtipo B, respectivamente. Neste trabalho, também se observou um predomínio do subtipo C entre os indivíduos da categoria de exposição heterossexual e/ou usuário de drogas injetáveis. Além disso, foram encontrados dois indivíduos heterossexuais infectados pelo subtipo B, o qual é mais frequente em homossexuais e ainda, o indivíduo da categoria de exposição homossexual apresentou infecção pelo subtipo BC. Foi observada também uma infecção pela forma recombinante CFB. No entanto, devido ao pequeno número de indivíduos analisados, não foi possível realizar uma análise de prevalência ou uma relação de categoria de exposição com o subtipo encontrado.

Os receptores de quimiocina do tipo CCR5 são estudados há muitos anos e seus polimorfismos genéticos tem sido associados a várias doenças, como lúpus (ZHOU et al., 2014), hepatite C (YILMAZ et al., 2014) e diabetes (MUNTINGHE et al., 2009). Mutações no gene que codifica CCR5, em especial a CCR5 Δ 32, estão relacionadas à resistência à infecção pelo HIV e à progressão da doença (DEAN et al., 1996; ESTRADA-AGUIRRE et al., 2013). A frequência dessa mutação é muito baixa na população em geral, podendo ser encontrada em aproximadamente 1% de caucasianos (MARTINSON et al., 1995). Indivíduos homozigotos para essa mutação apresentam resistência à infecção pelo vírus, enquanto que os heterozigotos apresentam menores chances de progredir para aids (HUANG et al., 1996; MARTIN et al., 1998). Foi demonstrado que a frequência de indivíduos heterozigotos para a mutação CCR5 Δ 32 é maior entre os progressores lentos em comparação com os progressores típicos (EUGEN-OLSEN et al., 1997). No presente trabalho, não foi encontrado nenhum indivíduo homozigoto para a mutação CCR5 Δ 32 e, de acordo com o conhecimento atual, acredita-se que apenas a presença de um alelo mutado não pode explicar a resistência natural ao HIV (TABORDA et al., 2012). No entanto, foram encontrados dois indivíduos heterozigotos para essa mutação entre os nove HIV-soropositivos, dois entre os nove HESN e um entre os indivíduos controle. Esses resultados indicam uma frequência de mais de 20% de heterozigose para CCR5 Δ 32 entre os casais sorodiscordantes e de 9% para os controles. Em comparação com outros estudos brasileiros, um realizado com indivíduos provenientes de Alegrete, Rio Grande do Sul (PASSOS & PICANCO, 1998) e o outro

com moradores de Londrina, Paraná (REICHE et al, 2008), observou-se uma alta frequência da mutação CCR5 Δ 32 em sua forma heterozigota. O primeiro observou uma frequência de 6,8% entre os indivíduos brancos, 3,8% entre os negros e 6,4% entre os pardos da mutação CCR5 Δ 32 e considerou que esse alelo mutado é proveniente do continente europeu, atribuindo esse resultado à grande miscigenação encontrada no país. O segundo estudo demonstrou uma frequência de aproximadamente 7% dos indivíduos apresentado a mutação de forma heterozigota e menos de 0,05% de forma homozigota.

Considerando a interação do vírus com o hospedeiro, a análise da associação entre tropismo viral e correceptores celulares tem se tornado cada vez mais importante. O único caso de cura de aids descrito até hoje envolve esse mecanismo e atualmente existem medicamentos que agem como antagonistas do correceptor CCR5. O paciente de Berlin é conhecido como o primeiro caso de cura da infecção pelo HIV, pois, se encontra até hoje com cargas virais indetectáveis mesmo após descontinuar o uso da terapia antirretroviral. Essa cura esterilizante foi o resultado do transplante alogênico necessário para o tratamento de uma leucemia mieloide aguda, de células progenitoras CD34+ provenientes de um doador selecionado homozigoto para a mutação CCR5 Δ 32 feito em 2007 (HÜTTER et al., 2009). Além disso, o primeiro fármaco antagonista de CCR5, Maraviroc, surgiu no mercado farmacêutico para suprir a necessidade de um fármaco que impedisse a entrada do HIV nas células-alvo. No entanto, antes de iniciar a terapia com esse medicamento, é necessário que se realize uma análise do tropismo viral para a certificação de que se trata de um vírus R5 (POVEDA et al., 2012; PÉREZ-OLMEDA & ALCAMI, 2013). Estudos indicam que o vírus R5 é comumente observado no sangue de indivíduos infectados durante as fases iniciais da infecção e, de acordo com a progressão da doença, ocorre o surgimento do vírus X4 em cerca de metade dessas pessoas (KWA et al., 2003; MOORE et al., 2004). O predomínio do vírus R5 nos estágios iniciais da doença pode ser justificado pelo fato de que existem mais células suscetíveis a ele (CCR5+ e CD4+) do que ao X4 durante a ativação imune. O R5 pode infectar mais facilmente células não ativadas; infectando DCs e macrófagos; ele apresenta altos níveis de replicação; infectando células do trato gastrointestinal e é menos reconhecido por linfócitos T específicos (LEVY, 2009). Alguns estudos sugerem que o vírus R5 é capaz de evoluir para um vírus que apresenta tropismo duplo (R5/X4) e, posteriormente, dá origem a um vírus X4 (SINGH & COLLMAN, 2000). Isso acontece em função de alterações genéticas específicas na região do envelope (SHIODA et al.,

1991), que acarretam em alterações na proteína gp120 (JANSSON et al., 2001; HARTLEI et al., 2005). Além disso, uma infecção por um vírus R5 pode ser seguida por uma infecção por um X4 resultante desse processo de transformação do tropismo viral (LEVY, 2009).

No presente estudo, apenas um dos pacientes apresentava infecção por um vírus X4 e sabe-se que uma depleção rápida de linfócitos T CD4+ está associada à presença de vírus com tropismo ao correceptor CXCR4 (SCARLATTI et al., 1997; REGOES & BONHOEFFER, 2005). Interessantemente, nesse mesmo paciente, foi encontrada a forma heterozigota para a mutação CCR5 Δ 32, assim como em seu parceiro soronegativo. Os resultados obtidos indicam forte evidência de adaptação viral e isso foi demonstrado em outros estudos, como o caso de um jovem de 27 anos, infectado pelo HIV com tropismo ao correceptor CCR5 e que desenvolveu um linfoma anaplásico de grandes células T. Assim como no paciente de Berlin, tentou-se realizar um transplante de células-tronco provenientes de indivíduo homozigoto para a mutação CCR5 Δ 32. No entanto, o procedimento não foi bem sucedido, uma vez que após o transplante o paciente apresentou altas cargas virais e o vírus encontrado apresentava tropismo ao correceptor CXCR4 (KORDELAS et al., 2014). As razões que levam à manutenção ou à alteração no tropismo viral não estão bem estabelecidas, mas acredita-se que essa característica seja determinada como resultado de complexas interações entre o vírus e as células do sistema imune do hospedeiro durante o início da infecção (REGOES & BONHOEFFER, 2005). A determinação do tropismo viral e sua capacidade de mudança são muito importantes, pois, nos permitem uma melhor compreensão da evolução e patogênese da doença, além de predizer a possibilidade de utilização de fármacos antagonistas do CCR5 e avaliar possível surgimento de cepas X4 em decorrência desse tipo de tratamento. Além disso, muitos estudos têm focado nos correceptores CCR5 e CXCR4 como alvos terapêuticos (DUQUENNE et al., 2014; KAY & WALKER, 2014; TEBAS et al., 2014).

Neste trabalho também foi analisada a expressão dos genes *APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *LEDGF/p75*, *SAMHDI* e *TRIM5a* em linfócitos T CD4+ e monócitos de pacientes soropositivos para HIV, HESN e indivíduos controles. A proteína APOBEC3G pode estar envolvida na resistência ao HIV devido à sua capacidade de causar mutações no cDNA viral recém transcrito. Estudos que correlacionam a quantidade de transcritos do gene *APOBEC3G* em PBMCs ativados com os níveis de RNA viral presente em indivíduos infectados pelo HIV e a contagem de células T CD4+ são controversos (BIASIN et al, 2000; JIN

et al., 2005; CHO et al., 2006). No entanto, Biasin e colaboradores (2007) demonstraram um aumento no nível de transcritos de *APOBEC3G* em PBMCs de HESN e em pacientes infectados quando comparados a indivíduos saudáveis, enquanto os níveis da proteína *APOBEC3G* estavam aumentados apenas nos HESN. Isso foi justificado pelo fato de que a presença do vírus aumenta a expressão deste gene. No entanto, em pessoas infectadas, a presença da proteína viral Vif induz a degradação de *APOBEC3G*, sendo que em HESN, a maior expressão de *APOBEC3G* seria resultado da ausência de Vif e poderia estar envolvida na resistência à infecção. Outro trabalho confirmou esse resultado e demonstrou que a exposição ao HIV pode desencadear uma maior expressão de *APOBEC3G* em PBMCs na ausência de infecção, entretanto, com o avanço da doença ou término da exposição, a expressão de *APOBEC3G* diminui (VÁZQUEZ-PÉREZ et al., 2009). No presente estudo, todos os pacientes estavam em tratamento antirretroviral e todos os casais foram aconselhados a utilizar preservativos. Dessa forma, os níveis de RNAm de *APOBEC3G* podem não estar aumentados nos HESN devido aos baixos níveis de exposição ao HIV. No entanto, em outros trabalhos avaliando HESN também não foi observada diferença significativa na expressão desse gene, sugerindo que os níveis de RNAm de *APOBEC3G* não apresentam relação com a proteção contra o HIV (REDDY et al., 2010; MOUS et al., 2012).

