NANCY ALVES DE LIMA GOUVEA

Estudo da associação do HLA-B*57 com o controle da viremia em coorte de indivíduos recém infectados pelo HIV-1

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof.Dr. Esper Georges Kallás

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gouvea, Nancy Alves de Lima
Estudo da associação do HLA-B*57 com o controle da viremia em coorte de indivíduos recém-infectados pelo HIV-1 / Nancy Alves de Lima Gouvea. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.HIV-1 2.HLA-B57 3.Carga viral 4.Linfócitos 5.CD4 6.Linfócitos T 7.Progressão da doença

USP/FM/DBD-154/11

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Histocompatibilidade do INCOR, Laboratório de Biologia Molecular do ICHC, Laboratório de Investigação Médica 60 e contou com o Apoio Financeiro da Capes-CNPq e Fundação de Amparo a Pesquisa-FAPESP.

DEDICATÓRIA

A Deus senhor da minha vida, toda honra, toda glória e todo louvor.

A minha mãe (em memória), exemplo de perseverança, humildade, luta e vontade para vencer os obstáculos, mesmo nos últimos momentos da sua vida.

Aos pacientes e voluntários que colaboraram com o único propósito de um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Esper Georges Kallás, por seu apoio e orientação segura, pelas sugestões e pela sua grande experiência na área, os quais foram fundamentais na realização deste trabalho.

Ao meu esposo Celso, que abdicou dos momentos em família me incentivando nesta caminhada, com amor, companheirismo, apoio e compreensão, para juntos concretizarmos este sonho.

Ao Dr. Ricardo Sobhie Diaz, pelas sugestões e contribuições para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Israel Bendit pelo incentivo, apoio e compreensão.

À Maria Izabel Motta Romano pela amizade e ajuda no levantamento bibliográfico.

À Lucélia Marques Santos pela amizade e colaboração no levantamento dos haplótipos encontrados.

À Dra. Maria Elisa Hue Moraes, pelos primeiros ensinamentos na área de Histocompatibilidade.

À Dra. Mariana Sauer, pelo recrutamento dos pacientes.

Ao Rogério Ruscitto do Prado, pela ajuda na análise estatística.

À Márcia Arruda, pela revisão bibliográfica.

Ao. Hélcio Rodrigues, do Laboratório de Histocompatibilidade do INCOR pela receptividade em seu laboratório.

Ao Isler Silva pela constante ajuda nas questões administrativas.

À Helena Tomiyama, Priscila Ramos Costa e Cláudia Tomiyama pela ajuda na realização deste estudo.

Aos colegas Elkin Hernán Bermudez Aza, Maria Teresa Maidana Giret e Leandro Tarosso pelo coleguismo e apoio.

À empresa Biometrix pela doação de kits HLA-B, de alta definição.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências:
Adaptado de *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Carneiro da Cunha, A. *et al.* 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos:
List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS ..... **XII**
LISTA DE FIGURAS ..... **XIV**
LISTA DE TABELAS ..... **XVI**
LISTA DE QUADROS ..... **XVII**
RESUMO ..... **XVIII**
ABSTRACT ..... **XX**
1. INTRODUÇÃO **2**
1.1 Estrutura do HIV-1 2
1.2 Organização genética do HIV-1 3
1.3 Ciclo replicativo do HIV-1 5
1.4 Sistema MHC 7
1.4.1 Histórico do Sistema HLA 8
1.4.2 Estrutura e função do Sistema HLA 9
1.4.3 Polimorfismo genético do Sistema HLA 14
1.4.4 Nomenclatura do Sistema HLA 16
1.4.5 Determinantes HLA públicos e privados 18
1.4.6 Técnicas de identificação do Sistema HLA 19
1.4.7 Estudos populacionais do Sistema HLA 20
1.4.8 HLA como fator de suscetibilidade e resistência a doenças 22
1.4.9 Associação do Sistema HLA com HIV-1 24
1.5 Relação do HLA-B57 e reação adversa ao Abacavir 27
1.6 Papel dos linfócitos T CD8+ 28
1.7 HLA-B57 e progressão para AIDS 31
2. JUSTIFICATIVA **33**
3. OBJETIVOS **35**
3.1 Objetivo geral 35
3.2 Objetivos específicos 35
3.2.1 Sub-objetivo A 35

3.2.2 Sub-objetivo B 35
4- MATERIAIS E MÉTODOS 37
4.1 Caracterização da amostra populacional 37
4.1.1 Coorte de indivíduos recém-infectados pelo HIV-1 37
4.1.2 Critérios de inclusão e exclusão do estudo 38
4.1.3 Avaliação inicial dos pacientes 39
4.2 Contagem de linfócitosTCD4+ e TCD8+ 40
4.3 Quantificação da carga viral 41
4.4 Técnica de extração do DNA genômico 41
4.5 Técnica de tipificação dos alelos HLA 42
4.5.1 Tipificação do alelo HLA pelo método PCR-SSP 42
4.5.2 Tipificação do alelo HLA pelo metódo PCR-SSO Luminex 44
4.5.3 Tipificação de alta definição dos alelos HLA-B*57 pelo método PCR-SSO Luminex 48
4.6 Análise Estatística 48
5. RESULTADOS 50
5.1 Características dos participantes da coorte 50
5.2 Avaliação laboratorial dos participantes recém infectados pelo HIV-1 51
5.3 Tipificação dos alelos HLA 51
5.3.1 Demonstração da frequência dos alelos HLA-A, B e C na coorte estudada 56
5.4 Correlação entre as variáveis laboratoriais CD4+, CD8+ e Carga Viral e os alelos HLA classe I Locus A, B e C 58
5.5 Comparação da contagem de linfócitos T CD4+ entre os indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 62
5.6 Comparação da contagem de linfócitos T CD8+ entre os indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 64
5.7 Comparação do nível da carga viral entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 66
5.8 Parâmetros laboratoriais de 15 indivíduos com alelo

HLA-B*57 68
5.8.1 Seguimento dos parâmetros laboratoriais dos grupos A e B 70
5.9 Comparação entre os alelos HLA-B*27, HLA-B*51 e HLA-B*58 72
5.9.1 Comparação entre os alelos HLA-B*27,HLA-B*51 e HLA-B*58 em relação á carga viral basal 72
5.10 Tipificação de alta definição do alelo HLA- B*57 73
5.11 Análise de fatores aditivos 74
5.11.1 Análise da expressão do alelo HLA-B*35 74
5.11.2 Comparação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos 75
5.11.3 Análise da influência do receptor CCR5 75
6. DISCUSSÃO 78
7. CONCLUSÕES 90
8. ANEXOS 92
Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética do HC-FMUSP (CAPPESQ) 92
Anexo II. Poster: Distribution of HLA Class I alleles and CCR5 genotypes in Brazilian HIV-1 infected children 93
Anexo III. Artigo Científico: Acute HIV infection with rapid progression to AIDS 94
Anexo IV. Artigo Científico: HLA* B57 and recent HIV infection: laboratory characteristics and impacto n viral control 97
Anexo V. Aceite para publicação de artigo científico 119
9. REFERÊNCIAS 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC	abacavir
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APC	aloficocianina
APCs	células apresentadora de antígenos
CCR5	cysteine-cysteine chemokine receptor 5
CCR5Δ32	cysteine-cysteine chemokine receptor 5 delta 32
CD	cluster of differentiation
CEs	controladores de elite
CHP	complexo histocompatibilidade principal
CLIP	Corticotropin Like Intermediate Peptide
CREGS	Cross reactive groups
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme linked immuno sensitive assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
gp	glicoproteina
HIV-1	human immunodeficiency vírus
HLA	human leukocyte antigen
IN	integrase
LTNP	*long term non progressors*
LTR	Long terminal repeat
MACs	Multicenter AIDS Cohort Study
MHC	major histocompatibility complex
NC	nucleocapsídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	proteína
pb	pares de base
PE	phycoerytrin
Percp	peridin chlorophil protein
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell

PCR	polymerase chain reaction
PR	protease
RNA	ribonucleic acido
rpm	rotações por minuto
RT	Reverse Transcriptase
SAPE	estreptavidina conjugada com ficoeritrina
SIV	simian immunodeficiency vírus
SSP	sequence-specific primers
SSOP	*sequence specific oligonucleotide probes*
STARHS	*serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus seroconversion*
TAP	transporter antigen processing
Taq	termus aquaticus
Tat	transativador transcricional do HIV-1
TCR	T cell receptor
TNF	fator de necrose tumoral
V3	3 região hipervariável 3 da proteína de superfície do HIV
WSIH	*Workshops* Internacionais de Histocompatibilidade
µL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura simplificada do HIV-1 3

Figura 2 - Estrutura genética do HIV-1 5

Figura 3 - Esquema simplificado do ciclo de vida do HIV-1 7

Figura 4 - Estrutura da molécula MHC classe I 10

Figura 5 - Estrutura da molécula MHC classe II 11

Figura 6 - Mapa do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) 12

Figura 7 - Processamento de antígenos via MHC classe I.e classe II 13

Figura 8 - Nomenclatura HLA 18

Figura 9 - Algoritmo de fluxo para captação de voluntários para coorte 38

Figura 10A - Frequência dos grupos alélicos do gene HLA-A 57

Figura 10B - Frequência dos grupos alélicos do gene HLA-B 57

Figura 10C - Frequência dos grupos alélicos do gene HLA-C 57

Figura 11 - Análise comparativa entre os alelos HLA classe I, locus A com as variáveis laboratoriais 59

Figura 12 - Análise comparativa entre os alelos HLA classe I, locus B com as variáveis laboratoriais 60

Figura 13 - Análise comparativa entre os alelos HLA classe I, locus C com as variáveis laboratoriais 61

Figura 14 - Comparação da contagem de linfócitos TCD4+ entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 63

Figura 15 - Comparação da contagem de linfócitos TCD8+ entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 65

Figura 16 - Comparação dos níveis da carga viral entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 67

Figura 17 - Comparação entre as variáveis laboratoriais nos grupos A e B que expressam o HLA-B*57 70

Figura 18 - Curva de seguimento dos parâmetros laboratoriais da coorte estudada 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças associadas ao Sistema HLA 23

Tabela 2 - Características dos 228 indivíduos a entrada no estudo 50

Tabela 3 - Achados laboratoriais 51

Tabela 4 - Tipificação dos alelos HLA da coorte de pacientes recém infectados pelo HIV-1 52

Tabela 5 - Comparação da contagem de linfócitos TCD4+ entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 63

Tabela 6 - Comparação da contagem de linfócitos TCD8+ entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 65

Tabela 7 - Comparação dos níveis da carga viral entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57 67

Tabela 8 - Parâmetros laboratoriais de 15 indivíduos com alelo HLA-B*57 69

Tabela 9 - Descrição da carga viral relacionado com presença dos alelos HLA-B*27, HLA-B*51, HLA-B*57 e HLA-B*58 73

Tabela 10 - Comparação dos subtipo de HLA-B*57 74

Tabela 11 - Descrição dos níveis de carga viral em indivíduos que expressam o alelo HLA-B*35 75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Programa da PCR-SSP 43

Quadro 2 - Protocolo de amplificação PCR-SSO 46

Quadro 3 - Programa da amplificação PCR-SSO 46

Quadro 4 - Protocolo de hibridização (cálculo para o preparo das micro esferas) 47

Quadro 5 - Protocolo de hibridização (cálculo para o preparo do substrato-SAPE) 47

RESUMO

Gouvea NAL. Estudo da associação do HLA-B*57 com o controle da viremia em coorte de indivíduos recém infectados pelo HIV-1 (Tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011

INTRODUÇÃO: Após a infecção aguda pelo HIV-1, um grupo privilegiado de pessoas consegue controlar a replicação viral sem o uso de antirretrovirais para níveis de viremia abaixo dos limites de detecção pelos testes disponíveis. Alguns alelos HLA estão associados à menor replicação viral durante a infecção recente e menor progressão para doença causada pelo HIV-1, sendo o HLA-B*57 o que está mais associado a esse efeito protetor. OBJETIVO: O objetivo deste trabalho foi confirmar a associação do HLA-B*57 com o melhor controle da viremia em indivíduos com infecção recente pelo HIV-1. MÉTODOS: Foram analisadas amostras de 228 indivíduos de uma coorte prospectiva em acompanhamento na cidade de São Paulo, identificados com infecção recente pelo HIV-1, pelo algoritmo STARHS (*serologic testing algorithm for recent human HIV seroconversion*). Foram realizadas a contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+, carga viral do HIV-1 e tipificação dos alelos HLA. RESULTADOS: Dos 208 indivíduos analisados para o locus B, 15 indivíduos (7,2%) expressam o alelo HLA-B*57. O alelo HLA-B*57 foi fortemente correlacionado com os indivíduos que apresentam parâmetros laboratoriais favoráveis. A presença do HLA-B*57 foi associada com maior contagem de linfócitos T CD4+ basal (p=0, 043) e menor carga viral basal (p=0, 001). Dos 15 indivíduos que expressam o HLA-B*57, oito (53,3%) apresentaram-se com a viremia menor que 400 cópias/ml na visita inicial (Grupo A) e sete (46,6%) apresentaram-se com viremia maior que 400 cópias/mL, todos eles na ausência de terapia antirretroviral. A contagem de linfócitos T CD4+, entretanto, não foi diferente entre os dois grupos. CONCLUSÃO: Concluindo, este estudo indica que indivíduos que expressam o alelo HLA-B*57, apresentam melhor resposta imunológica na infecção recente demonstrada por melhor padrão laboratorial na contagem de linfócitos T CD4+, mas que perfis diferentes de controle podem existir nesses indivíduos. A diferença entre o comportamento da viremia nestes

dois grupos pode auxiliar no entendimento da fisiopatogênese da infecção pelo HIV-1.

Descritores: HIV-1; HLA-B57; Carga viral; Linfócitos; CD4; Linfócito T; Progressão.

.