A BST-2 é uma proteína induzida por interferons e constitutivamente expressa principalmente em células B maduras, progenitoras CD34+ da medula óssea e células T (FUJITA et al., 2012). Ela apresenta um papel controverso na infecção pelo HIV, pois se sabe que é capaz de bloquear a liberação de novos vírions pela célula infectada (TOKAREV et al., 2009), além de provocar a ativação de NF- κ B por meio de uma via dependente de TAK-1, agindo como um sensor viral para estimular a produção de respostas pró-inflamatórias (GUSTIN & DOUGLAS, 2013). A proteína Vpu do HIV é capaz de antagonizar esse fator de restrição (NEIL, ZANG & BIENIASZ, 2008; VAN DAMME et al., 2011). Um trabalho publicado em 2011 demonstrou um aumento na expressão de BST-2 em PBMCs de indivíduos infectados pelo HIV quando comparados com indivíduos saudáveis. Essa expressão foi maior durante a fase aguda da doença e diminuiu a níveis similares aos do controle após início do tratamento com antirretrovirais. Além disso, demonstrou um aumento da expressão dessa proteína após tratamento das PBMCs com interferon- α *in vitro* a níveis suficientes para superar os da proteína Vpu e reduzir a liberação de novos vírions pela célula (HOMANN et al., 2011). No entanto, foram relatados altos

níveis dessa proteína em pacientes infectados que não estavam recebendo tratamento com medicamentos antirretrovirais. Nesse caso, os vírions acumulados na membrana celular poderiam aumentar a dispersão viral entre as células e a BST-2 serviria como marcador de doença em fase avançada em pacientes sem tratamento, pois, se correlaciona diretamente com a ativação de células T e a carga viral no sangue e inversamente com a contagem de T CD4+ (JOLLY, BOOTH & NEIL 2010). Assim como observado em outros trabalhos, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de *BST-2* entre os pacientes HIV-soropositivos, os HESN e os indivíduos controle deste estudo. No entanto, Mous e colaboradores (2012) ressaltaram a elevação dos níveis dessa proteína em pacientes infectados com HIV e que não estavam em tratamento, o que pode caracterizar essa molécula como marcador de progressão da doença. Um ponto importante a se destacar é que, diferentemente de outros estudos, neste trabalho foi avaliado o nível de transcritos de *BST-2* em linfócitos T CD4+ e monócitos separadamente e não de PBMCs total. Isso poderia gerar uma discordância com resultados obtidos na literatura, tendo em vista que essa proteína é fortemente expressa em linfócitos T maduros.

Este estudo é o primeiro a avaliar a quantidade relativa do gene *CFLAR* em casais sorodiscordantes. Os mecanismos envolvidos na resistência ao HIV devidos a proteína *CFLAR* ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, sabe-se que estão relacionados à inibição da apoptose nas células infectadas (TAN et al., 2013). A análise de transcritos dessa proteína foi realizada apenas *in vitro* utilizando uma linhagem de células Jurkat suscetível ao vírus. Foi demonstrado que a inibição da apoptose, através do aumento de fatores antiapoptóticos como a *CFLAR*, pode inibir a replicação do HIV (WANG et al., 2011). No presente estudo, não foram observadas diferenças nos níveis de transcritos de *CFLAR* entre os grupos avaliados, no entanto, para um maior esclarecimento da inibição da infecção utilizando a via da apoptose, outros fatores devem ser analisados com mais detalhes.

A *TRIM5a* é conhecida como um fator de restrição à infecção pelo HIV devido à sua capacidade de inibir a replicação viral por impedir o desencapsulamento logo após a entrada do vírus na célula (SPEELMON et al., 2006; LUKIC & CAMPBELL, 2012). Foi demonstrado um aumento nos níveis de transcritos de *TRIM5a* após a infecção por retrovírus, em especial o HIV, principalmente devido ao estímulo realizado por interferons (ASAOKA et al., 2005; CARTHAGENA et al., 2008). Sewram e colaboradores (2009) avaliaram indivíduos sul africanos que apresentavam alto risco de

infecção pelo HIV e demonstraram quantidades menores de RNAm de TRIM5 α naqueles que se infectaram. Esse resultado foi confirmado após análise da expressão da proteína TRIM5 α por Mous e colabores em 2011, no qual foi observada a presença de níveis mais baixos em indivíduos infectados e que não estavam sendo tratados quando comparados com indivíduos saudáveis. Nesse mesmo trabalho, foi sugerida uma associação inversa da expressão de TRIM5 α com os níveis de RNA viral e uma associação direta com a quantidade de células T CD4 $^{+}$ presentes no sangue do indivíduo infectado. Além disso, níveis reduzidos desse fator de restrição podem ser utilizados como um fator indicativo de replicação viral (PERTEL et al., 2011), uma vez que após complexar-se com o capsídeo viral é rapidamente degradado por via proteossômica (ROLD & AIKEN; 2008). No presente estudo, assim como no de Mous e colaboradores (2012), que avaliou casais sorodiscordantes do Senegal, não foram observadas diferenças nos níveis de transcritos dessa proteína.

Descrita recentemente, a proteína SAMHD1 apresenta capacidade de inibir a infecção pelo HIV por meio da depleção dos dNTPs intracelulares necessários para a síntese do cDNA viral e de sua atividade RNase e tem sua ação inibida pela proteína viral Vpx (LAHOUESSA et al., 2012; RYOO et al., 2014). Essa proteína é expressa em células de origem mieloide e em linfócitos T CD4 $^{+}$. No entanto, sua função de restrição retroviral é observada somente em células não ativadas (PAULS et al., 2014; TABLER et al., 2014). Há relatos de que indivíduos que apresentam o HLA-B*57 podem apresentar níveis aumentados de alguns fatores de restrição celulares, como SAMHD1 (RAPOSO et al., 2013). Um estudo recente demonstrou um aumento dos níveis de RNAm de SAMHD1 em linfócitos T CD4 $^{+}$ de controladores de elite em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, assim como no presente estudo, o grupo amostral utilizado era muito pequeno e os resultados devem ser interpretados com cautela (RIVEIRA-MUÑOZ et al., 2014). Ao contrário do esperado não foi observada nenhuma diferença na expressão desse fator em HESN quando comparados aos controles em linfócitos T CD4 $^{+}$ e monócitos. No entanto, Hollenbaugh e colaboradores (2014) sugerem que níveis muito baixos de SAMHD1 já seriam capazes de modular o *pool* de dNTPs em macrófagos.

Entre todas as proteínas analisadas neste trabalho, a LEDGF/p75 é a única que apresenta uma atividade próviral, ou seja, favorece a infecção pelo HIV por auxiliar a integração do material genético do vírus ao genoma do hospedeiro (MARSHALL et al., 2007). Alguns

estudos demonstraram níveis reduzidos dessa proteína em pacientes infectados pelo HIV (MADLALA, 2011), sem apresentar relação com menores quantidades de linfócitos T CD4+ (CIUFFI et al., 2005). Mous e colaboradores (2012) realizaram análises da expressão de LEDGF/p75 por citometria de fluxo e encontraram níveis significativamente reduzidos em linfócitos T CD4+ de HESN quando comparados com indivíduos saudáveis. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de RNAm de LEDGF/p75 entre PBMCs dos indivíduos avaliados. No presente trabalho, a expressão de RNAm de LEDGF/p75 foi avaliada em linfócitos T CD4+ e monócitos separadamente e também não foram observadas diferenças significativas. Além disso, outros estudos demonstram que baixos níveis de LEDGF/p75 não podem ser atribuídos como fator isolado para inibir a replicação viral e que outros fatores estariam envolvidos nesse processo (ZIELSKE & STEVENSON, 2006; ZHENG et al., 2010).

Outro fator de grande importância para a transmissão do HIV é a carga viral dos pacientes infectados. No presente estudo, todos os indivíduos soropositivos possuíam cargas virais indetectáveis por estarem fazendo uso de medicamentos antirretrovirais. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado que pacientes infectados pelo HIV e que têm carga viral no sangue em níveis abaixo dos limites detectáveis apresentam diminuição significativa na chance de transmissão do vírus por via sexual. Um deles, conhecido como HPTN052, foi realizado em 2011 e conduzido entre casais heterossexuais da África subsaariana, demonstrou uma redução de 96% do risco de transmissão (CHEN et al., 2012). Outro estudo importante está sendo conduzido pelo Instituto Nacional de Saúde do Reino Unido desde o ano de 2010; trata-se de um estudo multicêntrico, chamado PARTNER, que avalia casais sorodiscordantes em clínicas localizadas na Europa. Mais de mil casais já foram avaliados, sendo que os resultados preliminares têm indicado não haver nenhum caso de transmissão do HIV entre um soropositivo com carga viral indetectável e seu parceiro soronegativo (RODGER et al., 2014). Esses trabalhos evidenciam que a supressão viral pode reduzir significativamente a transmissão sexual do HIV e tem direcionado diversos países, inclusive o Brasil, a utilizar o tratamento antirretroviral como forma de prevenção da transmissão da infecção pelo HIV (BRASIL^b, 2013; COHEN et al., 2013). Apesar desses resultados animadores, o uso de preservativos deve ser sempre estimulado mesmo em pacientes que apresentem supressão viral, pois, indivíduos que apresentam carga viral indetectável no sangue podem algumas vezes ter níveis detectáveis, embora reduzidos, de vírus em

outros fluídos corporais, incluindo sêmen e líquidos vaginal e retal (KALICHMAN et al., 2008; LAMBERT-NICLOT et al, 2012). Embora as implicações deste fenômeno na transmissão do HIV ainda não sejam claras, um estudo realizado por Liu e colaboradores (2014) demonstrou que a infecção pelo HIV pode reconfigurar a relação entre bactérias no sêmen e fatores imunológicos, os quais, por sua vez, influenciam a carga viral, sugerindo que o microbioma do sêmen também pode desempenhar um papel importante na transmissão sexual do HIV. Há evidências também da presença, no trato genital, de cepas virais resistentes que não estariam presentes no sangue (LIUZZI et al., 2004).

Apesar da possibilidade de contato com HIV entre os casais estudados ter sido baixa devido à carga viral indetectável, é importante ressaltar que quatro dos nove casais que nunca haviam utilizado preservativo descobriram a condição de sorodiscordância no decorrer do relacionamento e todas as descobertas aconteceram frente à ocorrência de sintomas clínicos dos parceiros soropositivos, um indício da presença de maiores cargas virais na época. Outro ponto importante a se considerar é o esquema antirretroviral utilizado pelos pacientes infectados. Sabe-se que a TARV é constituída por uma combinação de medicamentos e pode causar muitas reações adversas que levam a uma falha no tratamento devido à dificuldade na adesão dos pacientes. Isso pode desencadear o surgimento de variantes resistentes que limitam a eficácia das drogas, gerando dificuldades na implantação de terapias alternativas e possibilidades de transmissão desses vírus multirresistentes (MARCUS, DITTMAR & KRAUSSLICH, 2002). O tratamento antirretroviral utilizado atualmente é composto geralmente por esquemas que incluem fármacos inibidores da transcriptase reversa (ITR) e da protease viral (IP). Os ITR bloqueiam reversamente a transcrição reversa do genoma viral evitando a integração ao DNA do hospedeiro e podem ser nucleosídicos (ITRN) como didanosina, lamivudina, tenofovir e zidovudina ou não nucleosídicos (ITRNN), como efavirenz. Os IP, como ritonavir e darunavir, impedem a maturação de novas partículas virais. Além disso, fármacos de terceira geração estão sendo amplamente utilizados no manejo de resistência à terapia com medicamentos convencionais. Pode-se citar como exemplo os inibidores da IN como raltegravir (utilizados após genotipagem da IN), de fusão (utilizados após genotipagem da gp41) e da entrada (utilizados após teste de tropismo viral) (LEVY, 2009). O tratamento de primeira linha é realizado com três medicamentos antirretrovirais, sendo dois ITRN associados a um ITRNN. Em situações em que o uso de ITRNN esteja impossibilitado, deve-se partir para a segunda linha de

tratamento que é composta de dois ITRN e um IP e, quando houver falha virológica confirmada e teste de genotipagem recente demonstrando resistência a pelo menos um antirretroviral de cada uma das três classes (ITRN, ITRNN e IP), os fármacos de terceira linha devem ser utilizados (BRASIL^b, 2013). Neste estudo, a maioria dos casais mantinha relações sexuais desprotegidas há mais de cinco anos e, devido à heterogeneidade de medicamentos que compunham o esquema antirretroviral, pode-se supor a existência de cargas virais mais altas em alguns momentos. Isso é exemplificado pelo fato de que um dos indivíduos estava fazendo uso de um medicamento de terceira linha, o raltegravir, o que sugere falha terapêutica anterior e, dessa forma, evidência de carga viral detectável no sangue. A contagem de células T CD4+ em alguns pacientes infectados também é uma evidência da presença de altas cargas virais em momentos anteriores, pois três deles apresentaram valores inferiores a 350 células por mm³ no momento da participação no estudo.

Deve-se salientar que o uso de preservativo foi pouco observado entre os participantes do estudo, tanto nas práticas de sexo oral, anal ou vaginal. Entre os casais sorodiscordantes, mesmo após o conhecimento da condição soropositiva do parceiro, a prática de relações sexuais sem uso do preservativo se manteve. A baixa frequência no uso de preservativo foi também demonstrada em outros estudos que avaliaram casais sorodiscordantes (MELO et al., 2008; MUJUGIRA et al., 2011). É importante ressaltar que alguns países, como a África do Sul, apresentaram uma diminuição na incidência de infecções pelo HIV devido ao aumento da distribuição e da utilização de preservativos (UNAIDS/WHO, 2014). Esses resultados indicam que é preciso maior conscientização da população e mais interesse de autoridades em realizar programas de prevenção.

A história natural e a patogênese do HIV são complexas e variáveis, sendo que a capacidade de controlar a infecção ou retardar a progressão da doença é regulada por um equilíbrio entre fatores virais e do hospedeiro. Algumas limitações estão presentes neste estudo e, dessa forma, os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela. O trabalho envolveu a análise de supostos fatores de resistência em apenas nove casais sorodiscordantes e estudos utilizando uma amostragem maior devem ser realizados a fim de confirmar esses resultados. Considerando a análise da quantidade relativa de RNAm das proteínas estudadas, deve-se salientar que o resultado encontrado corresponde às condições testadas e aos pares de iniciadores específicos utilizados. É muito importante que se realize uma avaliação da expressão das

proteínas, pois, estas podem ser moduladas ou sofrer regulação pós transcricional. Essa análise pode ser realizada por vários métodos, como Western Blot ou citometria de fluxo. Também é importante que se realize a avaliação da atividade dessas proteínas. Somente dessa maneira pode-se inferir se ela está ou não atuando na resistência ao HIV. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram outros estudos que também demonstraram não haver diferenças na expressão desses genes entre pacientes infectados pelo HIV, HESN e indivíduos saudáveis. No entanto é evidente a necessidade da utilização de um grupo de indivíduos infectados pelo HIV e que não estejam em tratamento com antirretrovirais. Somente dessa maneira poder-se-ia avaliar com precisão a interferência do vírus, pois, foram demonstrados aumentos nesses fatores de restrição em decorrência da infecção (MOUS et al, 2012). O grande entrave é que, com os novos critérios de tratamento adotados no Brasil, esse grupo de pessoas diagnosticadas e que não estão em tratamento tem se tornado cada vez mais escasso. Considerando a metodologia utilizada, a utilização de quatro genes de referência foi um diferencial adotado neste trabalho. Essa ferramenta aumenta a estabilidade e a confiabilidade dos resultados, enquanto que outros trabalhos, que demonstraram diferenças de expressão, utilizavam apenas um gene de referência, o que não é indicado (BUSTIN et al., 2009). Além disso, diferentemente do que foi realizado na maioria dos trabalhos, que avaliava todos os PBMCs, neste estudo, realizou-se a separação e purificação em linfócitos T CD4+ e monócitos que são as células mais comumente infectadas.

Assim, os resultados obtidos contribuem para reforçar o caráter multifatorial dos mecanismos de resistência ao HIV, uma vez que não foi possível determinar um fator específico que contribua para a resistência à infecção em indivíduos soronegativos expostos ao HIV.

8 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- Observou-se a presença do subtipo C do HIV em quatro (44,4%) dos nove indivíduos e do subtipo B em dois deles (22,2%). Também foi observada a presença da forma recombinante BC em dois pacientes (22,2%) e da CFB em apenas um (11,1%);

- Devido ao pequeno número de indivíduos analisados, não foi possível realizar uma análise de prevalência ou uma relação de categoria de exposição com o subtipo encontrado. No entanto, houve um predomínio do subtipo C entre os indivíduos da categoria de exposição heterossexual e/ou usuário de drogas injetáveis e, foram encontrados dois indivíduos heterossexuais infectados pelo subtipo B. Além disso, o indivíduo da categoria de exposição homossexual apresentou-se infectado pelo subtipo BC e foi observada também uma infecção pela forma recombinante CFB;

- Não foi encontrado nenhum indivíduo homocigoto para a mutação CCR5 Δ 32 e foram encontrados dois indivíduos heterocigotos para essa mutação entre os nove HIV-soropositivos, dois entre os nove HESN e dois entre os doze controles;

- Apenas um dos pacientes apresentava infecção por um vírus X4 e, nesse mesmo paciente, foi encontrada a forma heterocigota para a mutação CCR5 Δ 32, assim como para seu parceiro soronegativo;

- Não foram observadas diferenças significativas na expressão de genes que codificam proteínas com possível atividade antiviral (*APOBEC3G*, *BST-2*, *CFLAR*, *SAMHD1* e *TRIM5a*) em linfócitos T CD4+ e monócitos de pacientes soropositivos para HIV, HESN e indivíduos controles;

- Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *LEDGF/p75*, gene que codifica uma proteína com possível atividade próviral, em linfócitos T CD4+ e monócitos de pacientes soropositivos para HIV, HESN e indivíduos controles.