ABSTRACT

Gouvea NAL Association between HLA-B*57 and viremia control in recently HIV-1-infected subjects (Dissertation). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011

INTRODUCTION: After HIV-1 infection, a privileged group of subjects control viral replication to low levels, without the use of antiretroviral drugs. Some HLA alleles are associated with this control and to slower progression to immunodeficiency, especially the HLA-B*57. AIM: The aim of this study was to confirm the association of HLA-B*57 with viral control in recently HIV-1-infected subjects. MATERIALS: A cohort of recently HIV-1-infected 228 subjects, prospectively followed in the City of São Paulo, were identified using STARHS (*serologic testing algorithm for recent human HIV seroconversion*). CD4+, CD8+ T cell counts, viral loads, and HLA typing were performed in the participants' samples. RESULTS: HLA typing was performed in 208 out of 228 subjects. Of those, 15 (7.2%) were HLA-B*57. This genotype was strongly correlated with favorable laboratory outcomes. HLA-B*57 subjects presented higher CD4+ T cell counts (p=0.043) and lower viral loads at the baseline visit (p=0.001). Eight (53.3%) out of 15 HLA-B*57 subjects presented undetectable viral load at the baseline visit (Group A) and seven (46.6%)had detectable viremia (Group B). However, the CD4+ T cell counts were not different between the two groups. CONCLUSION: In conclusion, this study points to the protective association of HLA-B*57 allele with better laboratory outcomes in HIV-1 infection, demonstrated by better CD4+ T cell counts and lower viral loads. Nevertheless, different profiles may exist within this group of subjects. The diverse viral control in such subjects may help better understand the pathogenesis of HIV-1 infection.

Descriptors: HIV-1; HLA-B57; Viral load; Lymphocyte; CD4; T lymphocyte; Progression.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), acredita-se que entre 33 e 46 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo (1). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, o número de indivíduos infectados pelo HIV é estimado em cerca de 600.000 (2).

É fundamental conhecer com profundidade os mecanismos que permeiam a relação hospedeiro-parasita na infecção para traçar estratégias de combate ao HIV. Além de conhecer a estrutura do vírus, sua organização genética e seu ciclo replicativo, é importante identificar como o sistema imune do hospedeiro tenta controlar a replicação viral. Em especial, é fundamental entender como diferentes alelos HLA (antígenos leucocitários humanos do inglês human leukocyte antigen) podem influenciar a resposta imune contra o parasita. Assim, será possível aprimorar estratégias de tratamento e prevenção, incluindo eventual vacina preventiva ou terapêutica.

1.1. Estrutura do HIV-1

O HIV-1 foi isolado do sangue de vários pacientes com diversas formas evolutivas da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), bem como de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos antes de desenvolver imunodeficiência. A associação com a AIDS e doenças relacionadas foi comprovada de forma irrefutável (3,4). O HIV-1 é classificado de acordo com sua morfologia, organização genética e caráter patogênico como pertencente à família *Retroviridae,* subfamília *Lentiviridae* (5). É um vírus envelopado como os demais retrovírus, e possui uma membrana lipídica originária da membrana externa da célula hospedeira, contendo 72 capsômeros formados por trímeros

ou tetrâmeros de glicoproteínas (gp) do envelope. O envelope é formado pelas gp120 e gp41, ambas derivadas da glicoproteína precursora gp160 (6-11). A gp120 é uma glicoproteína de superfície e a gp41 é uma proteína transmembrânica, responsáveis pela ligação do vírus na célula hospedeira através da molécula CD4 e outros co-receptores, presentes na membrana celular dos linfócitos T auxiliares e macrófagos (12) (Figura 1).

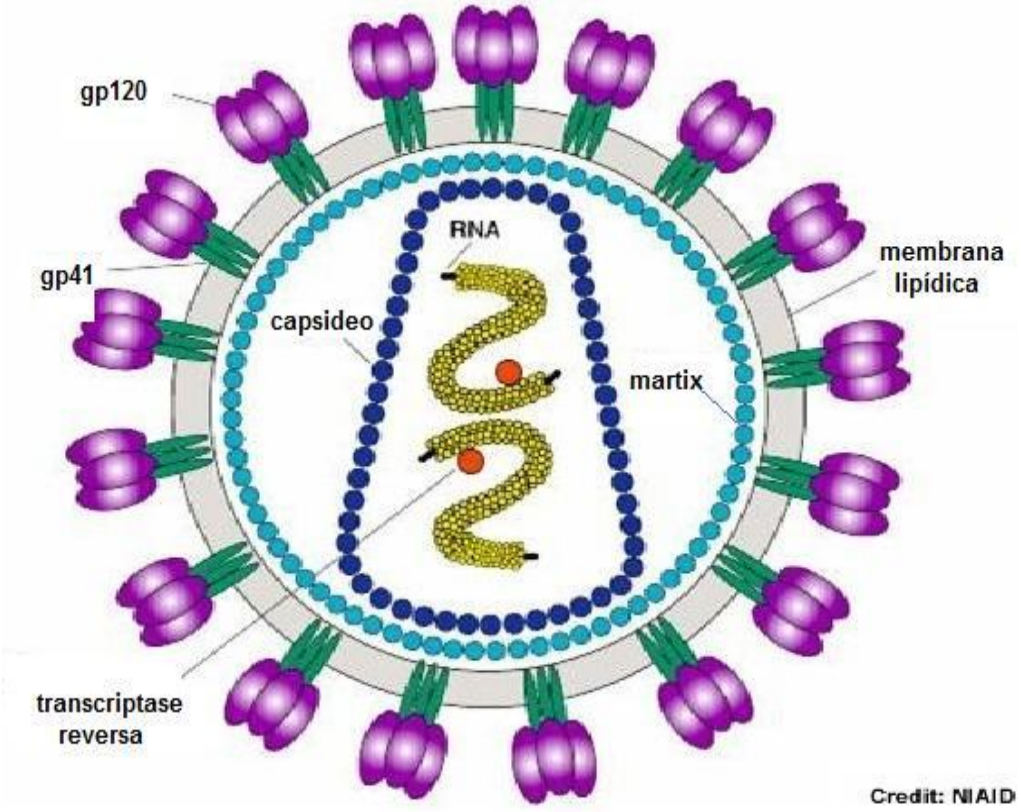


Figura 1. Estrutura simplificada do HIV-1, adaptada (168).

1.2. Organização genética do HIV-1.

As proteínas estruturais do HIV são codificadas pelos genes estruturais (*gag, pol* e *env)* e os genes acessórios (*tat, rev, nef, vpu, vpx* e *vif*).

O gene *gag* codifica a proteína p55 precursora da proteína que forma o capsídeo viral p24, a proteína (p) de matriz p17 e outras que compõem o nucleocapsídeo viral p6/p9 (13). Uma vez no sítio de formação da partícula viral, o precursor *gag* facilita o empacotamento de outros componentes virais. O precursor *gag* tem a habilidade de se associar com outras poliproteínas, bem como com gag/pol via ligações não covalentes, pré-requisito para formação do vírion e é responsável pelo empacotamento do RNA genômico viral através da parte do Núcleo Capsídeo (NC) da poliproteína que interage com o final 5' do genoma viral, onde está localizado o sinal de empacotamento do ácido nucléico.

A proteína precursora codificada pelo gene *pol* é clivada em produtos que irão constituir as enzimas virais; transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR). A transcriptase reversa é uma enzima capaz de copiar o ácido ribonucléico (RNA) viral em uma dupla fita de ácido desoxiribonucléico (DNA), além de ter atividade de RNAse H necessária no processo da síntese do DNA proviral. A integrase insere a cópia do DNA proviral no genoma da célula hospedeira, formando o provírus. A protease catalisa a formação da estrutura de um novo vírus clivando a poliproteína formada no final do processo. (14,15).

O gene *env* codifica a gp do envelope, gp160 que é composta da gp120 e gp41 (16). Dentre os genes acessórios estão:

O gene *tat* que codifica a primeira proteína de regulação. Tat é um transativador viral potente, essencial para a replicação viral *in vitro* e *in vivo* (17). O gene *rev* codifica a proteína de regulação denominada Rev, essencial para replicação viral. Essa proteína atua após a transcrição. Promove o transporte das moléculas de RNAm do núcleo para o citoplasma. Atua na tradução no citoplasma e na razão entre o RNAm processado e não processado, através da ligação nas poliproteínas transcritas (18,19). O gene *nef* codifica a proteína citoplasmática Nef, que se liga à superfície interna da membrana plasmática. Esta proteína não é essencial para a replicação viral. Nef reduz o nível da expressão do receptor CD4 na superfície das células, inibindo a re-infecção das células e facilitando a disseminação do vírus (20).

Outros dados sugerem que a *nef* possa aumentar a atividade de fatores de transcrição, como NF-κB, facilitando a replicação do vírus diretamente, através do *Long Terminal Repeat* (LTR) (21,22). Foi demonstrado que o vírus com o gene *nef* deletado é menos virulento (23).

Os genes de expressão tardia *vif* e *vpu* dão origem a duas proteínas, com os mesmos nomes. Vif facilita a transmissão do HIV, aumentando a infectividade das partículas de 100 a 1000 vezes, mas não é absolutamente essencial para a replicação viral. Vpu aumenta a taxa de liberação do vírus da célula infectada, facilitando a maturação e montagem do vírus. Vpu não está presente no HIV-2 e no SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia) (22) (Figura 2).

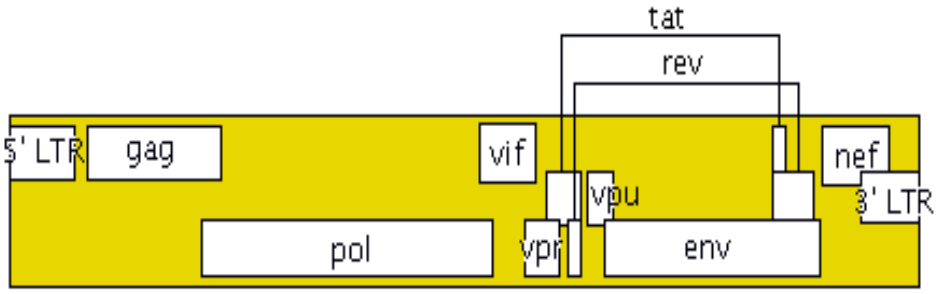


Figura 2. Estrutura genética do HIV-1, adaptada (169).

1.3. Ciclo replicativo do HIV-1

Os retrovírus são vírus RNA que, através da enzima DNA polimerase são capazes de copiar seu genoma RNA em uma fita dupla de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira (24,25).

O HIV inicia o processo de infecção através da interação com os receptores CD4 (grupo de diferenciação) presentes na superfície de

macrófagos, monócitos, células da microglia, células dendríticas e especialmente linfócitos, e também com co-receptores como CCR5 (receptor de quimiocina). Tal ligação induz mudanças que expõem a região V3, resultando na exposição da gp41 que possui o peptídeo de fusão responsável pela interação entre o envelope viral e a membrana celular (26). Após a fusão, o material genético do HIV é liberado no interior celular prosseguindo com a transcrição reversa, que é a síntese de uma fita de DNA, usando o RNA como molde, e catalisado pela enzima transcriptase reversa. Em seguida, o DNA é transportado e integrado ao núcleo da célula hospedeira, pela ação da enzima integrase, e passa ser denominado pró-virus. Esse pró-vírus pode permanecer na forma latente por muitos anos bem como dar continuidade ao ciclo de replicação (27).

Uma ativação das células hospedeiras resulta na transcrição do DNA viral em RNA mensageiro, o qual é traduzido em proteínas virais que darão origem a novas partículas virais. Entre essas proteínas está a protease necessária para processar outras proteínas em suas formas funcionais. Uma vez produzidas, vão regular a síntese de novos genomas virais e formar a estrutura externa de outros vírus que são liberados pela célula hospedeira (27).

O vírion recém-formado é liberado para o meio circulante da célula hospedeira, podendo permanecer no fluído extracelular ou infectar novas células. (Figura 3).

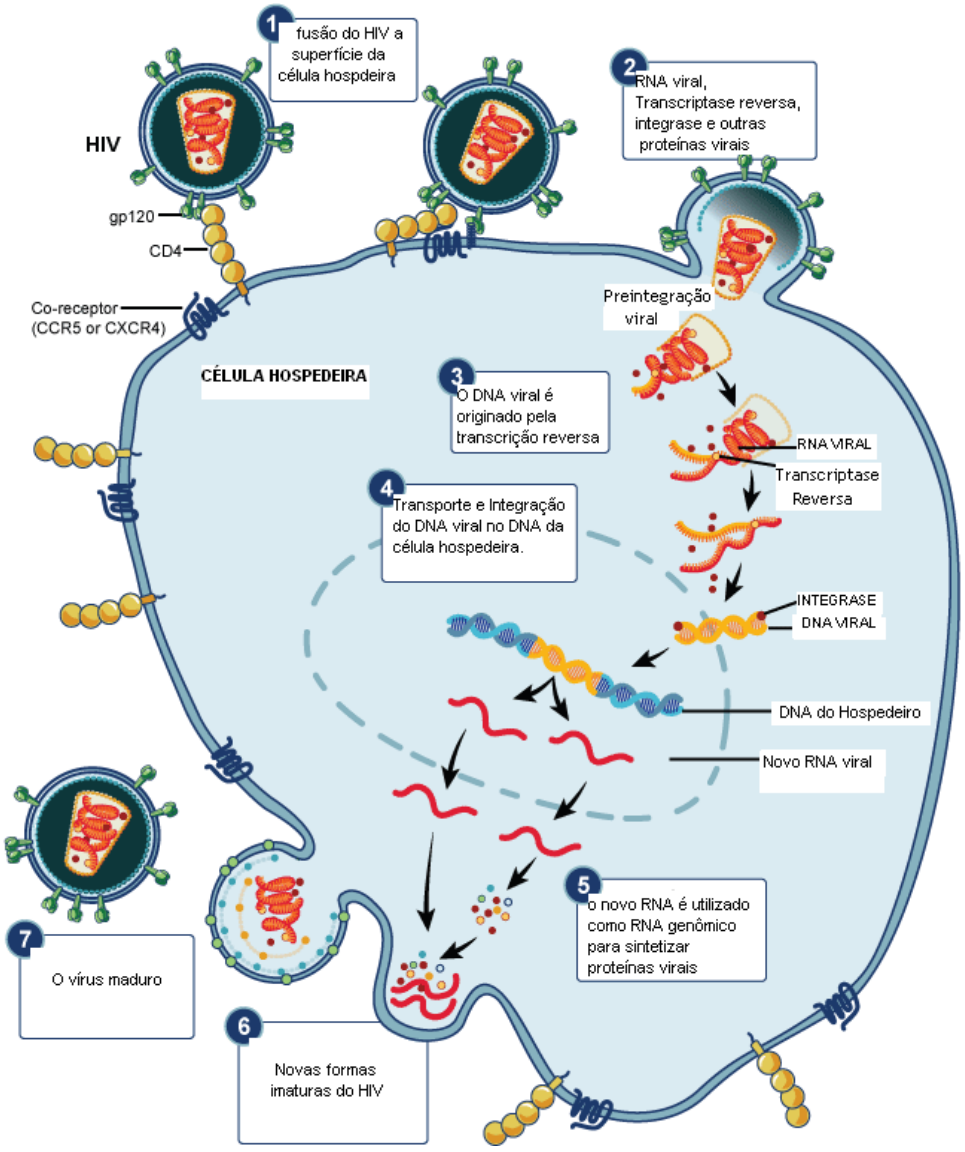


Figura 3. Esquema simplificado do ciclo de vida do HIV-1, adaptada (170).