9 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo pesquisou a presença de alterações biológicas presentes em indivíduos soronegativos para a infecção pelo HIV e que já foram expostos ao vírus por meio de relações sexuais com parceiro soropositivo. Avaliou-se a presença da mutação CCR5 Δ 32, porém a mesma não foi encontrada em sua forma homozigota, mas em alta frequência entre os indivíduos em sua forma heterozigota. Também foi avaliada a quantidade de transcritos de genes que codificam proteínas supostamente envolvidas na infecção pelo HIV e constatou-se não haver diferenças significativas na expressão desses genes, possivelmente em função de todos os pacientes HIV positivos estarem com cargas virais indetectáveis no sangue no momento da coleta. Dessa maneira, não foi possível determinar um fator específico que contribua para a resistência à infecção em indivíduos soronegativos expostos ao HIV. No entanto, o estudo desses fatores em conjunto com um grupo amostral de maior representatividade pode fornecer importantes informações a respeito da resistência à infecção pelo HIV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

ANGLEMYER, A.; RUTHERFORD, G. W.; HORVATH, T.; BAGGALEY, R. C.; EGGER, M.; SIEGFRIED, N. Antiretroviral therapy for prevention of HIV transmission in HIV-discordant couples. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 8, CD009153, 2011.

ASAOKA, K.; IKEDA, K.; HISHINUMA, T.; HORIE-INOUE, K.; TAKEDA, S.; INOUE, S. A retrovirus restriction factor TRIM5 α is transcriptionally regulated by interferons. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, n. 4, p. 1950, 2005.

ASIOLI, S.; RIGHI, A.; DE BIASE, D.; MORANDI, L.; CALIENDO, V.; PICCIOTTO, F.; et al. Expression of p63 is the sole independent marker of aggressiveness in localised (stage I - II) Merkel cellcarcinomas. **Mod Pathol**, v. 24, n. 11, p. 1451-1461, 2011.

AUTRAN, B.; DESCOURS, B.; VETTAND-FENOEL, V.; ROUZIQUX, C. Elite controllers as a model of functional cure. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 6, n. 3, p. 181-187, 2011.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-871, 1983.

BARRE-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, n.9019, p. 31-35, 1996.

BARTLETT, J. G.; MOORE, R. A comprehensive plan for managed care of patients infected with human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 1, p. 50-55, 1999.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 657-700, 1999.

BIASIN, M.; CAPUTO, S. L.; SPECIALE, L.; COLOMBO, F.; RACIOPPI, L.; ZAGLIANI, A.; et al. Mucosal and systemic immune activation is present in human immunodeficiency virus - exposed seronegative women. **J Infect Dis**, v. 182, n. 5, p. 1365-1374, 2000.

BIASIN, M.; PIACENTINI, L.; LO CAPUTO, S.; KANARI, Y.; MAGRI, G.; TRABATTONI, D.; et al. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: A possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. **J Infect Dis**, v 195, n. 7, p. 960–964, 2007.

BLANCO-MELO, D.; VENKATESH, S.; BIENIASZ, P. D. Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. **Immunity**, v. 37, n. 3, p. 399-411, 2012.

BLUMENTHAL, R.; DURELL, S.; VIARD, M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. **J Biol Chem**, v. 287, n. 49, p. 40841-40849, 2012.

BOULET, S.; KLEYMAN, M.; KIM, J. Y.; KAMYA, P.; SHARAFI, S.; SIMIC, N.; et al. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. **AIDS**, v. 22, n. 12, p. 1487–1491, 2008.

BRASIL - Ministério da Saúde, Coordenação de DST e Aids. Boletim Epidemiológico AIDS. Ano III, n. 1, 2014. Disponível em http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56677/boletim_2014_1_pdf_60254.pdf. Acesso em dezembro de 2014.

BRASIL^a – Ministério da Saúde, Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças, 2013. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55594/_p_manual_tecnico_hiv_final_pdf_p__23462.pdf. Acesso em agosto de 2014.

BRASIL^b – Ministério da Saúde, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos, 2013. Disponível em:

http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/pr otocolo_13_3_2014_pdf_28003.pdf. Acesso em agosto de 2014.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CARRINGTONA, M.; BONTROPB, R. E. Effects of MHC Class I on HIV/SIV Disease in Primates. **AIDS**, v. 16, Suppl 4, p. S105–S114, 2002.

CARTHAGENA, L.; PARISE, M. C.; RINGEARD, M.; CHELBI-ALIX, M. K.; HAZAN, U.; NISOLE, S. Implication of TRIM alpha and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities. **Retrovirology**, v.5, p. 59, 2008.

CHAUDHARI, D. V.; CHAVAN, V. R.; KERKAR, S. C.; MEHTA, P. R.; MANIA-PRAMANIK, J. Polymorphisms in major cytokine genes: a study among human immunodeficiency Virus-1 serodiscordant couples in Mumbai, India. **Indian J Med Microbiol**, v. 31, n. 2, pp. 166-172, 2013.

CHEGE, D.; CHAI, Y.; HUIBNER, S.; KAIN, T.; WACHIHI, C.; KIMANI, M.; et al. Blunted IL17/IL22 and pro-inflammatory cytokine responses in the genital tract and blood of HIV exposed, seronegative female sex workers in Kenya. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e43670, 2012.

CHEN, Y. Q.; MASSE, B.; WANG, L.; OU, S. S.; LI, X.; DONNELL, D.; et al. Statistical considerations for the HPTN 052 Study to evaluate the effectiveness of early versus delayed antiretroviral strategies to prevent the sexual transmission of HIV-1 in serodiscordant couples. **Contemp Clin Trials**, v. 33, n. 6, p. 1280-1286, 2012.

CHEN, Z.; ZHANG, L.; YING, S. SAMHD1: a novel antiviral factor in intrinsic immunity. **Future Microbiol**, v. 7, n. 9, p. 1117-1126, 2012.

CHENG-MAYER, C.; LIU, R.; LANDAU, N. R.; STAMATATOS, L. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CKR5 coreceptor. **J Virol**, v. 71, n. 2, p. 1657-1661, 1997.

CHEREPANOV, P.; MAERTENS, G.; PROOST, P.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; ENGELBORGHES, Y.; et al. HIV-1 integrase forms

stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 1, p. 372-381, 2003.

CHO, S. J.; DRECHSLER, H.; BURKE, R. C.; ARENS, M. Q.; POWDERLY, W.; DAVIDSON, N. O. APOBEC3F and APOBEC3G mRNA levels do not correlate with human immunodeficiency virus type 1 plasma viremia or CD4+ T-cell count. **J Virol**, v. 80, n. 4, p. 2069-2072, 2006.

CHOY, R. Y.; LEVINSON, P.; GUTHRIE, B. L.; LOHMAN-PAYNE, B.; BOSIRE, R.; LIU, A. Y.; et al. Cervicovaginal HIV-1 neutralizing IgA detected among HIV-1-exposed seronegative female partners of HIV-1-discordant Kenyan couples. **AIDS**, v. 26, n. 17, p. 2155 – 2163, 2012.

CHRIST, F.; DEBYSER, Z. The LEDGF/p75 integrase interaction, a novel target for anti-HIV therapy. **Virology**, v. 435, n. 1, p.102-109, 2013.

CIUFFI, A.; LLANO, M.; POESCHLA, E.; HOFFMANN, C.; LEIPZIG, J.; SHINN, P.; ECKER, J. R.; BUSHMAN, F. A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. **Nat Med**, v. 11, n. 12, p. 1287-1289, 2005.

CIUFFI, A.; BUSHMAN, F. D. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. **TRENDS Genet**, v. 22, n. 7, p. 388-395, 2006.

CLARK, S. J.; SHAW, J. M. The acute retroviral syndrome and the pathogenesis of HIV-1 infection. **Semin Immunol**, v. 5, n. 3, p. 149-55, 1993.

COHEN, M. S.; SMITH, M. K.; MUESSIG, K. E.; HALLETT, T. B.; POWERS, K. A.; KASHUBA, A. D. Antiretroviral treatment of HIV-1 prevents transmission of HIV-1: where do we go from here? **Lancet**, v. 382, n. 9903, p. 1515-15, 2013.

CONNOR, R. I.; HO, D. D. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. *In*: Devita VT. editor. AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention. Philadelphia: J.B. Lippincott Company p.13-85, 1992.

CURRAN, K.; BAETEN, J. M.; COATES, T. J.; KURTH, A.; MUGO, N. R.; CELUM, C. HIV-1 prevention for HIV-1 serodiscordant couples. **Curr HIV/AIDS Rep**, v. 9. n. 2, p. 160–170, 2012.

DAAR, E. S.; MOUDGIL, T.; MEYER, R. D.; HO, D. D. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type I infection. **N Eng J Med**, v. 324, n. 14, p. 961-964, 1991.

DEAN, M.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; HUTTLEY, G. A.; SMITH, M. W.; ALLIKMETS, R.; et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1856-1862, 1996.

DE COCK, K. M.; JAFFE, H. W.; CURRAN, J. W. Reflections on 30 years of AIDS. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1044-1048, 2011.

DEEKS, S. G.; WALKER, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 406-416, 2007.

DESHMANE S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DUQUENNE, C.; PSOMAS, C.; GIMENEZ, S.; GUIGUES, A.; CARLES, M. J.; BARBUAT, C.; et al. The two human *cxcr4* isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains. **J Immunol**, pii: 1303298, 2014.