1.4. Sistema MHC

O complexo de histocompatibilidade principal (CHP) do inglês Major Histocompatibility Complex (MHC) compreende genes que codificam glicoproteínas de membrana que se ligam e atuam como receptores especializados para peptídeos antigênicos; os Antígenos Leucocitários Humanos, do inglês *Human Leukocyte Antigen* (HLA) (28).

1.4.1. Histórico do sistema HLA

Em humanos, o sistema HLA foi descoberto em 1958 quando Jean Dausset descreveu a capacidade do soro de pessoas submetidas a transfusões sanguíneas aglutinar leucócitos de outros indivíduos, descrevendo assim a primeira molécula HLA, denominada MAC, hoje HLA-A02 (29). Este trabalho foi um marco após período de 30 anos de pesquisas na tentativa de elucidar as bases biológicas da transplantação de órgãos e tecidos em animais e humanos (30). Destacamos o trabalho de Peter Gorer e colaboradores, em 1937, que aplicaram as técnicas de genética clássica para análise da rejeição de tumores e de tecidos normais transplantados em camundongos (31,32) que culminou com a descrição do complexo Principal de histocompatibilidade murino, o sistema H-2 por Snell em 1948 (32,33).

Em 1963, Jon Van Rood e Van Leeuwen publicaram a descoberta da existência do primeiro *locus* do sistema de antígenos leucocitários humanos, a que deram o nome de FOUR,hoje HLA-B (34,35). Com o advento da técnica de cultura mista, vários estudos levaram na década de 70 a descoberta de novos genes chamados de HLA-DR (36,37). Mais tarde, surgiram evidências de novos sistemas antigênicos análogos, intimamente associados ao HLA-DR (38,39).O esclarecimento destes, ocorreu no início dos anos 80 com os trabalhos de biologia molecular isolando e caracterizando os genes HLA classe II (40). Essas investigações levaram ao reconhecimento, em 1983, dos genes que codificavam os isotipos HLA da Classe II: HLA-DR e posteriormente HLA-DQ e DP. Hoje já se conhece em detalhe a estrutura e função dos genes classe I e II do sistema HLA (41).

1.4.2. Estrutura e Função do Sistema HLA

Em 1974, a região do MHC, que codifica o sistema HLA foi localizada no braço curto do cromossomo 6 por Lamm et al. a partir de estudos familiares e de análise genética com células somáticas híbridas.(42). Existem duas classes de moléculas MHC: MHC classe I que codifica os antígenos HLA classe I (*locus* A, B e C) e MHC classe II que codifica os antígenos HLA classe II (DR, DQ e DP), classes que se diferem em estrutura e função. A estrutura das moléculas do sistema HLA de classe I consiste em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, a cadeia α (ou cadeia pesada) de 44 a 47 kD e a cadeia β_2-microglobulina, uma subunidade de 12 kD não codificada pelo MHC. Cada cadeia α está orientada de tal forma que três quartos de todo o polipeptídeo se estende para o meio extracelular, um pequeno segmento hidrofóbico atravessa a membrana celular e os resíduos da região carboxiterminal estão localizados no citoplasma. Os segmentos aminoterminais α1 e α2 interagem para formar uma plataforma de oito fitas em estrutura β-pregueada nas quais se apóiam duas α-hélices paralelas. Esta estrutura forma a fenda de ligação de peptídeos nas moléculas de classe I, sendo a região onde se concentra o polimorfismo da molécula devido às substituições nucleotídicas nos *exons* 2 e 3 (43). (Figura 4).

Os genes que codificam a cadeia pesada das moléculas HLA de classe I apresentam uma estrutura característica, na qual *exons* separados são responsáveis por codificar cada um dos domínios do polipeptídio. O peptídeo líder é codificado pelo *exon* 1, os domínios extracelulares α1, α2 e α3, são codificados pelos *exons* 2 (343 pares de base (pb), 3 (274 pb) e 4 (276), respectivamente; o segmento transmembrana pelo exon 5 e a cauda citoplasmática pelos *exons* 6 e 7. A região 3' não traduzida faz parte do *exon* 8. A sequência total dos *exons* 1 a 8 consiste em 1089-1101 nucleotídeos, e codificam para um polipeptídio de 362-366 aminoácidos (44).

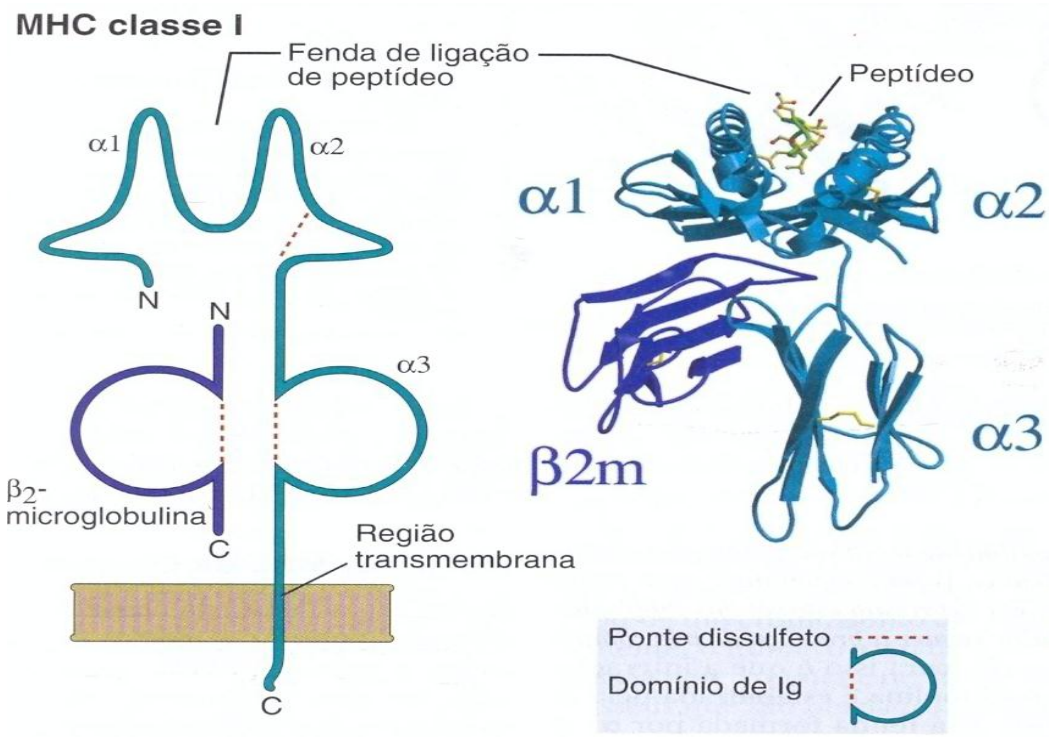


Figura 4: Estrutura da molécula MHC da classe I, adaptada (43).

O diagrama acima ilustra as diversas regiões da molécula MHC (não está desenhado em escala). As moléculas da classe I são compostas de uma cadeia α polimórfica ligada de forma não-covalente à β2-microglobulina. A cadeia α é glicosilada; os resíduos de carboidratos não são exibidos. O diagrama em formato de fita (à direita) mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-B27 ligada a um peptídeo, mostrado pela cristalografia de raios x (43).

As moléculas MHC da classe II são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente, uma cadeia α com 32 a 34 kD e uma cadeia β de 29 a 32 kD. Ao contrário das moléculas da classe I, ambas as cadeias das moléculas da classe II são codificadas por genes MHC polimórficos, (Figura 5).

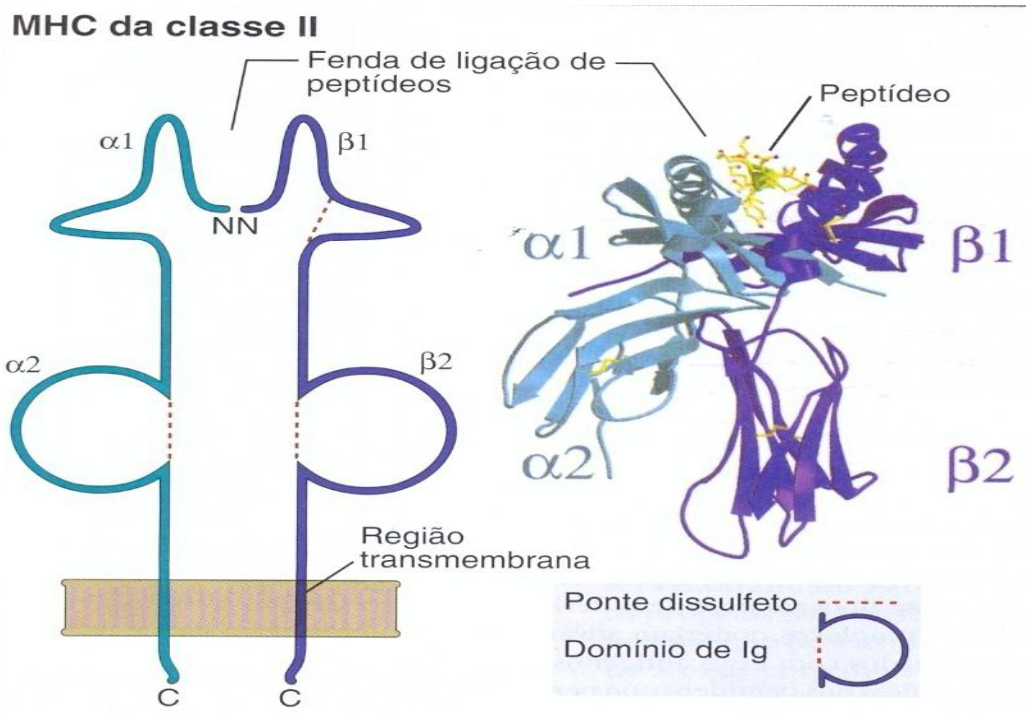


Figura 5: Estrutura da molécula MHC da classe II, adaptada(43)

O diagrama ilustra as diferentes regiões da molécula MHC (não está desenhada em escala). As moléculas da classe II são compostas por uma cadeia α polimórfica ligada de forma não- covalente a uma cadeia β polimórfica. As duas cadeias são glicosiladas; os resíduos de carboidratos não estão representados. O diagrama em forma de fita (à direita) mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-DR1 com um peptídeo a ela ligado, conforme foi demonstrado pela cristalografia por raios X (43).

Entre os *loci* de classe I no lado telomérico e os *loci* de classe II no sítio centromérico do complexo HLA, existe uma ilha de cromatina não relacionada, que é ocupada por genes que desempenham outras funções, principalmente o sistema imune, e por outros que ainda não foram caracterizados funcionalmente. Esses *loci* são denominados como região MHC de classe III. Nessa região estão presentes os *loci* que codificam proteínas do complemento, como Fator B, C2, C4A e C4B; genes de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF); o gene da enzima 21-hidroxila se (CYP 21B), que está envolvida com a síntese de esteróides; gene do citocromo P-450 e alguns genes de proteínas de choque térmico (HSP) (43-45-46). (Figura 6).

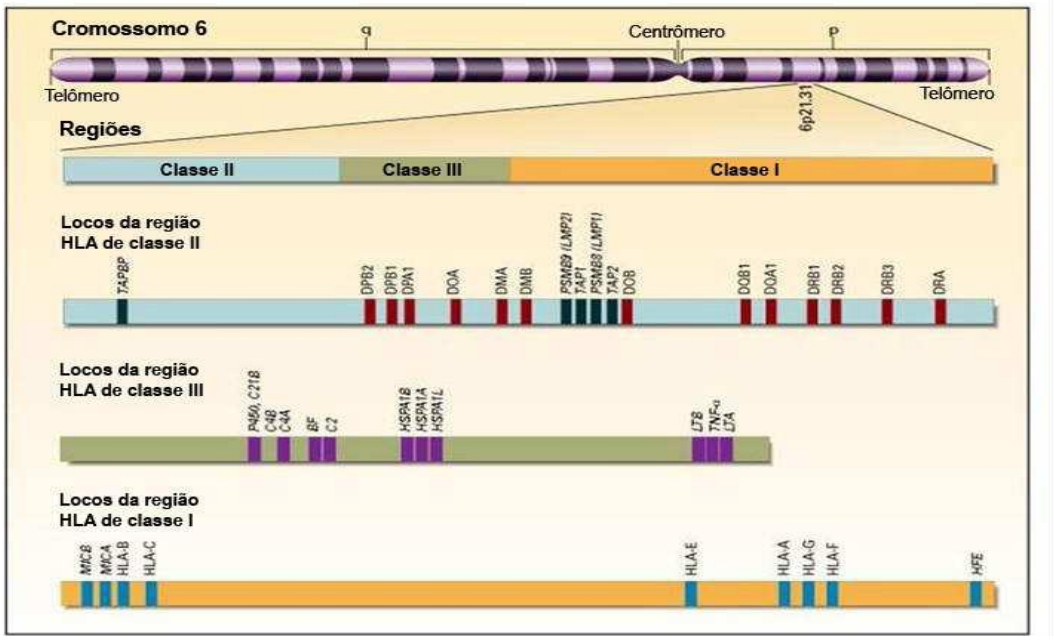


Figura 6 - Mapa Do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), adaptada (171).

O sistema HLA tem como função expor epítopos que são reconhecidos pelas células T, cujos receptores das células T (TCRs) são específicos para reconhecer complexos de peptídeos antigênicos e moléculas MHC (47). Os linfócitos T e B reconhecem os antígenos, somente quando apresentados pelas moléculas do MHC. As moléculas HLA de classe I são expressas na maioria das células humanas nucleadas e são as principais responsáveis pela apresentação de antígenos endógenos. Quando há uma infecção viral ou alteração de proteínas próprias como ocorre no câncer, as proteínas citosólicas são degradadas proteoliticamente no proteassomo, formando peptídeos capazes de se ligar as moléculas da classe I. No citoplasma, estes peptídeos são expostos ao retículo endoplasmático pela TAP (transportador dependente de ATP). Dímeros do MHC da classe I e a β2 microgobulina no retículo endoplasmático são fixados ao complexo do TAP e recebem os peptídeos transportados para o retículo endoplasmático. Os complexos estáveis de

moléculas do MHC classe I com peptídeos ligados saem do retículo endoplasmático e vão para superfície celular.Os linfócitos T CD8+ reconhecem esse complexo e desencadeiam uma resposta que resulta na eliminação da célula apresentadora incluindo células infectadas pelo HIV que apresentam seus epítopos (43,48) (Figura 7).