ECKERT, D.M.; KIM, P. S. Design of potent inhibitors of HIV entry form gp41 N-peptide region. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 20, p. 11187-11192, 2001.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, e1000046, 2008.

ESTRADA-AGUIRRE, J. A.; CÁZAREZ-SALAZAR, S. G.; OCHOA-RAMÍREZ, L. A.; ACOSTA-COTA SDE, J.; ZAMORA-GÓMEZ, R.; NAJAR-REYES, G. M.; et al. Protective effect of CCR5 Delta-32 allele against HIV-1 in Mexican women. **Curr HIV Res**, v. 11, n. 6, p. 506-510, 2013.

EUGEN-OLSEN, J.; IVERSEN, A. K. N.; GARRED, P.; KOPPELHUS, U.; PEDERSEN, C.; BENFIELD, T. L.; SORENSEN, A. M.; et al.

Heterozygosity for a deletion in the *CKR-5* gene leads to prolonged AIDS-free of HIV-seropositive individuals. **AIDS**, v. 11, n. 3, p. 305-310, 1997.

EVANS, D. T.; SERRA-MORENO, R.; SINGH, R. K.; GUATELLI, J. C. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 9, p. 388-96, 2010.

EYESON, J; KING, D.; BOAZ, M. J.; SEFIA, E.; TOMKINS, S.; WATERS, A.; et al. Evidence for Gag p24-specific CD4 T cells with reduced susceptibility to R5 HIV-1 infection in a UK cohort of HIV-exposed-seronegative subjects. **AIDS**, v. 17, n. 16, p.2299 – 2311, 2003.

FEINBERG, M. B.; AHMED, R. Born this way? Understanding the immunological basis of effective HIV control. **Nature immunol**, v. 13, n. 7, p. 632-634, 2012.

FORD, E. S.; PURONEM, C. E.; SERETI, I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 4, n. 3, p. 206-214, 2009.

FOWKE, K. R.; NAGELKERKE, N. J.; KIMANI, J.; SIMONSEN, J. N.; ANZALA, A. O.; BWAYO, J. J.; et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. **Lancet**, v. 348, n. 9038, p. 1347-1351, 1996.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 1-25, 1998.

FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somat Cell Mol Genet**, v. 26, p. 13-33, 2001.

FUJITA, H.; FUJIMOTO, K.; TOKUNAGA, K.; TANAKA, Y. Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin. **Curr HIV Res**, v. 10, n. 4, p. 321-326 321, 2012.

FURUTA, Y.; ERIKSSON, K.; SVENNERHOLM, B.; FREDMAN, P.; HORAL, P.; JEANSSON, S.; et al. Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 26, p. 12559–12563, 1994.

GALÃO, R. P.; LE TORTOREC, A.; PICKERING, S.; KUECK, T.; NEIL, S. J. Innate sensing of HIV-1 assembly by tetherin induces NFκB-dependent proinflammatory responses. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 5, 2012.

GRÄF, T.; PASSAES, C. P. P.; FERREIRA, L. G. E.; GRISARD, E. C.; MORGADO, M. G.; BELLO, G.; PINTO, A. R. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: An association of HIV-1 subtypes with exposure categories. **J Clin Virol**, v. 51, n. 3, p. 186-191, 2011.

GRÄF, T.; PINTO, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 170-178, 2013.

GONZALEZ, E.; BAMSHAD, M.; SATO, N.; MUMMIDI, S.; DHANDA, R.; CATANO, G.; et al. Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, n. 21, p. 12004-12009, 1999.

GOTO, T.; KENNEL, S. J.; ABE, M.; TAKISHITA, M.; KOSAKA, M.; SOLOMON, A.; SAITO, S. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1922-1930, 1994.

GUSTIN, J. K.; DOUGLAS, J. L. BST-2/tetherin: viral tether, viral sensor or both? **Future Virol**, v. 8, n. 11, 10.2217/fvl.13.96, 2013.

HARRIS, R. S.; HULTQUIST, J.F.; EVANS, D. T. The restriction factors of human immunodeficiency virus. **J Biol Chem**, v. 287, n. 49, p. 40875-40883, 2012.

HARTLEY, O., KLASSE, P. J., SATTENTAU, Q. J., MOORE, J. P., 2005. V3: HIV's switch-hitter. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21, n. 2, p. 171-189, 2005.

HEENEY, J. L.; DALGLEISH, A. G.; WEISS, R. A. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. **Science**, v. 313, n. 5786, 462-466, 2006.

HIV Database, 2012. Disponível em <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html>. Acesso em agosto de 2014.

HOFFMANN, C.; ROCKSTROH, J.; KAMPS, B. HIV Medicine. 15. ed. Flying Publisher, 2007. Disponível em <<http://www.hivmedicine.com/>>. Acesso em 28 jun. 2008.

HOLLENBAUGH, J. A.; TAO, S.; LENZI, G. M.; RYU, S.; KIM, D. H.; DIAZ-GRIFFERO, F.; SCHINAZI, R. F.; KIM, B. dNTP pool modulation dynamics by SAMHD1 protein in monocyte-derived macrophages. **Retrovirology**, v. 11, n. 1, p. 63, 2014.

HOMANN, S.; SMITH, D.; LITTLE, S.; RICHMAN, D.; GUATELLI, J. Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection in vivo. **J Virol**, v. 85, n. 20, p. 10659-10668, 2011.

HORTON, R. E.; MCLAREN, P. J.; FOWKE, K.; KIMANI, J.; BALL, T. B. Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations. **J Infect Dis**, 202 Suppl 3: S377-S381, 2010.

HOTTER, D.; SAUTER, D.; KIRCHHOFF, F. Emerging role of the host restriction factor tetherin in viral immune sensing. **J Mol Biol**, v. 425, n. 24, p. 4956-4964, 2013.

HRECKA, K., HAO, C., GIERSZEWSKA, M., SWANSON, S.K., KESIK-BRODACKA, M., SRIVASTAVA, S., et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 658-661, 2011.

HUANG, Y.; PAXTON, W. A.; WOLINSKY, S. M.; NEUMANN, A. U.; ZHANG, L.; HE, T.; et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. **Nat Med**, v. 2, n. 11, p. 1240-1243, 1996.

HÜTTER, G.; NOWAK, D.; MOSSNER, M.; GANEPOLA, S.; MÜSSIG, A.; ALLERS, K.; et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. **N Engl J**, v. 360, n. 7, p. 692-698, 2009.

JANSSON, M., BACKSTROM, E., SCARLATTI, G., BJORNDAL, A., MATSUDA, S., ROSSI, P., ALBERT, J., WIGZELL, H. Length variation of glycoprotein 120 V2 region in relation to biological phenotypes and coreceptor usage of primary HIV type 1 isolates. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 17, n. 15, p. 1405-1414, 2001.

JIN, X.; BROOKS, A.; CHEN, H.; BENNETT, R.; REICHMAN, R.; SMITH, H. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. **J Virol**, v. 79, n. 17, p. 11513-11516, 2005.

JOLLY, C.; BOOTH, N. J.; NEIL, S. J. Cell-cell spread of human immunodeficiency virus type 1 overcomes tetherin/BST-2-mediated restriction in T cells. **J Virol**, v. 84, n. 23, p. 12185-12199, 2010.

KALICHMAN S. C.; DI BERTO, G. B. A.; EATON, L. M. A. Human immunodeficiency virus viral load in blood plasma and semen: review and implications of empirical findings. **Sex Transm Dis**, v. 35, n. 1, p.55-60, 2008.

KAY, M. A.; WALKER, B. D. Engineering cellular resistance to HIV. *N Engl J Med*, V. 370, N. 10, P. 968-969, 2014.

KELLY, J.; BEDDALL, M. H.; YU, D.; IYER, S. R.; MARSH, J. W.; WU, Y. Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. **Virology**, v. 372, n. 2, p. 300-312, 2008.

KLIMKAIT, T.; STREBEL, K.; HOGGAN, M. D.; MARTIN, M. A.; ORENSTEIN, J. M. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. **J Virol**, v. 64, n. 2, p.621-629, 1990.

KLOTMAN, M. E.; CHANG, T. L. Defensins in innate antiviral immunity. **Nat Rev Immunol**, v.6, n. 6, p. 447-546, 2006.

KORDELAS, L.; VERHEYEN, J.; BEELEN, D. W.; HORN, P. A.; HEINOLD, A.; KAISER, R.; et al. Shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 Delta32 mutation. **N Engl J Med**, v. 371, n. 9, p. 880-882, 2014.

KUTLUARY, S. B.; PEREZ-CABALLERO, D.; BIENIASZ, P. D. Fates of retroviral core components during unrestricted and trim5-restricted infection. **PLoS Pathog**, v. 9, n.3, e1003214, 2013.

KWA, D.; VINGERHOED, J.; BOESER, B.; SCHUITMAKER, H. Increased in vitro cytopathicity of CC chemokine receptor 5-restricted human immunodeficiency virus type 1 primary isolates correlates with a

progressive clinical course of infection. **J Infect Dis**, v. 187, n. 9, p. 1397-1403, 2003.

LAGUETTE, N.; SOBHIAN, B.; CASARTELLI, N.; RINGEARD, M.; CHABLE-BESSIA, C.; SÉGÉRAL, E.; et al. SAMHD1 is the dendritic and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 654-657, 2011.