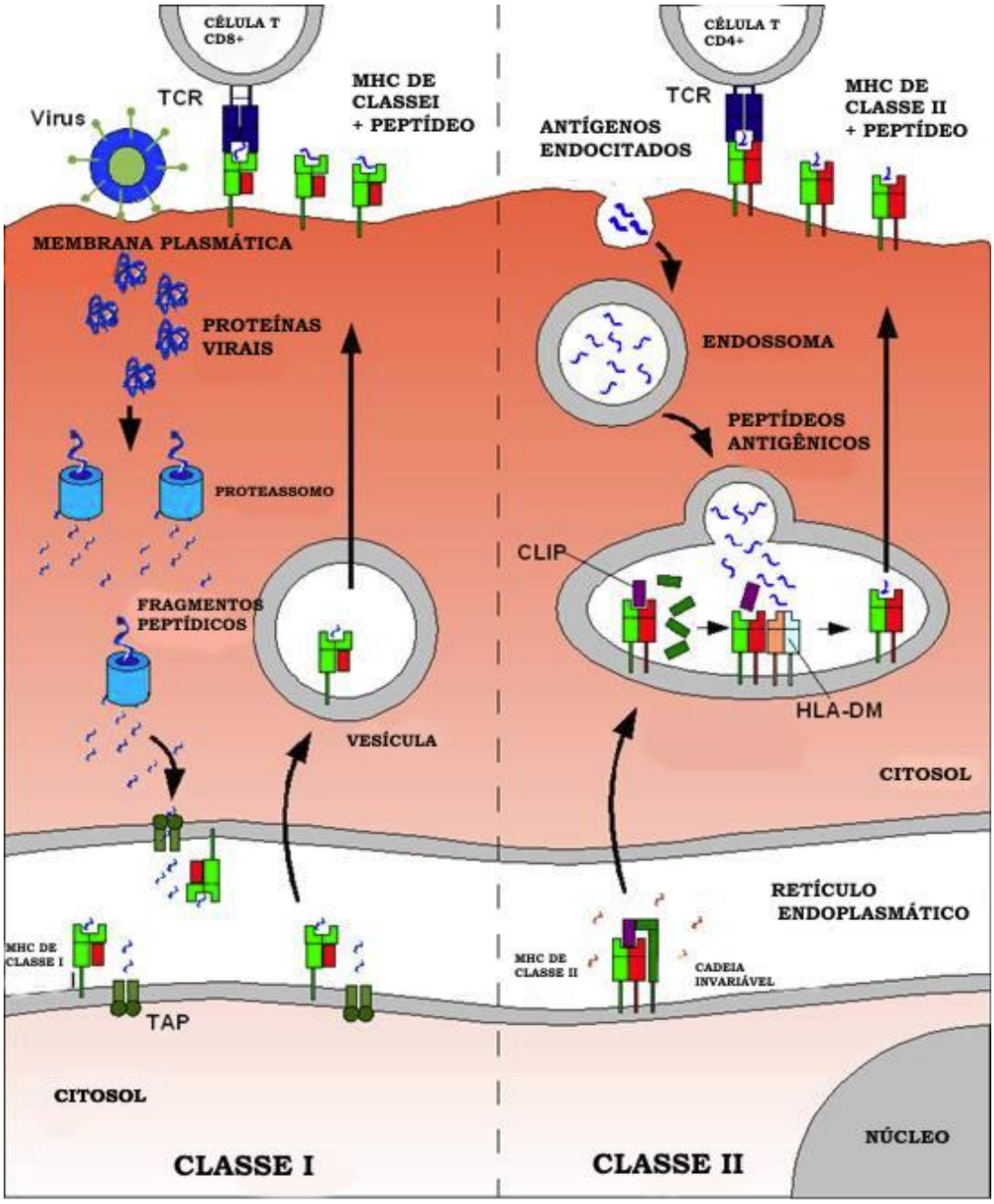


Figura 7 –Apresentação de antígeno via MHC classe I e classe II, adaptada (172).

As moléculas HLA de classe II são expressas nos macrófagos e células dendríticas. As moléculas de classe II estão envolvidas na apresentação dos antígenos às células TCD4+, ativando-as. As células apresentadoras de antígenos (APCs), interiorizam as proteínas extracelulares nos endossomas, que por ação de enzimas que funcionam com pH ácido , essas proteínas são clivadas proteoliticamente. As moléculas do HLA classe II recém sintetizadas associadas com a cadeia invariante são transportadas do RE para as vesículas endossômicas. A cadeia invariante é clivada proteoliticamente e o CLIP (pequeno remanescente peptídico da cadeia invariante), é removido da fenda de ligação de peptídeo da molécula do MHC pelas moléculas HLA-DM. Estes peptídeos que foram gerados de proteínas extracelulares se ligam á fenda da molécula do MHC da classe II e o complexo trimérico (cadeias α e β do MHC e peptídeo) que migra até a superfície celular, é reconhecido pelos linfócitos TCD4+ que secretam citocinas que desencadeiam as cascatas de reações imunológicas (43,49) (Figura 7).

1.4.3. Polimorfismo genético do Sistema HLA

O sistema HLA tem como característica principal o seu extremo polimorfismo. É o conjunto de genes que apresenta o maior grau de polimorfismo entre todos os *loci* expressos do genoma humano. Teoricamente, é possível que cada indivíduo apresente um conjunto diferente de alelos (50). Juntamente com HLA-A, o produto codificado pelo gene HLA-B é o antígeno de superfície celular mais investigado em testes sorológicos pré-transplante de órgão e tecidos, sendo expresso na superfície celular de todas as células nucleadas. Caracterizado pelo seu alto polimorfismo, até o momento é considerado o gene mais polimórfico do genoma humano, uma vez que já foram identificados mais de 1800 alelos (51).

O polimorfismo genético das moléculas HLA-A, B e C deve-se as diferenças na sequência de aminoácidos na cadeia pesada (cadeia α). Os genes que codificam essas cadeias são altamente polimórficos devido às

substituições de nucleotídeos nos éxons 2 e 3 (52). O polimorfismo das moléculas HLA de classe II depende da isoforma, deriva tanto das cadeias α quanto das cadeias β. A cadeia α do HLA-DR pode ser considerada monomórfica e todo o polimorfismo deriva dos genes da cadeia β. O gene mais polimórfico da classe II é o HLA-DRB1 (53).

As substituições de nucleotídeos nas sequências de alelos dos *loci* polimórficos estão concentradas nos *exons* que codificam a fenda de ligação ao peptídeo e o sítio de interação com o receptor da célula T e estão concentradas de forma seletiva, isto é, basicamente nos locais em que as alterações de nucleotídeos promovem a mudança dos aminoácidos que estão em contato direto com o peptídeo ligado ou com o receptor de célula T. Essas características das sequências HLA podem indicar que o polimorfismo é o resultado de um processo de seleção natural (54). As regiões com maior evidência da atuação da seleção são as que interagem diretamente com os antígenos, indicando que os microorganismos patogênicos sejam fonte de seleção atuante nos genes HLA. Essa hipótese evolutiva é conhecida como seleção dirigida por patógenos.

Estudos de associação com doenças infecciosas corroboram a hipótese de seleção dirigida por patógenos. Por exemplo, foram descritas associações entre alelos HLA e resistência à malária em populações do oeste africano (55). Alelos de HLA-B foram associados a uma maior ou menor progressão à infecção por HIV (56,57).

Foram realizadas simulações matemáticas do modelo de co-evolução entre patógenos e sistema imunológico. De acordo com esse modelo, as mudanças em genes dos patógenos e genes imunológicos ocorreriam paralelamente: os patógenos tenderiam a acumular mutações de escape, isto é, mutações que evitassem a apresentação pelas moléculas HLA mais comuns na população de hospedeiros. Por outro lado, novas moléculas HLA que apresentassem de forma eficiente essas mutações de escape seriam adaptativas e aumentariam de frequência na população de hospedeiros, recomeçando o ciclo (58). Esse modelo parece explicar de maneira satisfatória

o grande número de alelos, as altas taxas de heterozigose e a grande persistência dos alelos nas populações ao longo das gerações (58). Assim, o polimorfismo altera os tipos de peptídeos seletivamente ligados pelos produtos protéicos dos alelos dos genes HLA e influencia as interações com os receptores dos linfócitos T (59).

1.4.4. Nomenclatura do Sistema HLA

Após a descrição da primeira molécula HLA, tornou-se necessária a organização periódica de *Workshops* Internacionais de Histocompatibilidade (WSIH) para comparar resultados obtidos por diferentes pesquisadores em vários laboratórios. No primeiro WSIH, realizado em 1964 em Durhan, EUA, participaram 16 laboratórios, que analisaram sete metodologias diferentes e compararam os resultados de um painel de oito células. A técnica de microlinfotoxicidade foi proposta neste encontro por Paul Terasaki e tem sido utilizada até hoje (60).

Devido à enorme diversidade genética, foi consenso no segundo WSIH a necessidade de estabelecer regras claras em relação à nomenclatura utilizada para o sistema HLA. Então, em 1968, Bernard Amos organizou o primeiro encontro do Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde. Em 1975, no IV WSIH, realizado na Dinamarca, foi definida a padronização da nomenclatura para o sistema HLA. Os *loci* previamente chamados LA e FOUR passaram a ser designados por HLA-A e HLA-B, respectivamente. O terceiro *locus* SD, previamente chamado de Aj, passou a se chamar HLA-C (61).

Em 1980, o Comitê estabeleceu que os *loci* da região de classe I seriam designados por uma letra, precedidos pela sigla HLA (por exemplo: HLA-A, HLA-B e HLA-C), e as especificidades antigênicas determinadas pela sorologia seriam indicadas por números arábicos, que se seguem à designação do *locus* (por exemplo: HLA-A1, HLA-A2, HLA-B5) (62,63).

Com o advento das técnicas moleculares de tipagem HLA, tornou-se possível determinar as sequências nucleotídicas codificadoras das moléculas

HLA que cada indivíduo apresenta, e identificar assim alelos do sistema HLA. A nomenclatura do sistema HLA foi então estabelecida de forma a contemplar as duas técnicas de tipagem. Nos casos onde a sequência é conhecida, deve-se assinalar a letra correspondente ao *locus* do HLA com um asterisco (por exemplo: HLA-B*), quando após a sequência numérica que caracteriza o alelo houver a notação “N”, “L” ou “S”, refere-se às sequências que codificam um produto com expressão ou funcionamento nulo (“N”: *Null*), proteínas de baixa expressão (“L”: *Low*) ou proteína secretada (“S”: *Secreted*). Alelos que diferem somente por substituições nucleotídicas sinônimas são diferenciados na nomenclatura através da adição de outros dois dígitos após os quatro primeiros. Estas diferenças não têm, normalmente, nenhum significado fisiológico, mas elas podem ser ferramentas úteis para estudos de evolução e de genética de populações (64).

A nomenclatura dos alelos HLA definidos por biologia molecular varia na dependência da classe. Para classe I, a nomenclatura usa a denominação HLA-A, HLA-B e HLA-C para designar os *locus*. Em seguida, coloca-se um asterisco para identificar o método como sendo de biologia molecular (por exemplo, HLA-A*), Para o HLA de classe II, o procedimento é um pouco distinto. Após a designação do HLA e seu *locus* gênico, acrescentam-se a letra “A” ou “B” para representar as cadeias polimórficas α e β do HLA-DR e HLA-DQ e a letra “B” para representar a cadeia polimórfica β do HLA-DP (por exemplo, HLA-DQA, HLA-DRB, HLA-DPB). Como algumas regiões possuem diversos genes para as cadeias α e β, cada *locus* recebe um número correspondente (por exemplo, HLA-DRB1). (65).

Em Dezembro de 2005, durante o 14th International HLA and Immunogenetics Workshop em Melbourne, Austrália, e em Setembro de 2008, durante o 15th International HLA and Immunogenetics, foi estabelecida nova nomenclatura para os alelos HLA. Ela teve seu uso determinado no ano de 2010, portanto os nossos resultados obedecerão à nova nomenclatura. onde permanece a escrita HLA-B*57 para tipificação de baixa resolução; quando for realizada por técnica molecular onde os dois primeiros dígitos identifica o grupo

alélico e em alta resolução , quatro dígitos ,exemplo: HLA-B*57:01, onde os terceiro e quarto dígitos identificam o grupo alélico específico (66,67). (Figura 8).

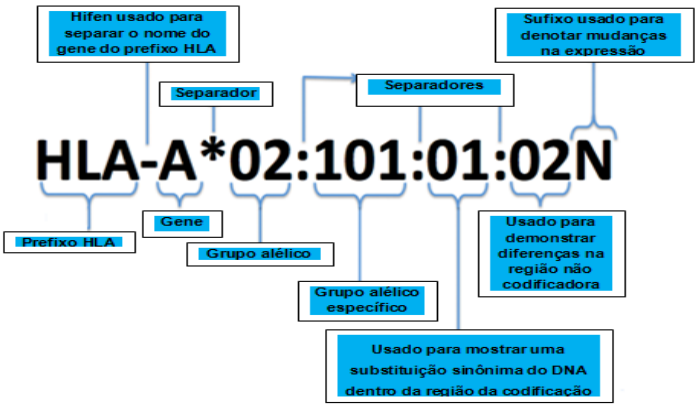


Figura 8 - Exemplo da nomenclatura de HLA adaptada (67).

O Comitê de Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde publica a cada dois anos relatórios sob o título *Nomenclature for factors of the HLA system* em periódicos da área e são publicadas atualizações mensais de nomenclaturas (68), que podem ser obtidas em http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/.

1.4.5. Determinantes HLA públicos e privados

Determinantes HLA privados são os determinantes localizados numa única molécula e em nenhuma outra , enquanto que os determinantes públicos possuem determinantes comuns a várias moléculas HLA, cada uma delas exibindo concomitantemente um determinante privado diferente. Os melhores exemplos de antígenos públicos são os HLA-Bw4 e HLA-Bw6; toda molécula codificada pelos alelos de HLA-B possui um desses dois determinantes em sua estrutura (69,70).

Antígenos HLA que inicialmente pareciam ser privados foram divididos em grupos de alguns antígenos intimamente relacionados. Os membros destes grupos foram denominados específicos (*splits*) da especificidade ampla (*broad*). Análises bioquímicas indicaram que os *splits* são de fato, variantes estruturais intimamente relacionadas. Por exemplo, HLA-A25 e A 26 são *splits* de A10. O HLA-A10, portanto, pode ser considerado um antígeno público nas moléculas HLA exibindo os antígenos privados HLA-A25 e HLA-A26 (69,70).

Além disso, os antígenos HLA privados podem ser organizados em grupos, com base em reações cruzadas sorológicas entre os membros do grupo; são chamados grupos de reação cruzada ou CREGs (69,70).