LAHOUASSA, H.; DADDACHA, W.; HOFMANN, H.; AYINDE, D.; LOGUE, E. C.; DRAGIN, L.; et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. **Nature Immunol**, v. 13, n. 3, p. 223-229, 2012.

LAMBERT-NICLOT, S.; TUBIANA, R.; BEAUDOUX, C.; LEFEBVRE, G.; CABY, F.; BONMARCHAND, M.; et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey. **AIDS**, v. 26, n. 8, p. 971-975, 2012.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 62, 2005.

LAU, D.; KWAN, W.; GUATELLI, J. Role of the endocytic pathway in the counteraction of BST-2 by human lentiviral pathogens. **J Virol**, v. 85, n. 19, p. 9834-9846, 2011.

LEVINSON, P.; CHOI, R. Y.; COLE, A. L.; HIRBOD, T.; RHEDIN, S.; PAYNE, B.; et al. HIV-neutralizing activity of cationic polypeptides in cervicovaginal secretions of women in HIV-serodiscordant relationships. **PLoS One**, v. 7, n. 2, e31996, 2012.

LEVY, J. A.; HOFFMAN, A. D.; KRAMER, S. M.; LANDIS, J. A.; SHIMABUKURO, J. M.; OSHIRO, L.S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v. 225, n. 4664, p. 840-842, 1984.

LEVY, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Microbiol. Rev.** 57, n. 1, p. 183-289, 1993.

LEVY, J. A. The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). **Trends Immunol**, v. 24, n. 12, p. 628-632, 2003.

LEVY, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 147-160, 2009.

LEWINSKI, M. K.; YAMASHITA, M.; EMERMAN, M.; CIUFFI, A.; MARSHALL, H.; CRAWFORD, G.; et al Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 6, e60, 2006.

LIU, C. M.; OSBORNE, B. J.; HUNGATE, B. A.; SHAHABI, K.; HUIBNER, S.; LESTER, R.; et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in hiv infection. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 7, e1004262, 2014.

LUZZI, G.; CHIRIANNI, A.; ZACCARELLI, M.; ZINZI, D.; ESPOSITO, V.; GUADAGNINO, V.; ANTINORI, A.; PIAZZA, M. Differences between semen and plasma of nucleoside reverse transcriptase resistance mutations in HIV-infected patients, using a rapid assay. **In Vivo**, v. 18, n. 4, p. 509-12, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta} C(T)). **Method Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOUTFY, M. R.; WU, W.; LETCHUMANAN, M.; BONDY, L.; ANTONIOU, T.; MARGOLESE, S.; et al. Systematic review of HIV transmission between heterosexual serodiscordant couples where the HIV-positive partner is fully suppressed on antiretroviral therapy. **PLoS One**, v. 8, n. 2, e55747, 2013.

LUBAN, J. TRIM5 and the regulation of HIV-1 infectivity. **Mol Biol Int**, v. 2012, 426840, 2012.

LUKIC, Z.; CAMPBELL, E. M. The cell biology of TRIM5 α . **Curr HIV/AIDS Rep**, v. 9, n. 1, p. 73-80, 2012.

MACKAY, C.R. CCL3L1 dose and HIV-1 susceptibility. **Trends Mol Med**, v.11, n. 5, p. 203-206, 2005.

MCLAREN, P. J.; BALL, T. B.; WACHIHI, C.; JAOKO, W.; KELVIN, D. J.; DANESH, A.; et al.

HIV-exposed seronegative commercial sex workers show a quiescent phenotype in the CD4+ T cell compartment and reduced expression of HIV-dependent host factors. **J Infect Dis**, v. 2, Suppl. 3, p. 339-344, 2010.

MADLALA, P.; GIJSBERS, R.; CHRIST, F.; HOMBROUCK, A.; WERNER, L.; MLISANA, K.; et al. Association of polymorphisms in the LEDGF/p75 gene (PSIP1) with susceptibility to HIV-1 infection and disease progression. **AIDS**, v. 25, n. 14, p.1711-1719, 2011.

MAILLIARD, R. B.; SON, Y. I.; REDLINGER, R.; COATES, P. T.; GIERMASZ, A.; MOREL, P. A.; et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: twosignal requirement for the induction of NK cell helper function. **J Immunol**, v. 171, n. 5, p. 2366-2373, 2003.

MALIM, M. H.; BIENIASZ, P. D. HIV Restriction factors and mechanisms of evasion. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 5, a006940, 2012.

MANGEAT, B.; TURELLI, P.; CARON, G.; FRIEDLI, M.; PERRIN, L.; TRONO, D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. **Nature**, v. 424, n. 6944, p. 99-103, 2003.

MARCUS, U.; DITTMAR, M. T.; KRAUSSLICH, H G. HIV: epidemiology and strategies for therapy and vaccination. **Intervirolgy**, v. 45, n. 4-6, p. 260-266, 2002.

MARMOR, M.; HERTZMARK, K.; THOMAS, S. M.; HALKITIS, P. N.; VOGLER, M. Resistance to HIV infection. **J Urban Health**, V. 83, N. 1, P. 5-17, 2006.

MARSHALL, H. M.; RONEN, K.; BERRY, C.; LLANO, M.; SUTHERLAND, H.; SAENZ, D.; et al. Role of PSIP1/LEDGF/p75 in lentiviral infectivity and integration targeting. **PLoS One**, v. 2, n. 12, e1340, 2007.

MARTIN, M. P.; DEAN, M.; SMITH, M. W.; WINKLER, C.; GERRARD, B.; MICHAEL, N. L.; et al. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. **Science**, v. 282, n. 5395, p. 1907-1911, 1998.

MARTINEZ-MAZA, O.; CRABB, E.; MITSUYASU, R. T.; FAHEY, J. L.; GIORGI, J. V. Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity. **J Immunol**, v. 138, n. 11, p. 3720-3724, 1987.

MARTINSON, J. J.; CHAPMAN, N. H.; REES, D. C.; LIU, Y. T.; CLEGG, J. B. Global distribution of the CCR5 gene 32 base-pair deletion. **Nat Genet**, v. 16, n. 1, p: 100-103, 1995.

MBISA, J. L.; BARR, R.; THOMAS, J. A.; VANDEGRAAFF, N.; DORWEILER, I. J.; SVAROVSKAIA, E. S.; et al. Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. **J Virol**, v. 81, n. 13, p. 7099-7110, 2007.

MELLORS, J. W.; KINGSLEY, L. A.; RINALDO, C. R., JR.; TODD, J. A.; HOO, B. S.; KOKKA, R. P.; GUPTA, P. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. **Ann Intern Med**, v. 122, n. 8, p. 573-9, 1995.

MELO, M. G.; SANTOS, B. R.; DE CASSIA LIRA, R.; VARELLA, I. S.; TURELLA, M. L.; ROCHA, T. M.; NIELSEN-SAINES, K. Sexual transmission of HIV-1 among serodiscordant couples in Porto Alegre, southern Brazil. **Sex Transm Dis**, v. 35, n. 11, p. 921-925, 2008.

MILLER, J. H.; PRESNYAK, V.; SMITH, H. C. The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block APOBEC3G incorporation. **Retrovirology**, v. 4, p. 81, 2007.

MIYAZAWA, M.; LOPALCO, L.; MAZZOTTA, F.; LO CAPUTO, S.; VEAS, F.; CLERICI, M.; ESN STUDY GROUP. The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 161-175, 2009.

MOORE, J. P.; KITCHEN, S. G.; PUGACH, P.; ZACK, Z. A. The CCR5 and CXCR4 coreceptors: central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 1, p. 111-126, 2014.

MOUS, K.; JENNES, W.; DE ROO, A.; PINTELON, I.; KESTENS, L.; VAN OSTADE, X. Intracellular detection of differential APOBEC3G,

TRIM5alpha, and LEDGF/p75 protein expression in peripheral blood by flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 372, p. 52 – 64, 2011.

MOUS, K.; JENNES, W.; CAMARA, M.; SEYDI, M.; DANEAU, G.; MBOUP, S.; et al. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. 1-9, 2012.

MUJUGIRA, A.; BAETEN, J. M.; DONNELL, D.; NDASE, P.; MUGO, N. R.; BARNES, L.; et al. Characteristics of HIV-1 serodiscordant couples enrolled in a clinical trial of antiretroviral pre-exposure prophylaxis for HIV-1 prevention. **PLoS One**, v.6, n. 10, e25828, 2011.

MULDER, L. C.; CHAKRABARTI, L. A.; MUESING, M. A. Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. **J. Biol Chem**, v. 277, n. 30, p. 27489-27493, 2002.

MUNTINGHE, F. L.; GROSS, S.; BAKKER, S. J.; LANDMAN, G. W.; VAN DER HARST, P.; et al. CCR5Delta32 genotype is associated with outcome in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 86, n. 2, p. 140-152, 2009.

NEIL, S. J., ZANG, T., BIENIASZ, P.D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 425-430, 2008.

NEWMAN, E. N.; HOLMES, R. K.; CRAIG, H. M.; KLEIN, K. C.; LINGAPPA, J. R.; MALIM, M. H.; SHEEHY, A. M. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. **Curr Biol**, v. 15, n. 2, p. 166-70, 2005.