1.4.6. Técnicas de identificação do sistema HLA

Os métodos para identificação ou tipificação dos antígenos HLA são métodos celulares ou moleculares.

Até o final da década de 1980, a técnica sorológica da microlinfotoxicidade de Terasaki era o padrão para a identificação de novas especificidades do HLA. Essas técnicas sorológicas baseiam-se na reação antígeno-anticorpo, dependente do sistema complemento, que ocorre entre o antígeno HLA e um anticorpo presente no soro e possibilitam identificar epítopos de proteínas HLA que se expressam nas membranas de leucócitos. Os antígenos HLA de classe I são tipificados através de linfócitos totais ou linfócitos T do sangue periférico, enquanto que, para a classe II, utilizam-se linfócitos B (71).

Nos métodos fundamentados em biologia molecular, a tipificação dos alelos é realizada a partir do DNA genômico, extraído de células nucleadas, do sangue periférico ou de outro tecido e amplificado pela reação da cadeia de polimerase - *polymerase chain reaction* (PCR). As técnicas moleculares mais utilizadas são a *sequence specific primers* (SSP), a *sequence specific oligonucleotide probes* (SSOP) (65). Hoje podemos contar com a técnica por sequenciamento (72).

1.4.7. Estudos populacionais do Sistema HLA

O extenso polimorfismo e o desequilíbrio de ligação existente entre diferentes *locus* do sistema HLA têm sido utilizado como marcadores genéticos em estudos antropológicos. A caracterização da diversidade alélica e haplotípica nos principais genes do sistema HLA constitui um poderoso instrumento em estudos populacionais. As frequências alélicas e haplotípicas dos *locus* HLA variam entre as diferentes populações e grupos étnicos(73).

As frequências alélicas nos genes do sistema HLA têm demonstrado serem mais similares entre populações com origens comuns. Determinados alelos são característicos de algumas populações humanas com determinadas origens geográficas (74). O alelo HLA-A*0201 é muito comum nas populações do Oeste Euro-asiático enquanto que os alelos A*2301 e A*3001 são mais frequentes nas populações da África subsaarianas (74,75). Em populações européias o alelo A*0201 corresponde a mais de 95% dos alelos do grupo A*02 enquanto que nos chineses de Singapura corresponde apenas a 25% e menos de 3% em hindus Indianos (76). O A*0211, é o alelo mais frequente no norte e oeste da Índia (77). Nas populações européias o alelo A*6801 é o mais predominante enquanto que nas populações subsaarianas o A*6802 é o mais prevalente (76,77). Também os alelos A*3001 e A*3002 apresentam frequências muito mais elevadas nas populações africanas do que nas européias (74,75). O alelo A*0206 aparece com frequências elevadas apenas em populações asiáticas e ameríndias (74). Os alelos A*1101, A*2402 e A*3303 aparecem nos asiáticos com frequências significativamente mais elevadas do que noutras populações. Por outro lado, os alelos B*0801 e B*4402 aparecem nos caucasianos com frequências muito mais elevadas do que em outras populações (78). Entre os caucasianos, o alelo DRB1*0401 é o mais frequente do seu grupo enquanto que nas populações asiáticas o mais prevalente é o DRB1*0405 (79). Alguns alelos são considerados específicos do continente africano (A*0202, A*0225, B*1503, B*1516, B*2703, B*4202 e B*5703) e a sua presença em populações de outras origens reflete misturas ocorridas no

passado (75). Outro exemplo, é o grupo HLA-B*27. O B*2705 é o alelo que possui uma distribuição mais ampla na população mundial, apresentando frequências mais elevadas nas regiões circumpolar e sub-ártica da Eurásia e América do Norte. O B*2702 possui distribuição restrita às populações caucasianas, sendo particularmente predominante em algumas populações caucasianas do Oriente Médio (judeus) e do Norte de África. O B*2703 é o alelo deste grupo que predomina nas populações subsaarianas e o B*2704 o mais frequente nas populações Asiáticas (80,81).

Os alelos dos diferentes genes do sistema HLA são frequentemente transmitidos em bloco de geração em geração e certos haplótipos são encontrados mais frequentemente do que o esperado pelas respectivas frequências alélicas. Este fenômeno, conhecido como desequilíbrio de ligação, resulta de uma localização fisicamente próxima dos *locus* envolvidos e do efeito das forças seletiva (82).

Inúmeros haplótipos do sistema HLA têm sido identificados, cuja distribuição geográfica coincide com a existência de relações passadas entre as populações (83-85). Por exemplo, os haplótipos A*010101-B*0801-DRB1*030101 e A*2902-B*4403-DRB1*0701 são de origem européia, considerando-se o primeiro de influência Celta (86). O haplótipo A*020101-B*440301-DRB1*070101 tem sido encontrado nas populações do norte e oeste europeu (83). Já os haplótipos A*3301-B*1402-DRB1*010201 e A*020101-B*180101-DRB1*1104 são considerados de origem mediterrânea (84). O haplótipo A*020101-B*070201-DRB1*150101 tem sido encontrado em populações européias e norte africanas e os haplótipos A*020101-B*510101-DRB1*130101, A*010101-B*5801-DRB1*070101 e A*3002-B*180101-DRB1*030101 têm sido demonstrados como origem ibérica (83,84). Assim, as frequências haplotípicas do sistema HLA, associadas às frequências alélicas, permitem identificar a influência genética nas populações humanas das migrações.

No Brasil, são poucos e genéricos os estudos de prevalência de antígenos HLA. Devido à miscigenação dos indivíduos brasileiros, tem sido

observada certa dificuldade na classificação de raças. A raça e a etnia dos brasileiros é extremamente heterogênea, com grande diversidade em alguns estudos (59).

1.4.8. HLA como fator de Suscetibilidade e Resistência a Doenças

A função do sistema HLA já está bem estabelecida e descrita na resposta imunológica antígeno-específica pelas moléculas HLA (87).

Evidências apontam para algumas moléculas HLA definidas sorologicamente em frequência aumentada entre indivíduos afetados por determinadas doenças, com implicações importantes na medicina clínica (88,89). Quando somente os antígenos classe I eram conhecidos, todas as associações descritas referiam-se a estes antígenos. Posteriormente, com o conhecimento dos antígenos classe II, muitas doenças mostraram associações mais fortes com tais antígenos, que estavam em desequilíbrio de ligação com aqueles que haviam sido originalmente atribuídos à suscetibilidade. Um exemplo disto são as doenças inicialmente descritas em associação com HLA-B8, ou com o haplótipo HLA-A1/B8, que mais tarde se descobriu estarem associadas com o HLA-DR3. Isto pode ser explicado pelo desequilíbrio de ligação apresentado pelo haplótipo HLA-A1, B8, Cw4, DR3, DQ2 (90).

Ao longo de três décadas, desde a criação da técnica sorológica por microlinfotoxicidade por Terasaki, as técnicas de tipificação HLA vem experimentando um grande avanço e hoje com as técnicas de biologia molecular é possível a identificação de diferenças nas sequências alélicas. Com isso, as análises epidemiológicas usando técnicas de tipificação molecular de alta resolução podem levar a identificação de um único resíduo de aminoácido ou de um pequeno conjunto de resíduos críticos para a suscetibilidade ou resistência a determinada doença (91).

Os avanços na técnica de isolamento e sequenciamento de peptídeos permitem a identificação de peptídeos ligados a várias moléculas HLA classes I e II e a definição dos motivos de ligação a peptídeos que são “preferidos” para

muitos destes complexos (92). Desta maneira é possível a busca de peptídeos que possam se ligar à molécula HLA a partir de alvos em potencial, como auto-antígenos, microorganismos ou outros fatores precipitantes. A ligação de peptídeos a moléculas HLA e a apresentação destes às células T, confirmam os papéis conhecidos desempenhados pelas moléculas HLA e moléculas alvos e podem levar a estratégias específicas capazes de impedir ou retardar a progressão da doença(93).

Várias citações são encontradas na bibliografia acerca de alelos HLA como fatores de proteção para determinadas doenças (55,56,94). Outro aspecto é o peso relativo que uma dada associação de predisposição ou proteção pode exercer sobre a etiopatogenia de uma doença, pois pacientes que possuem genes de suscetibilidade e proteção se comportam de maneira distinta na instalação e progressão da doença quando comparados aos pacientes que apresentam somente a associação de suscetibilidade (93).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos na busca de correlacionar algumas doenças com os antígenos HLA como podemos observar (Tabela 1).

Tabela 1- Exemplos de doenças com forte associação ao sistema HLA, adaptada (30).

Doença	**HLA associado**
Espondilite anquilosante	B27
Diabetes mellitus dependente de insulina	DR3+DR4
Síndrome de goodpasture	DR2
Pênfigo vulgar	DR4
Uveíte anterior aguda	B27
Lúpus eritematoso sistêmico	DR3
Esclerose múltipla	DR2
Doença de graves	DR3
Artrite reumatóide	DR4
Miastenia gravis	DR3

1.4.9. Associação do Sistema HLA com HIV-1

Além das respostas imunes, os fatores genéticos do hospedeiro têm um importante papel quer na suscetibilidade e resistência à infecção pelo HIV e à velocidade de progressão para AIDS. Um destes fatores é a supressão do maior co-receptor responsável pela entrada do vírus na célula T CD4+, o receptor CCR5 (94).

A resposta imune do hospedeiro envolve uma relação complexa entre os sistemas imune adaptativo e o inato, os quais determinam o resultado da infecção por diferentes patógenos. Diversas famílias de genes envolvidos na resposta imunológica, tais como genes HLA classes I e II do MHC, demonstram alta diversidade. Variantes nesses *loci* têm sido associados com resistência ou suscetibilidade a várias doenças. Tipagens moleculares de coortes bem definidas têm demonstrado influência da diversidade do HLA em doenças de etiologia viral, tais como causada por HIV-1, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e papiloma vírus (95). A combinação de rápida replicação e a alta velocidade de mutação observada para o HIV tem sido um desafio para o sistema imune e para o desenvolvimento de uma vacina preventiva ou terapêutica. O resultado da infecção pelo HIV-1 é altamente variável entre os indivíduos e estudos epidemiológicos tem identificado genes do sistema imune que parecem influenciar na progressão da doença pelo HIV (96).

Assim como outros genes do sistema HLA, o gene HLA-B exerce sua principal função no sistema imune, como apresentador de peptídeos antigênicos as células T CD8+, tendo também grande influência na sobrevida de órgãos transplantados, na progressão de doenças infecciosas e na suscetibilidade a certas doenças autoimunes (97).

A influência do sistema HLA no efeito clínico garante ajudar na investigação e entendimento da patogênese da doença, o que pode auxiliar na geração de uma vacina efetiva. A vantagem de ser heterozigoto para os alelos HLA classe I provavelmente reflete na capacidade de moléculas HLA classe I

distintas apresentarem diversos epitopos aos linfócitos T, resultando em uma ampla resposta e adiando a incidência da evasão viral. A preferência por alelos HLA classe I pode refletir sua capacidade de apresentar epitopos virais conservados a células T CD8+ (98).

Já foi demonstrada a ligação entre alguns tipos de HLA e a baixa progressão da doença pelo HIV, através das análises dos dados do *Multi-Center AIDS Cohort Studies* (MACS). Recentemente foi demonstrado que alguns alelos HLA, tais como o HLA-B27 e HLA-B57, estão associados a um melhor prognóstico, enquanto outros, como o HLA-B35, estão associados com a progressão para doença (96,99). O mecanismo pelo qual o HLA influencia o desenvolvimento de doença ainda não está bem esclarecido. Alguns pesquisadores sugerem que as moléculas de HLA podem estar diretamente envolvidas na replicação do HIV, (98) embora mais pesquisas sejam necessárias para entender melhor este processo.

A sobrevida prolongada de caucasianos portadores do vírus da AIDS foi atribuída a heterozigose completa para os *loci* do sistema HLA de classe I, e/ou pela baixa frequência de alelos associados à doença, como HLA-B35 e HLA-C04, observada nestes indivíduos (57,96,99). O fato da associação com HLA-B35 ter sido observada tanto em europeus quanto em africanos fortalece a evidência de que este alelo seja o responsável por exercer um efeito na resposta imune à infecção por HIV (100). Em estudo realizado com 375 indivíduos sul africanos infectados pelo HIV, um número significativamente maior de respostas de células T CD8+ foi restrita ao HLA-B se comparado às moléculas HLA-A. Além deste fato, foi verificada uma maior pressão de seleção imposta ao vírus HIV-1 por certos alelos HLA-B do que por alelos HLA-A, indicando que o principal foco de atividade viral seja o HLA-B (101).

O HLA-B57 está fortemente associado à progressão mais lenta para doença em pacientes infectados pelo HIV-1 (99). Indivíduos sem terapia antirretroviral que mantém viremia plasmática abaixo de 50 cópias/ml e contagem normal de linfócitos T CD4+, denominados controladores de elite, são enriquecidos com o HLA-B57 e bloqueiam com sucesso os efeitos nocivos do

HIV, através de mecanismo não completamente esclarecido (99,102). Mutações nos epitopos restritos ao HLA-B57 têm sido observadas, mas o significado delas ainda não é claro (99,102).

O HIV-1 induz vigorosa resposta imune do hospedeiro, crítica no controle da replicação viral, mas que falha na maioria dos indivíduos. Os indivíduos que permanecem livres da doença durante décadas são conhecidos como *long term non progressors* (LTNP) ou não progressores (99). Outro alelo HLA classe I, o HLA-B27, aparece com maior frequência em comparação à população controle, implicando em um papel antiviral para os alelos classe I restrita as células T CD8+ que destroem células infectadas (99,103-105). De fato, estudos com depleção de células T CD8+ em macacos reso infectados pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) (106), confirmam que o sistema imunológico exerce pressão sobre o vírus (107-110). Está claro, entretanto, que a magnitude da resposta dos CTLs sozinha não é suficiente para controlar a replicação viral por si só e as propriedades funcionais de memória das células T CD8+ são críticas para controlar a infecção. A capacidade proliferativa pode ser o fator chave na eficiência antiviral da imunidade da célula T, particularmente em indivíduos HLA-B27 e HLA-B57. Estudos em macacos infectados pelo SIV e outros da história natural da infecção do HIV avaliaram as variantes associadas ao escape com o controle efetivo da viremia (111,112). No modelo animal havia ocorrido três mutações que favoreciam ao escape. A primeira mutação foi na região *tat*, no epítopo conhecido como SL8 em Mamu-A*01. A segunda mutação foi na região *nef*, no epítopo conhecido como IW9 em Mamu-B*17. A terceira mutação foi na região *gag* no epítopo conhecido como CM9. Os alelos A*01 e B*17 estão associados com o controle efetivo do SIV e, presumivelmente, exercem considerável pressão no vírus. Quando esta mutação tripla no vírus foi usada para infectar animais que eram Mamu-A*01 e Mamu-B*17 positivos, o escape foi preservado (111). Nas infecções em animais que eram Mamu-A*01 e Mamu-B*17 negativos, a mutação CM9 em *gag* revertia rapidamente à sua origem, seguida pela mutação IW9 em *nef*. Em contrate, a

mutação SL8 em *tat* persistia na vida dos animais. Estes dados indicam que existe certa resistência viral quando há escape ao epítopo *tat* SL8 (111).

Estudos semelhantes de infecção pelo HIV (113-115) têm focado em indivíduos positivos para HLA-B*57 e HLA-B*5801 (99), porque esses alelos, semelhantes aos HLA-B*27, têm sido associados à baixa progressão da doença (99,107,113-117). O CTL específico dominante na infecção aguda em pacientes HLA-B57 está direcionado para o epítopo p24 Gag TSTLQEQIGW, conhecido como TW10 (109). Em 75% dos indivíduos positivos HLA-B*57 e HLA-B*5801 ocorre escape no início da infecção por intermédio da substituição da treonina pela aspargina (T242N) na posição 3 do epitopo. Além disso, em indivíduos positivos HLA-B*57/HLA-B*5801, é observada uma substituição da glicina pela alanina na posição 9 do epítopo (G248A). A transmissão desses escapes mutantes para indivíduos que não possuem HLA-B*57/HLA-B*5801 resulta em reversão do mutante T242N, persistindo a variante G242A. A mutação T242N do epítopo em indivíduos HLA-B*57 é um exemplo de escape que ocorre no início da infecção. No entanto, neste caso, observa-se que a pressão para escape é particularmente intensa e tem sido motivo de estudo para investigar mudanças na sequência *gag* em um pequeno grupo de indivíduos HLA-B*57, pacientes não tratados que mantiveram extraordinariamente baixos níveis da viremia (menos que 50 cópias/mL) por mais de duas décadas (124). Esses indivíduos que controlaram a infecção demonstraram no T242N mutação no epitopo TW10 e a supressão da viremia foi completa (118). Isto pode explicar o mecanismo pelo qual o HLA-B57 está associado ao sucesso do controle do HIV.

1.5. Relação do HLA B57 e reação adversa ao Abacavir

Abacavir (ABC) é uma droga usada no tratamento da infecção pelo HIV-1, nucleosídeo análogo ao inibidor da transcriptase reversa. Embora esta droga

apresente alta eficácia, uma reação curiosa foi identificada em alguns indivíduos, com características de hipersensibilidade (119).

Aproximadamente, 5 á 8%, de indivíduos caucasianos com infecção pelo HIV-1 que inicia uma terapia antirretroviral que contém abacavir apresentam reação de hipersensibilidade, e estas reações normalmente ocorrem dentro das 6 primeiras semanas de tratamento (média de 11 dias), caracterizada por exantema cutâneo, febre e sintomas gastrointestinais e respiratórios. A reação de hipersensibilidade pode causar hipotensão e levar a morte (120).

O mecanismo desta reação não é conhecido, mas os sintomas clínicos sugeriam uma reação imunológica influenciada por fatores genéticos. O estudo realizado por Seth Hetherington e colaboradores detectou associações entre polimorfismo genético e a suscetibilidade á hipersensibilidade ao abacavir. e fortes associações entre o sistema HLA e a hipersensibilidade ao abacavir tem sido demonstradas em população constituída de caucasianos (121).

Em 2002 a associação entre o diagnóstico de reação de hipersensibilidade ao abacavir e a expressão do alelo HLA-B*5701 foi descrita independentemente por dois grupos de pesquisa (120,122) e subsequentemente por outros estudos. Estudo de coorte com infecção pelo HIV-1 que evitam a droga Abacavir em indivíduos HLA-B*5701 demonstrou a redução significante da incidência de reação de hipersensibilidade (122).

O alelo HLA-B*5701 está associado com desenvolvimento de hipersensibilidade ao abacavir entre 70 e 90% de indivíduos caucasianos que expressam este alelo (119).

1.6. Papel dos linfócitos T CD8+

Vários fatores podem influenciar a replicação viral durante a infecção aguda até o estabelecimento do ponto estável viral, incluindo a aptidão replicativa do vírus infectante, fatores genéticos e resposta imune do hospedeiro. Enquanto anticorpos neutralizantes anti-HIV são raramente

detectados durante a infecção primária, um número de estudos demonstrou um papel crucial da resposta imune celular para o controle inicial da replicação durante este estágio da infecção. Uma maciça expansão da resposta monoclonal das células T CD8+ foi descrita durante a infecção aguda pelo HIV (99,123) e a função das células T CD8+ específicas foi associada com o declínio da viremia (113,114). Estas células T CD8+ têm a capacidade de eliminar diretamente as células infectadas pelo HIV por uma citólise restrita ao MHC classe I ou indiretamente pela produção de citocinas, quimiocinas ou outros fatores solúveis que diminuem a geração de novos progenes virais (115). A relevância biológica das células T citotóxicas (CTL) na infecção aguda foi realçada em estudos *in vivo,* que demonstraram um dramático aumento da viremia do vírus SIV e uma aceleração no progresso da doença em macacos após a depleção artificial de células CD8+ (106,116). Uma evidência adicional sobre a pressão antiviral das células CTL específicas para o HIV durante a infecção primária foi fornecida pela rápida seleção de cepas virais com epítopos de mutações de CTL que foram detectadas poucas semanas após a infecção pelo HIV ou SIV no homem e no macaco, respectivamente (109,111,112).

Em 1994, foi demonstrado pela primeira vez que linfócitos T CD8+ estão relacionados à supressão da replicação do HIV em dois estudos, onde a redução da viremia na infecção aguda estava temporariamente associada ao aparecimento de linfócitos T CD8+ específicos contra o HIV (113,114). O importante papel de linfócitos T CD8+ foi confirmado com trabalhos envolvendo modelos de infecção em macacos pelo SIV. Nestes estudos, anticorpos monoclonais contra a molécula CD8 foram usados para depletar os linfócitos T CD8+ circulantes, o que resultou na perda do controle da viremia tanto na fase crônica, quanto na aguda (116,124).

O papel destas células no escape da resposta linfocitária isto é, variação da sequência genética viral resultando em diminuição do reconhecimento por linfócitos T CD8+, tanto na patogênese da infecção pelo HIV quanto pelo SIV, ainda não é claro. Enquanto estudos recentes ampliam as evidências do

escape aos linfócitos T CD8+ na infecção por vírus causadores de imunodeficiência, a natureza completa deste escape ainda é desconhecida . Dados de modelos de infecção em macacos por SIV têm, conclusivamente, demonstrado que o escape aos linfócitos T CD8+ ocorre na fase crônica da infecção (125,126). Este escape foi também documentado durante a fase aguda (111,112) e ao longo da fase crônica (127-129) da infecção pelo SIV. Foi ainda demonstrada ampla associação entre polimorfismos nas sequências de aminoácidos dos vírus em certos resíduos e a expressão de moléculas particulares de HLA de classe I por meio de análises de sequências genéticas de HIV, em uma coorte de mais de 300 indivíduos infectados (130), indicando que o escape é provavelmente um evento comum na infecção.

Durante a infecção aguda pelo HIV, o número de células T CD4+ diminui para níveis que podem favorecer o desenvolvimento de infecções oportunistas (118). Mesmo quando a contagem de células T CD4+ se recupera após a resolução da infecção primária, raramente volta aos níveis basais na ausência de terapia antirretroviral. Por outro lado, com o declínio da contagem de linfócitos T CD4+, o agravamento qualitativo da função destas células é talvez a anomalia mais característica detectada na infecção pelo HIV. O agravamento da função específica dos linfócitos T CD4+ ocorre muito precocemente na infecção aguda (131-133), potencialmente devido à infecção preferencial de células T CD4+ específicas contra o vírus (133).

A infecção pelo HIV-1 apresenta-se em 40-90% dos casos como uma doença transitória sintomática associada aos elevados níveis de replicação do HIV e a uma resposta imunológica específica crescente. Durante os momentos precoces da infecção pelo HIV, o vírus replica-se largamente na ausência de qualquer resposta imune de adaptação, atingindo níveis que podem ultrapassar 100 milhões de cópias/mL. É durante este ciclo inicial de replicação viral que ocorrem importantes processos patogênicos. Incluem-se a disseminação para uma série de reservatórios tissulares e a destruição de linfócito T CD4+ específicos para o HIV. Os elevados níveis de viremia são normalmente de curta duração, indicando que o hospedeiro é capaz de gerar uma resposta

imune que controle a replicação. Nas semanas seguintes, a viremia diminui antes de atingir um ponto estável. Este nível de viremia é um fator preditivo significativo da taxa de progressão da doença em longo prazo (134).

A resposta dos CTL é importante no controle da replicação do HIV e estas diversidades dos epítopos específicos do HIV aos CTL são úteis como alvos das células infectadas importante para o sucesso do controle do HIV. É consenso entre alguns estudos que a magnitude da resposta dos CTL se correlaciona com o controle da viremia. (107,135-139).

Os estudos de escape envolvendo CTLs têm focado no componente peptídeo-MHC do complexo trimolecular que também inclui o receptor de célula T (TCR). Cada indivíduo possui alguns TCRs que podem se ligar ao complexo peptídeo-MHC. A natureza precisa do TCR expressado pelos vírus CTLs-específicos podem ter uma importante função no tempo de escape do CTL. A diversidade do TCR influencia a pressão imposta pelo HIV (132,133). A atividade dos CTLs para sua célula alvo através da interação de seus TCRs com o complexo peptídeo-MHC pode ser importante para determinar se o escape de reconhecimento do epítopo ocorre no início ou mais tarde após a infecção.

1.7. HLA B57 e progressão para AIDS

Até o momento, não existe informação definitiva para explicar como indivíduos infectados pelo HIV-1 que possuem o alelo HLA-B57 conseguem controlar melhor a replicação viral. Neste estudo, avaliamos a frequência desse alelo em recém infectados pelo HIV-I e descrevemos as características dos pacientes.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A constituição de coorte de pacientes recém infectados pelo HIV-1 do Estado de São Paulo foi uma excelente oportunidade para avaliar a associação do HLA-B57 com os aspectos laboratoriais associados a melhor controle da replicação viral. Ao tipificar o HLA de todos os participantes, confirmamos que há 7,2% de indivíduos HLA*B57. Os valores de linfócitos T CD4+ e a carga viral do HIV-1, entretanto, revelaram que cerca de metade deles têm claro privilégio no controle da replicação viral, o que permitiu dividir em dois grupos bem definidos de indivíduos.

Isto permite considerações importantes sobre a imunopatogênese da infecção e oferece interessante oportunidade para explorar como este alelo está relacionado a fenótipo favorável após a infecção pelo HIV-1. O presente trabalho descreve a identificação destes pacientes nesta coorte.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral: Estudar a frequência e o comportamento da progressão para imunodeficiência em indivíduos HLA-B57 recém-infectados pelo HIV-1.

3.2. Objetivos específicos: Mapear a coorte para identificar pessoas recentemente infectadas pelo HIV-1 que expressam HLA B*57 e estabelecer uma associação com melhor controle da replicação viral e contagem de linfócitos T CD4+.

3.2.1 Sub-objetivo A: Identificar os subtipos dos alelos HLA B*57.

3.2.2 Sub-objetivo B: Verificar se os alelos HLA B*57, tipificados até quatro dígitos, identificam genótipo específico relacionado ao controle da viremia.

MATERIAL E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1. Caracterização da amostra populacional

As amostras foram obtidas sequencialmente. Os números das centenas podem variar de acordo com o local de inclusão do voluntário. Os participantes estão identificados por números arábicos.

4.1.1. Coorte de indivíduos recém-infectados pelo HIV-1.

No ano de 2002 iniciou-se o desenvolvimento de uma coorte prospectiva de indivíduos recentemente infectados pelo HIV. O projeto foi planejado para identificar, recrutar e realizar seguimento prospectivo de indivíduos recentemente infectados pelo HIV (140) empregando o critério STARHS (*serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus seroconversion*) (ELISA sensível reagente, ELISA de menor sensibilidade não-reagente) (141) para identificar infecção pelo HIV nos últimos seis meses. Os pacientes identificados com infecção recente foram consultados para participar da coorte, de acordo com o algoritmo da Figura 9.

Aos indivíduos que procuraram os Serviços de Testagem e Aconselhamento da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo participantes deste estudo e que receberam resultado positivo de sorologia para o HIV-1, método Elisa e confirmado pelo teste Western Blot, foram submetidos ao STARHS, realizado com o kit HIV-1 ELISA test Vironostika HIV-1 micro-ELISA (BioMérieux, Durham, NC, EUA), após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 1. Quando negativo, indicando possibilidade de infecção recente, os voluntários foram convidados a participar do estudo, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2 (Figura 9).

Foram considerados pacientes recém infectados pelo HIV-1 que apresentaram pelo menos um teste Elisa para HIV-1 positivo confirmado pelo

teste Western Blot, mas negativo usando o teste menos sensível HIV-1 ELISA, teste Vironostika.

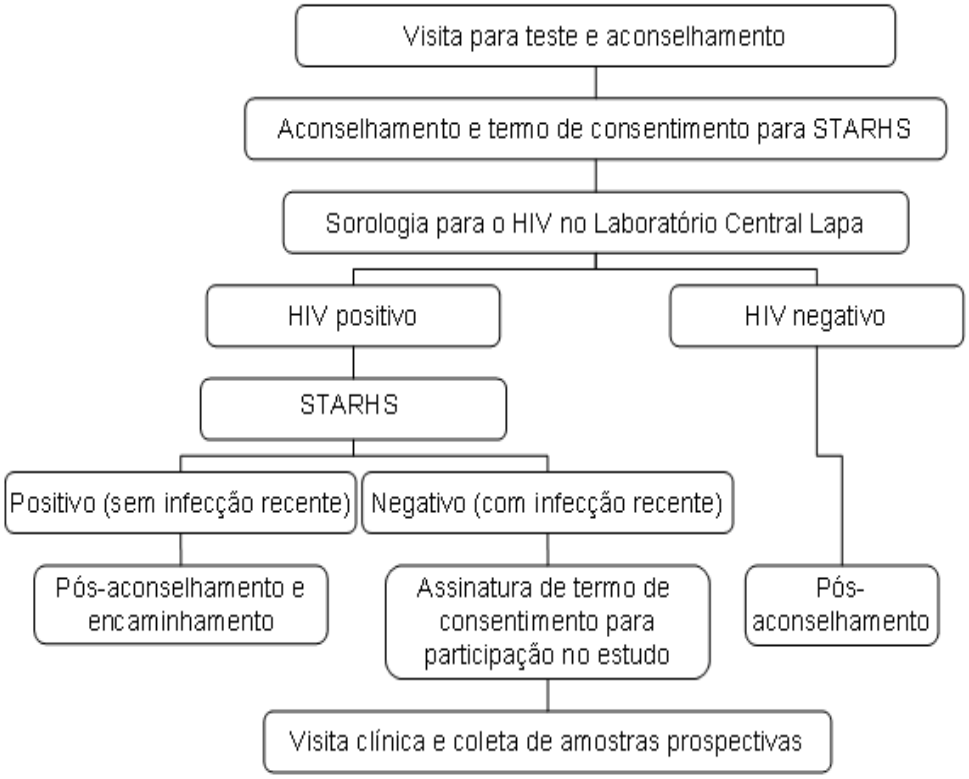


Figura 9: Algoritmo de fluxo para captação de voluntários para a coorte.