NORRIS, P. J.; MOFFETT, H. F.; YANG, O. O.; KAUFMANN, D. E.; CLARK, M. J.; ADDO, M. M.; et al. Beyond help: direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4R T cells. **J Virol**, v. 78, n. 16, p. 8844-8851, 2004.

PALA, P.; SERWANGA, J.; WATERA, C.; RITCHIE, A. J.; MOODIE, Z.; WANG, M.; et al. Quantitative and qualitative differences in the T cell response to HIV in uninfected Ugandans exposed or unexposed to HIV-infected partners. **J Virol**, v.87, n. 16, p. 9053-9063, 2013.

PASSOS, G. A. Jr.; PICANCO, V. P. Frequency of the delta CCR5 deletion allele in the urban Brazilian population. **Immunol Lett**, v. 61, n. 2-3, p. 205-207, 1998.

PAULS, E.; RUIZ, A.; BADIA, R.; PERMANYER, M.; GUBERN, A.; RIVEIRA-MUÑOZ, E.; et al. Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells. **J Immunol**, v. 193, n. 4, p. 1988-1997, 2014.

PENG, C.; HO, B. K.; CHANG, T. W.; CHANG, N. T. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. **J Virol**, v. 63, n. 6, p. 2550-2556, 1989.

PÉREZ-OLMEDA, M.; ALCAMI, J. Determination of HIV tropism and its use in the clinical practice. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 11, n. 12 p. 1291-302, 2013.

PERTEL, T.; HAUSMANN, S.; MORGER, D.; ZÜGER, S.; GUERRA, J.; LASCANO, J.; et al. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 361-365, 2011.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PIACENTINI, L.; FENIZIA, C.; NADDEO, V.; CLERICI, M. Not just sheer luck! Immune correlates of protection against HIV-1 infection. **Vaccine**, v. 26, n. 24, p. 3002-3007, 2008.

PILOTTI, E.; ELVIRI, L.; VICENZI, E.; BERTAZZONI, U.; RE, M. C.; ALLIBARDI, S.; et al. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 1850-1856, 2007.

POMBO-SUAREZ, M.; CALAZA, M.; GOMEZ-REINO, J. J.; GONZALEZ, A. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. **BMC Mol Biol**, v. 9, n. 17, doi: 10.1186/1471-2199-9-17, 2008.

POVEDA, E.; PAREDES, R.; MORENO, S.; ALCAMÍ, J.; CÓRDOBA, J.; DELGADO, R.; et al. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists. **AIDS Rev**, v. 14, n. 3, p. 208-217, 2012.

PROMADEJ-LANIER, N.; HANSON, D. L.; SRINIVASAN, P.; LUO, W.; ADAMS, D. R.; GUENTHNER, P. C.; et al. Resistance to simian HIV infection is associated with high plasma interleukin-8, RANTES and eotaxin in a macaque model of repeated virus challenges. **J Acquir Immune Def Syndr**, v. 53, n. 5, p. 574-81, 2010.

RANKI, A.; MATTINEN, S.; YARCHOAN, R.; BRODER, S.; GHRAYEB, J.; LÄHDEVIRTA, J.; KROHN, K. T cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV exposed sexual partners. **AIDS**, v. 3, n. 2, p. 63-69, 1989.

RAPOSO, R. A.; ABDEL-MOHSEN, M.; HOLDITCH, S. J.; KUEBLER, P. J.; CHENG, R. G.; ERIKSSON, E. M. et al. Increased expression of intrinsic antiviral genes in HLA-B*57-positive individuals. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 5, p. 1051-1059, 2013.

REDDY, K.; WINKLER, C. A.; WERNER, L.; MLISANA, K.; ABDOOL KARIM, S. S.; NDUNG'U, T.; et al. APOBEC3G expression is dysregulated in primary HIV-1 infection and polymorphic variants influence CD4+ T-cell counts and plasma viral load. **AIDS**, v. 24, n. 2, p. 195-204, 2010.

REGOES, R. R.; BONHOEFFER, S. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 6, p. 269-277, 2005.

REICHE, E. M.; BONAMETTI, A. M.; WATANABE, M. A.; MORIMOTO, H. K.; MORIMOTO, A. A.; WIECHMANN, S. L.; et al. Sociodemographic and epidemiological characteristics associated with human immunodeficiency virus type I (HIV-1) infection in HIV-1-exposed but uninfected individuals, and in HIV-1-infected patients from a southern Brazilian population. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 239-246, 2005.

REICHE, E. M.; WATANABE, M. A.; BONAMETTI, A. M.; MORIMOTO, H. K.; MORIMOTO, A. A.; WIECHMANN, S. L.; et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF1) genetic polymorphism in a sample of

healthy individuals, seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and patients infected with HIV-1 from the Brazilian population. **Int J Immunogenet**, v. 33, n. 2, p. 127 – 133, 2006.

REICHE, E. M.; EHARA WATANABE, M. A.; BONAMETTI, A. M.; MORIMOTO, H. K.; AKIRA MORIMOTO, A.; WIECHMANN, S. L.; et al. Frequency of CCR5-Delta32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population. **Int J Mol Med**, v. 22, n. 5, p. 669 – 675, 2008.

RIVEIRA-MUÑOZ, E.; RUIZ, A.; PAULS, E.; PERMANYER, M.; BADIA, R.; MOTHE, B.; et al. Increased expression of SAMHD1 in a subset of HIV-1 elite controllers. **J Antimicrob Chemother**, pii: dku276, 2014.

ROBERTSON, D. L.; ANDERSON, J. P.; BRADAC, J. A.; CARR, J. K.; FOLEY, B.; FUNKHOUSER, R. K.; et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-56, 2000.

RODGER, A.; CAMBIANO, V.; BRUUN, T.; VERNAZZA, P.; COLLINS, S.; ESTRADA, V.; et al. HIV transmission risk through condomless sex if the HIV positive partner is on suppressive ART: PARTNER study. Presented data at CROI 2014 in Boston.

ROLD, C. J.; AIKEN, C. Proteasomal degradation of TRIM5alpha during retrovirus restriction. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 5, e1000074, 2008.

ROLLASON, R.; KOROLCHUK, V.; HAMILTON, C.; JEPSON, M.; BANTING, G. A CD317/tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. **J Cell Biol**, v. 184, n. 5, p. 721-736, 2009.

ROSA, E. A. Estudo de fatores solúveis potencialmente envolvidos na resistência ao HIV em parceiros soronegativos de casais HIV sorodiscordantes. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROSS, T. M.; CULLEN, B. R. The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction

with a CCR-5 tropic V3 loop. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 13, p. 7682-7686, 1998.

RUCKER, J.; SAMSON, M.; DORANZ, B. J.; LIBERT, F.; BERSON, J. F.; YI, Y.; et al. Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. **Cell**, v. 87, n. 3, p.437-446, 1996.

RUGELES, M. T.; VELILLA, P. A.; MONTOYA, C. J. Mechanisms of human natural resistance to HIV: A summary of ten years of research in the Colombian population. **Biomédica**, v. 31, n. 2, p. 269-280, 2011.

RYOO, J.; CHOI, J.; OH, C.; KIM, S.; SEO, M.; KIM, S. Y.; et al. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. **Nat Med**, v. 20, n. 8, p. 936-941, 2014.

SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B. J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER, C. M.; et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 722-725, 1996.

SCARLATTI, G., TRESOLDI, E., BJORNDAL, A., FREDRIKSSON, R., COLOGNESI, C., DENG, H.K., et al. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. **Nat Med**, v. 3, n. 11, p. 1259-1265, 1997.

SCHALLER, T.; GOUJON, C.; MALIM, M. H. AIDS/HIV. HIV Interplay with SAMHD1. **Science**, v. 335, n. 6074, p. 1313-1314, 2012.

SCOTT-ALGARA, D.; TRUONG, L. X.; VERSMISSE, P.; DAVID, A.; LUONG, T. T.; NGUYEN, N. V.; et al. Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 5663-5667, 2003.

SEIDEL, A., YE, Y.; DE ARMAS, L. R.; SOTO, M.; YAROSH, W.; MARCSISIN, R. A.; et al. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms. **PLoS One**, v.5, n. 3, p. 1-9, 2010.

SEWRAM, S.; SINGH, R.; KORMUTH, E.; WERNER, L.; MLISANA, K.; KARIM, S. S.; et al. Human TRIM5alpha expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. **J Infect Dis**, v. 199, n. 11, p. 1657-1663, 2009.

SHARMA, G.; KAUR, G.; MEHRA, N. Genetic correlates influencing immunopathogenesis of HIV infection. **Indian J Med Res**, v. 134, n. 6, p. 749-768, 2011.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, a006841, 2011.

SHEARER, G. M.; CLERICI, M. Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us? **Immunol Today**, v. 17, n. 1, p. 21-24, 1996.

SHEEHY, A. M.; GADDIS, N. C.; CHOI, J. D.; MALIM, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 646-650, 2002.

SHEEHY, A., GADDIS, N.; MALIM, M.H. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. **Nat Med**, v. 9, n. 11, p. 1404-1407, 2003.

SHIODA, T.; LEVY, J. A.; CHENG-MAYER, C. Macrophage and T-cell line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. **Nature**, v. 349, n. 6305, p. 167-169, 1991.