4.1.2. Critérios de inclusão e exclusão do estudo

Foram obedecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

A. Critérios de inclusão

Idade igual ou superior a 18 anos completos;

Teste de detecção de anticorpos anti-HIV pela técnica de ELISA, com resultado positivo, confirmado por teste de Western-Blot;

Teste com ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-HIV com resultado positivo, porém com resultado negativo após método com ensaio imunoenzimático menos sensível;

Hematócrito de 28% ou mais, obtido antes da coleta de sangue quando da inclusão no estudo.

B. Critérios de exclusão

Relato de teste sorológico para o HIV com resultado reagente, realizado há quatro meses, ou antes;

Mulheres grávidas ou amamentando;

Resultado de teste de gravidez realizado com amostra de urina, obtido antes da coleta de sangue, com resultado positivo;

Qualquer afecção que na opinião do investigador, possa interferir com a avaliação dos objetivos do estudo;

Presença de qualquer indicação de que o paciente apresente comprometimento significativo do sistema imunológico na primeira consulta médica, por exemplo, uma doença oportunista grave ou um tratamento para uma doença oportunista grave;

Presença de qualquer indicação de que o paciente não goze de plena capacidade mental ou que não seja capaz de compreender os termos do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1.3. Avaliação inicial dos pacientes

Após a inclusão dos voluntários, foram realizados todos os exames laboratoriais necessários, seguido de consulta clínica, para acompanhamento do paciente conforme recomendação do Ministério da Saúde para indivíduos infectados pelo HIV-1 (142).

Os voluntários foram questionados durante consulta médica inicial sobre a presença de sintomas sugestivos de infecção recente nos quatros meses anteriores à realização da primeira sorologia. Os sintomas questionados foram:

febre, quadro compatível com resfriado ou gripe, fraqueza intensa ou indisposição, presença de adenomegalia, exantema, lesões na mucosa oral ou algum outro quadro apresentado no período, bem como data e duração dos sintomas.

A indicação de início do tratamento também seguiu as recomendações de 2006 do Ministério da Saúde descritas no documento (Recomendações para Terapia Anti-Retroviral em adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV), que indica o tratamento para pacientes com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/µL e considera o tratamento para pacientes com contagem de linfócitos T CD4+ entre 200 e 350 células/µL, de acordo com evolução de parâmetros virológicos, imunológicos e clínicos (150). Mais recentemente, os critérios de tratamento foram adaptados a nova publicação do Ministério da Saúde, com as normas consensuais mais atuais de tratamento (150).

Nem toda a contagem de linfócitos T CD4+ menor que 300 células/µL resultaram em início de tratamento. Os testes são repetidos para confirmação e a necessidade de adesão ao tratamento foi discutida com o paciente.

4.2. Contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+

A contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi realizada utilizando-se a técnica de marcação de linfócitos com monoclonais conjugados, anti CD3, CD4 e CD8, (Kit Tri Test, BD Biosciencies, San Diego, Califórnia, EUA); CD4 conjugado com isotiocianato de fluoreceína (*fluorescein isothiocyanate,* FITC), CD8 conjugado com ficoeritrina (*phycoerythin,* PE) e CD3 conjugado com proteína de clorofila peridina (*peridin chlorophil protein,* PerCP). Foram colocados 20 µL de monoclonais e 50 µL de sangue em tubos TrueCount (BD Biosciences), incubados por 15 minutos em temperatura ambiente e em seguida, adicionados 450 µL de solução de lise diluída 1:10 com nova incubação de 15 minutos. As amostras de células são adquiridas em citômetro FACSCalibur (BD Biosciences), equipado com laser de argônio de 15 mW, 488 nm, refrigerado a ar, com expansor prismático e lentes esféricas, criando um

feixe elíptico de 20 x 64 µm, com fluxo da amostra de 60 +/- 7 µL/min. As dispersões de luz frontal e lateral foram detectadas com fotomultiplicadores, com valores de 530/30 nm para FITC, 585/42 nm para PE, 650 nm para PerCP e 661/16 nm para aloficocianina (APC), com valores obtidos em escala logarítmica. O citômetro é aclopado ao microcomputador (Machintosh Power PC, modelo 7300/200, Apple Computer Inc., Cupertino, Califórnia, EUA), que permite o controle da aquisição dos parâmetros descritos para cada evento, com armazenamento de dados em disco rígido. Para aquisição e a análise da contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi utilizado o programa MultiSet (BD Biosciences), de acordo com as normas do fabricante.

4.3. Quantificação da carga viral

A dosagem de RNA plasmático foi realizada empregando-se teste RT-PCR AMPLICOR HIV-1 MONITOR versão 1.5 (Roche Diagnósticos, Indianápolis, IN, EUA até Janeiro de 2007 e posteriormente substituído pelo teste bDNA (Versant-bDNA HIV-1 RNA 3.0 Assay, Bayer Health Care LLC Tarrytown, NY) executadas de acordo com os protocolos dos fabricantes.

4.4.Técnica de extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o kit QIAamp® DNA Blood Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Em tubos de 1,5 mL, foram adicionados 0,9 mL de solução de lise, 300µL de sangue total, que foram misturados com auxílio de agitador (PHOENIX, mod. AP56) durante 30 segundos e incubados durante 5 minutos a temperatura ambiente e então centrifugados entre 12.000-16.000 rotações por minuto (rpm) durante 20 segundos. Todo o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 500µL de solução de extração (Extraction Solution) e os tubos foram homogeneizados como descrito acima e incubados 5 minutos a temperatura ambiente. Todos os volumes, foram transferidos para as colunas de separação e centrifugados a

8.000 rpm durante 1 minuto. Os filtrados foram descartados e as colunas foram colocadas em outros tubos coletores. Foi adicionado novamente 500 μL de Solução de extração (Extraction Solution) e os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm durante 1 minuto. Os filtrados foram descartados e as colunas foram colocadas em outros tubos coletores. Foi adicionado 500μL de solução de lavagem (Wash Solution) e os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 3 minutos. Os filtrados foram descartados e as colunas transferidas para outro tubo de 1,5 mL e adicionado 100 μL de água a 70ºC para a eluição do DNA. Após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente, as colunas foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto e o DNA genômico extraído e pronto para ser utilizado em reação de PCR.

4.5. Técnicas de tipificação dos alelos HLA

A tipificação dos alelos HLA foi realizada com duas metodologias, descritas a seguir.

4.5.1. PCR-SSP

A metodologia de reação em cadeia da polimerase utiliza oligonucleotídeos iniciadores sequência específicos, do inglês: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers* (PCR-SSP) é baseada no princípio de que oligonucleotídeos iniciadores complementares são utilizados de forma mais eficaz, pela Taq polimerase recombinante, para amplificar uma sequência alvo do que um iniciador sem complementaridade perfeita. Os pares de iniciadores são delineados para apresentar apenas correspondências perfeitas com um único alelo ou grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de iniciadores com perfeita complementaridade traduzem-se na amplificação de sequências alvo (ou seja, um resultado positivo), enquanto que pares de iniciadores sem correspondência não se traduzem em amplificação (ou seja, um resultado negativo) (143).

A tipificação dos alelos HLA foi realizada pela metodologia SSP de acordo com as normas do fabricante do kit SSP Uni tray da Pel Freez. Os kits SSP utilizados são elaborados em placas para PCR de 96 poços, sendo que cada placa tipifica uma amostra, para os *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-C.

Para uma reação de PCR foi utilizado 32 µL do master mix (Kit), com 7,6 µL de DNA e 0,32 µL de Taq Polimerase adicionadas na placa de SSP Uny Tray ABC e colocada no termociclador , utilizando o seguinte programa: (Quadro 1).

Quadro 1: Programa da PCR-SSP

Passo	Temperatura ºC	Tempo	Nº de ciclos
1	96º C	02:00	1
2	96º C	00:15	10
	65º C	00:60	
3	96º C	00:10	20
	61º C	00:50	
	72º C	00:30	
4	4º C	infinito	1

Após a amplificação pela PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e tampão TBE 0,5x (Trizma base 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 0,01M em pH8,0), corados com brometo de etídeo na concentração final de 0,5µg/mL do gel e fotografados durante exposição à luz ultravioleta. A corrida eletroforética foi por 10 minutos á 150 Volts.

A interpretação dos resultados de PCR-SSP foi baseada na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado visualizado no gel.

Existe um par de iniciadores de controle interno incluído em todas as reações da PCR. Este par amplifica uma região conservada do gene da β-globina humana, presente em todas as amostras de DNA. O resultado de sua amplificação é a presença da banda do controle interno, a qual é usada para confirmar a integridade da reação de PCR. A banda visível entre ela deverá ser

considerada como banda de tipagem positiva. Na presença de uma banda de tipagem positiva, a banda do controle interno pode ser fraca ou ausente.

4.5.2. PCR-SSO Luminex

Além do método SSP descrito anteriormente, a caracterização dos alelos do gene HLA também foi feita pelo método de PCR-SSOP, empregando-se o *Kit LABType* SSO, fabricado por One Lambda Inc. Optou-se por mais de um método de tipagem devido ao número grande de amostras, o que levaríamos muito mais tempo utilizando-se somente o método SSP tipando uma amostra por vez, ao passo que , através da técnica SSO múltiplas amostras podem ser processadas e tipadas em uma só vez. Este motivo também levou à escolha de um *kit* comercial, desenvolvido por empresa com tradição em *kits* de diagnóstico para tipagem de alelos de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).

Todos os procedimentos para o uso do *Kit LABType SSO* foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, e consistem primeiramente em uma amplificação da região do gene de interesse, sendo o produto desta amplificação biotinilado. Este produto de PCR marcado é então desnaturado e mantido na forma de simples fita através do uso de tampões. O produto de PCR de fita simples é reibridizado com sonda de sequência específica. Estas sondas estão conjugadas na superfície de microesferas codificadas por cores. Após a rehibridização é feita a marcação com estreptavidina conjugada com ficoeritrina (SAPE).

As reações são lidas no citômetro de fluxo LABScan™, o qual emprega a tecnologia conhecida como Luminex, onde um laser de cor vermelha com comprimento de onda de 633nm reconhece a cor da microesfera e outro laser verde com comprimento de onda de 532nm reconhece se esta microesfera está ou não marcada com SAPE, o que determina sua positividade. As análises das tipagens foram realizadas com o auxílio do software *HLA Visual* versão 2.0 que faz a coleta de dados e a determinação dos alelos.

A metodologia de tipagem através da reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos-sonda sequência-específicos, do inglês: *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes* (PCR-SSOP) utilizada neste estudo emprega a tecnologia Luminex. Esta tecnologia consiste em um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas codificadas por cores que representam diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas em citômetro de fluxo. Microesferas codificadas por uma determinada cor contêm em sua superfície apenas sondas de oligonucleotídeos de mesma sequência, sendo assim, diferentes microesferas podem ser trabalhadas em um único tubo, substituindo o formato multi-poços convencional. A metodologia assemelha-se à técnica SSOP padrão, onde primeiramente a região alvo do DNA é amplificada e desnaturada, seguindo-se a hibridização com sondas marcadas e de sequência conhecida. No entanto, na tecnologia Luminex a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinilados, então, os produtos marcados são desnaturados e hibridizados em um único tubo com as sondas acopladas às microesferas. Por último faz-se a marcação com estreptavidina conjugada com ficoeritrina e a leitura da reação. Este método também é chamado de SSOP reverso devido ao fato das sondas estarem imobilizadas em uma superfície.

Reação de amplificação:

Foi adicionado em microtubo previamente identificado 1,0 µL de amostra de DNA genômico extraído. Em outro microtubo foi preparado uma mistura contendo os seguintes reagentes: D-Mix, a sonda específica e a enzima Taq polimerase, de acordo com o Quadro 2. O tubo foi agitado em um agitador tipo Vortex por 10 segundos e centrifugado rapidamente; e adicionado 5,6 µL em cada tubo contendo a amostra e colocado no termociclador para amplificação conforme programa citado no Quadro 3.

Quadro 2: Protocolo de Amplificação PCR-SSO

Nº de Reações	D-Mix (µL)	Sonda de Amplificação (µL)	Taq Polimerase 5U/µL (µL)
1	4,6µL	1,3µL	0,06µL
8	36,8µL	10,4µL	0,48µL
16	73,6µL	20,8µL	0,96µL
24	110,4µL	31,2µL	1,44µL
32	147,2µL	41,6µL	1,92µL
96	441,6µL	124,8µL	5,76µL

Quadro 3: Programa de amplificação PCR-SSO

Passo	Temperatura ºC	Tempo min	Nº de ciclos
1	96º C	03:00	1
	96º C	00:20	
2	60º C	00:20	5
	72º C	00:20	
	96º C	00:10	
3	60º C	00:15	30
	72º C	00:20	
4	72º C	10:00	1
5	4º C	infinito	1

Hibridização

Uma placa de PCR 96 orifícios (fundo em V) foi identificada conforme o *locus* a ser hibridizado. Em cada orifício foi adicionado 1 µL do tampão de desnaturação e 1,6 µL do produto amplificado para cada poço da placa de PCR seguindo a ordem dos respectivos locus e homogeneizado vigorosamente com a pipeta até obter uma coloração rosa forte. A placa foi selada com a tampa de silicone e agitada no agitador tipo Vortex e centrifugada por alguns segundos. A placa foi incubada por 10 minutos á temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado 1,6 µL do tampão de neutralização e a placa novamente agitada por alguns segundos até obter uma coloração amarela por igual.