SILVA, M. L.; MELO, V. H.; ALEIXO, A. W.; ALEIXO, L. F.; PASCOAL-XAVIER, M. A.; SILVA, R. O.; et al. Social and immunological differences among uninfected Brazilians exposed or unexposed to human immunodeficiency virus-infected partners. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 775-781, 2014.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Mol Biol**, v. 7, p. 33, 2006.

SINGH, A.; COLLMAN, R. G. Heterogeneous spectrum of coreceptor usage among variants within a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 primary-isolate quasispecies. **J Virol**, v. 74, n. 21, p. 10229-10235, 2000.

SOOGOOR, M.; DAAR, E. S. Primary HIV-1 infection: Diagnosis, pathogenesis, and treatment. **Curr Infect Dis Rep**, v. 7, n. 2, p. 147-153, 2005.

SORIANO, A.; MARTÍNEZ, C.; GARCÍA, F.; PLANA, M.; PALOU, E.; LEJEUNE, M.; et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. **J Infect Dis**, v. 186, n. 7, p. 922–931, 2002.

SPEELMON, E. C.; LIVINGSTON-ROSANOFF, D.; LI, S. S.; VU, Q.; BUI, J.; GERAGHTY, D. E.; et al. Genetic association of the antiviral restriction factor trim5alpha with human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Virol**, v. 80, n. 5, p. 2463-2471, 2006.

STAPRANS, S. I.; FEINBERG, M. B. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 3, n. 4, Suppl:S5-32, 2004.

STEINAU, M.; RAJEEVAN, M. S.; UNGER, E. R. DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. **J Mol Diagn**, v. 8, n. 1, p. 113-118, 2006.

STREMLAU, M., OWENS, C. M.; PERRON, M. J.; KIESSLING, M.; AUTISSIER, P.; SODROSKI, J. The cytoplasmic body component TRIM5a restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. **Nature**, v. 427, n. 6977, p. 848–853, 2004.

STREMLAU, M.; PERRON, M.; LEE, M.; LI, Y.; SONG, B.; JAVANBAKHT, H.; et al. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5a restriction factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 14, p. 5514-5519, 2006.

SUN, L.; FINNEGAN, C. M.; KISH-CATALONE, T.; BLUMENTHAL, R.; GARZINO-DEMO, P.; LA TERRA MAGGIORE, G. M.; BERRONE, S.; et al. Human β --defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. **J Virol**, v.79, n. 22, p. 14318-14329, 2005.

SUY, A., CASTRO, P.; NOMDEDEU, M.; GARCÍA, F.; LÓPEZ, A.; FUMERO, E.; et al. Immunological Profile of heterosexual highly HIV exposed uninfected individuals: predominant role of CD4 and CD8 T-cell activation. **J Infect Dis**, v. 196, n. 8, p. 1191-1201, 2007.

- SWANSON, C. M.; PUFFER, B. A.; AHMAD, K. M.; DOMS, R. W.; MALIM, M. H. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. **EMBO J**, v. 23, n. 13, p. 2632-2640, 2004.
- TABLER, C. O.; LUCERA, M. B.; HAQQANI, A. A.; MCDONALD, D. J.; MIGUELES, S. A.; CONNORS, M.; TILTON, J. C. CD4+ memory stem cells are infected by HIV-1 in a manner regulated in part by SAMHD1 expression. **J Virol**, v. 88, n. 9, p. 4976-4986, 2014.
- TABORDA, N. A.; CATAÑO, J. C.; DELGADO, J. C.; RUGELES, M. T.; MONTOYA, C. J. HIGHER, S. L. P. I. Higher expression, lower immune activation, and increased frequency of immune cells in a cohort of colombian HIV-1 controllers. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.60, n. 1, p.12-19, 2012.
- TABORDA-VANEGAS, N.; ZAPATA, W.; RUGELE. M. T. Genetic and immunological factors involved in natural resistance to HIV-1 infection. **Open Virol J**, v. 5, p. 35-43, 2011.
- TAN, J.; WANG, X.; DEVADAS, K.; ZHAO, J.; ZHANG, P.; HEWLETT, I. Some mechanisms of FLIP expression in inhibition of HIV-1 replication in jurkat cells, CD4+ T cells and PBMCs. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 12, p. 2305-2313, 2013.
- TEBAS, P.; STEIN, D.; TANG, W. W.; FRANK, I.; WANG, S. Q.; LEE, G.; et al.
Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. **N Engl J Med**, v. 370, n. 10, p. 901-910, 2014.
- TOKAREV, A.; SKASKO, M.; FITZPATRICK, K.; GUATELLI, J.
Antiviral activity of the interferon-induced cellular protein BST-2/tetherin. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 12, p. 1197-1210, 2009.
- TOMARAS, G. D.; YATES, N. L.; LIU, P.; QIN, L.; FOU DA, G. G.; CHAVEZ, L. L.; DECAMP, A. C. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. **J Virol**, v. 82, n. 24, p. 12449-12463, 2008.
- TOMESCU, C.; ABDULHAQQ, S.; MONTANER, L.J. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human

immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). **Clin Exp Immunol**, v. 164, n. 2, p. 158-69, 2011.

TRABATTONI, D; BIASIN, M; CLERICI, M. Mucosal immunoglobulin A in HIV-exposed seronegative individuals. **AIDS**, n. 17, v. 26, p. 2247-2250, 2012.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v. 285, n. 1, p. 1-32, 1999.

UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS) and WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The GAP Report – Unaided - 2014**. Disponível em http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2014/UNAIDS_Gap_report_en.pdf. Acesso em agosto de 2014.

VAN DAMME, N.; GOFF, D.; KATSURA, C.; JORGENSON, R. L.; MITCHELL, R.; JOHNSON, M. C.; et al. The interferon-induced protein BST-2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by HIV-1 Vpu. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 4, p. 245-252, 2008.

VANDEGRAAFF, N.; ENGELMAN, A. Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. **Expert Rev Mol Med**, v. 9, n. 6, p. 1-19, 2007.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. 0034.1-0034.11, 2002.

VÁZQUEZ-PÉREZ, J. A.; ORMSBY, C. E.; HERNÁNDEZ-JUAN, R.; TORRES, K. J.; REYES-TERÁN, G. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. **Retrovirology**, v. 6, n. 23, p. 1-8, 2009.

VELILLA, P. A.; HOYOS, A.; ROJAS, M.; PATIÑO, P. J.; VÉLEZ, L. A.; RUGELES, M. T. Apoptosis as a mechanism of natural resistance to HIV-1 infection in an exposed but uninfected population. **J Clin Virol**, v. 32, n. 4, p. 329-335, 2005.

VICENZI, E.; POLI, G. Novel factors interfering with human immunodeficiency virus-type 1 replication in vivo and in vitro. **Tissue Antigens**, v. 81, n. 2, p. 61–71, 2013.

ZHOU, T. B.; JIANG, Z. P.; ZHOU, J. F.; SU, N. Relationship between chemokine receptor 5 $\Delta 32/W$ gene polymorphism and lupus nephritis. **Hum Immunol**, v. 75, n. 9, p. 968-972, 2014.

ZIELSKE, S. P.; STEVENSON, M. Modest but reproducible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages following LEDGFp75 silencing. **J Virol**, v. 80, n. 14, p. 7275-7280, 2006.

YAP, M. W.; NISOLE, S.; STOYE, J. P. A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction. **Curr Biol**, v. 15, n. 1, p.73-78, 2005.

YILMAZ, A.; ALAGOZLU, H.; OZDEMIR, O.; ARICI, S. Effects of the chemokine receptor 5 (CCR5)-delta32 mutation on hepatitis c virus-specific immune responses and liver tissue pathology in HCV infected patients. **Hepat Mon**, v. 14, n. 7, e11283, 2014.

YU, Q.; KÖNIG, R.; PILLAI, S.; CHILES, K.; KEARNEY, M.; PALMER, S.; et al. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. **Nat Struct Mol Biol**, v. 11, p. 435-442, n. 5, 2004.

YUE, F. Y.; KOVACS, C. M.; DIMAYUGA, R. C.; GU, X. X.; PARKS, P.; KAUL, R.; OSTROWSKI, M. A. Preferential apoptosis of HIV-1-specific CD4+ T cells. **J Immunol**, v. 174, n. 4, p. 2196-2204, 2005.

WANG, X.; ZHAO, J.; TANG, S.; LEE, S.; GLAZER, R. I.; HEWLETT, I. c-FLIPL regulates PKC via AP-2 to inhibit Bax-mediated apoptosis induced by HIV-1 gp120 in Jurkat cells. **Mol Cell Biochem**, v. 330, n. 1-2, p. 23-29, 2009.

WANG, X.; RAGUPATHY, V.; ZHAO, J.; HEWLETT, I. Molecules from apoptotic pathways modulate HIV-1 replication in Jurkat cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 414, n. 1, p. 20-24, 2011.

WATTS, J. M.; DANG, K. K.; GORELICK, R. J.; LEONARD, C. W.; BESS JR, J. W.; SWANSTROM, R.; BURCH, C. L.; WEEKS, K. M.

Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. **Nature**, v. 460, p. 711-716, 2009.

WOLF, D.; GOFF, S. P. Host restriction factors blocking retroviral replication. **Annu Rev Genet**, v. 42, p. 143-163, 2008.

WONG-STAAAL, F. The AIDS Virus. What We Know and What We Can Do About It. **West J Med**, v. 155, n. 5, p.481-487, 1991.