Foi adicionado 12,6 µL do conjugado de microesferas com tampão de hibridização previamente preparado conforme Quadro 4 em cada poço e a placa agitada por alguns segundos e incubada à 60ºC por 15 minutos. Após a incubação foram realizadas três lavagens com 35 µL de tampão de lavagem em cada poço. Após a última lavagem foi adicionado 16 µL do substrato SAPE em cada poço preparado de acordo como o Quadro 5. A placa foi novamente agitada e incubada em 60ºC por 5 minutos. Após a incubação foi realizada uma lavagem com 35 µL com solução de lavagem e adicionado 60 µL de Sheath fluid. O conteúdo foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta e transferido para uma placa ELISA com fundo em V. A placa foi levada ao Labscan 100 para leitura e aquisição dos resultados e análise realizada através do programa Fusion versão 2.0.

Quadro 4: Protocolo de hibridização (Cálculo para as microesferas)

Nº Testes	Tampão Hibridação (µL)	microesferas (µL)
1	11,3µL	1,3µL
8	90,4µL	10,4µL
16	192,1µL	22,1µL
24	293,8µL	33,8µL
32	395,5µL	45,5µL
96	1130,0µL	130,0µL

Quadro 5: Protocolo de hibridização (Cálculo para o substrato-Sape)

Nº de Testes	Tampão SAPE (µL)	SAPE (µL)
1	16,5µL	0,16µL
8	132µL	1,28µL
16	264µL	2,56µL
24	396µL	3,84µL
32	528µL	5,12µL
96	1584µL	15,36µL

4.5.3. Tipificação de alta definição dos alelos HLA-B*57 pela metodologia da PCR-SSO Luminex

Todos os procedimentos para a realização da subtipagem dos alelos HLA-B*57 foram realizadas utilizando o *Kit LABType SSOH1D,* de acordo com as instruções do fabricante, conforme item 3.5.2.

4.6. Análise Estatística

A análise foi realizada em diferentes etapas. Inicialmente, foi feita a análise descritiva dos dados demográficos e laboratoriais iniciais dos participantes do estudo. Foram utilizadas somente a etnia e a idade entre as variáveis demográficas, pois a maioria dos participantes é do sexo masculino e referem sexo com homens, o que caracteriza viés de inclusão nas variáveis de gênero, forma de aquisição do HIV e comportamento sexual.

Para responder os objetivos do estudo foram descritos os resultados da carga viral, os níveis de linfócitos T CD4+ e CD8+ basais, seus valores máximos e mínimos durante todo o tratamento e os valores máximos e mínimos até o tratamento segundo a presença de cada alelo de interesse com uso de medidas resumo e comparados os valores das variáveis segundo a presença de cada alelo com uso de testes Mann-Whitney.

Como outro enfoque para a carga viral foi criada a categorização como <400 e >400 e verificada a existência de associação da categoria da carga viral e a presença dos alelos de interesse com uso de testes exatos de Fisher .

Para análise dos subtipos do alelo HLA-B*57, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1.- Características dos participantes da coorte

Foram incluídos no estudo 228 voluntários (até o fechamento da base de dados para análise), sendo 209 homens (91,6%), 194 deles que descreveram praticar sexo com homens (HSH, 85,5%). Eles foram preferencialmente recrutados nas áreas norte, sul e central da cidade de São Paulo, e encontram-se distribuídos nas diferentes etnias como descrito na Tabela 2. Entre todos os participantes, 126 são brancos (55,0%) com média de idade igual a 32 anos (extremos de 18 e 70 anos). Todos os voluntários referiram ter contraído o vírus por via sexual, nenhum deles relatou transfusão recente de sangue, uso de hemoderivados ou uso de drogas intravenosas como apresentado (Tabela 2).

Tabela 2: Características dos 228 indivíduos à entrada no estudo.

	Total	**Porcentagem**	**Mediana**	**Interquartil**	
				25%	**75%**
Sexo					
- masculino	209	91,6			
- feminino	19	8,4			
Etnia					
- brancos	126	55,0			
- mulatos	44	19,4			
- negros	15	6,6			
- outros *	43	19,0			
Exposição					
- HSH **	195	85,5			
- heterossexual	33	14,5			
Idade (anos)			30,8	24,8	36,3

* indígenas, asiáticos ou multirraciais
** HSH: homens que fazem sexo com homens

5.2. Avaliação laboratorial dos pacientes recém infectados pelo HIV-1

Vinte dos 228 participantes foram excluídos da análise, pois o valor de linfócitos T ou a carga viral do HIV-1 não era disponível na visita inicial. Entre os 208 restantes, a mediana da contagem dos linfócitos T CD4+ T foi 520 células/μL(cel/μL), refletindo a imunidade celular relativamente preservada, compatível com infecção recente adquirida pelo HIV, junto com alta contagem dos linfócitos T CD8+. A carga viral também foi compatível com infecção recente. Estes resultados podem ser observados na Tabela 3.

A mediana do resultado da contagem de linfócitos T CD4+ na primeira coleta de sangue (V1, visita nº1) do estudo foi de 520 células/μL (interquartil 25-75% [IQ], 402–698), de linfócitos T CD8+ foi de 912 células/μL (IQ 631–1.199) e a mediana da carga viral 20.300 cópias/mL (IQ 33.875-64.076), que em escala logarítmica (log_{10}) corresponde a 4,3 (IQ 3,6–4,8). Os achados laboratoriais à inclusão estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Achados Laboratoriais

Variáveis Laboratoriais	Mediana	Interquartil 25%	Interquartil 75%
Linfócitos T CD4+ (céls./μl)	520	402	698
Linfócitos T CD8+ (céls./μl)	912	631	1199
Carga viral HIV-RNA			
- cópias/ml	20.300	3.875	64.076
- log_{10}	4,3	3,6	4,8

5.3. Tipificação dos alelos HLA

Dos 228 indivíduos da coorte, todos foram tipificados para os alelos HLA-A, HLA-B, HLA-C e os resultados estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Tipificação dos alelos HLA da coorte de pacientes recém infectados pelo HIV-1. Legenda: (-), indica homozigose para o alelo expresso ou alelo não descrito.

AMOSTRA	TÉCNICA	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
1001	SSO	A*30	A*33	B*42	-	C*17	-
1002	SSP	A*02	A*11	B*27	B*35	C*02	C*04
1004	SSP	A*02	A*26	B*38	B*44	C*12	C*14
1005	SSP	A*02	A*31	B*15	B*39	C*04	C*07
1006	SSP/SSO	A*33	A*68	B*07	B*15	C*07	C*15
1008	SSO	A*24	-	B*07	B*15	C*07	-
1009	SSP/SSO	A*31	A*68	B*07	B*44	C*07	-
1010	SSO	A*31	A*68	B*39	**B*57**	C*07	-
1011	SSP	A*31	A*68	B*35	B*40	C*03	C*04
1012	SSP	A*01	A*32	B*14	**B*57**	C*07	C*08
1013	SSO	A*02	A*26	B*27	B*35	C*01	C*04
1015	SSP	A*03	A*68	B*40	B*35	C*03	C*04
1016	SSP	A*02	-	B*51	**B*57**	C*02	C*15
1017	SSP	A*24	A*26	B*35	B*38	C*12	-
1018	SSP	A*23	A*24	B*18	B*50	C*05	C*06
1019	SSP	A*02	A*03	B*39	B*35	C*03	C*12
1020	SSO	A*02	A*80	B*44	B*51	C*05	C*16
1021	SSO	A*24	A*68	B*35	B*58	C*04	C*06
1022	SSP	A*02	-	B*14	B*52	C*08	C*12
1024	SSP	A*02	-	B*27	B*44	C*05	-
1025	SSP	A*11	A*74	B*35	B*40	C*04	-
1026	SSP	A*02	-	B*15	B*51	C*15	-
1027	SSP	A*01	A*68	B*58	B*81	C*06	C18
1028	SSP/SSO	A*23	A*68	B*14	B*45	C*08	C*16
1029	SSP	A*23	A*29	B*18	B*53	C*05	C*06
1030	SSP	A*02	A*30	B*15	B*51	C*03	C*15
1031	SSP	A*02	A*30	B*14	B*35	C*07	C*08
1032	SSP	A*02	A*66	B*35	B*58	C*03	C*07
1033	SSP	A*01	A*02	B*18	B*51	C*02	C*05
1034	SSP	A*02	A*03	B*15	**B*57**	C*02	C*08
1035	SSP	A*01	A*03	B*08	B*40	C*02	C*07
1036	SSP	A*11	A*32	B*07	B*40	C*02	C*07
1037	SSO	A*30	A*30	B*18	B*42	C*05	C*17
1038	SSP/SSO	A*24	A*68	B*39	B*50	C*06	C*07
1039	SSO	A*01	A*01	B*37	-	C*06	-
1040	SSO	A*02	A*03	B*07	B*49	C*07	-
1041	SSO	A*30	A*31	B*14	-	C*08	-
1042	SSP	A*03	A*11	B*07	B*35	C*04	C*07
1043	SSP	A*01	A*32	B*27	B*37	C*02	C*06
1044	SSO	A*24	A*30	B*14	B*35	C*08	C*12
1046	SSP	A*03	A*31	B*15	B*39	C*03	C*07
1047	SSO	A*26	A*34	B*51	B*53	C*04	C*16
1048	SSO	A*02	A*32	B*14	B*44	C*05	C*08
1049	SSP/SSO	A*02	A*80	B*14	B*41	C*08	C*17
1050	SSP	A*03	A*33	B*15	B*27	C*01	C*16
1052	SSP	A*02	A*31	B*15	B*50	C*04	C*06
1053	SSP	A*01	A*68	B*07	**B*57**	C*06	C*07
1054	SSP	A*01	A*68	B*08	B*51	C*07	C*08
1055	SSO	A*02	A*11	B*41	B*51	C*04	C*17

Continuação Tabela 4

AMOSTRA	TÉCNICA	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
1056	SSO	A*01	A*66	B*08	B*39	C*07	C*12
1057	SSP	A*02	A*29	B*07	B*49	C*07	C*15
1058	SSP	A*02	A*03	B*44	B*51	C*07	C*14
1059	SSP	A*01	A*02	B*18	B*42	C*12	C*17
1060	SSP	A*30	A*32	B*14	**B*57**	C*08	C*18
1061	SSO	A*02	A*30	B*07	B*42	C*02	C*17
1062	SSO	A*02	A*30	B*44	B*45	C*05	C*17
1064	SSP	A*02	A*32	B*49	B*58	C*07	-
1065	SSP	A*02	A*68	B*39	B*58	C*07	C*08
1066	SSO	A*02	-	B*07	B*53	C*04	C*07
1068	SSP	A*03	A*29	B*07	B*58	C*07	-
1069	SSO	A*02	A*66	B*38	**B*57**	C*06	C*12
1070	SSP	A*02	A*31	B*08	B*44	C*04	C*07
1071	SSP	A*03	A*24	B*27	B*35	C*04	C*15
1072	SSP	A*02	A*11	B*07	B*48	C*04	C*07
1073	SSP	A*01	A*34	B*35	**B*57**	C*07	C*18
1074	SSP	A*02	A*03	B*15	B*38	C*03	C*12
1075	SSO	A*23	A*30	B*42	B*53	C*04	C*17
1076	SSP	A*11	A*26	B*08	B*35	C*04	C*07
1077	SSO	A*03	A*32	B*40	B*44	C*02	C*16
1078	SSP	A*02	A*30	B*44	B*81	C*16	C*18
1079	SSO	A*30	A*33	B*14	-	C*08	-
1080	SSO	A*01	A*74	B*15	-	C*02	C*03
1081	SSP	A*03	A*23	B*14	B*44	C*04	C*08
1082	SSO	A*01	A*23	B*38	B*50	C*06	C*12
1084	SSO	A*01	A*30	B*49	B*58	C*06	C*07
1085	SSO	A*02	-	B*49	B*51	C*07	-
1087	SSO	A*11	A*24	B*08	B*52	C*07	C*15
1088	SSO	A*26	A*30	B*14	B*42	C*08	C*17
1089	SSP	A*11	A*32	B*08	B*53	C*06	C*07
1090	SSP	A*02	A*30	B*18	B*45	C*05	C*16
1092	SSO	A*03	A*68	B*35	B*47	C*04	C*06
1093	SSO	A*02	-	B*15	B*35	C*04	C*07
1094	SSO	A*02	A*31	B*39	B*51	C*07	C*15
1095	SSO	A*11	-	B*15	B*35	C*03	C*04
1096	SSO	A*02	A*30	B*07	B*44	C*05	C*07
1097	SSO	A*01	A*11	B*44	B*58	C*05	C*18
1098	SSP	A*03	A*26	B*27	**B*57**	C*01	C*18
1099	SSO	A*02	A*29	B*39	B*44	C*07	C*16
1100	SSP	A*03	A*11	B*35	B*41	C*04	C*17
1102	SSP	A*01	A*03	B*07	B*27	C*02	C*07
1103	SSP	A*01	A*02	B*35	**B*57**	C*04	C*06
1104	SSO	A*01	A*02	B*49	**B*57**	C*06	C*07
1105	SSP	A*02	A*29	B*15	B*27	C*01	C*03
1106	SSP	A*26	A*74	B*15	B*44	C*03	C*05
1107	SSO	A*02	-	B*14	B*44	C*08	C*16
1108	SSP	A*01	A*02	B*15	B*51	C*07	C*14
1109	SSP	A*03	-	B*15	B*49	C*03	C*07
1110	SSP	A*02	A*23	B*44	B*49	C*03	C*07
1111	SSO	A*03	A*24	B*07	-	C*07	-
1112	SSO	A*11	A*23	B*15	B*35	C*03	-
1113	SSO	A*26	A*68	B*35	B*40	C*02	C*03

Continuação Tabela 4

AMOSTRA	TÉCNICA	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
1114	SSO	A*26	A*66	B*35	B*49	C*04	C*07
1115	SSO	A*33	A*68	B*44	B*49	C*03	C*04
1116	SSO	A*02	A*24	B*14	B*50	C*06	C*08
1117	SSO	A*24	A*30	B*08	B*41	C*03	C*07
1118	SSO	A*24	A*33	B*14	B*18	C*08	C*12
1119	SSO	A*32	A*69	B*14	B*15	C*07	C*08
1120	SSO	A*02	-	B*15	B*44	C*04	C*15
1121	SSO	A*01	A*03	B*15	B*37	C*06	C*12
1122	SSO	A*02	A*26	B*51	-	C*12	C*14
1123	SSO	A*01	A*30	B*14	**B*57**	C*06	C*08
1124	SSO	A*26	A*30	B*13	B*39	C*06	C*12
1125	SSO	A*11	A*68	B*15	B*55	C*03	C*14
1126	SSO	A*24	A*26	B*38	B*52	C*12	-
1127	SSO	A*11	A*24	B*14	B*35	C*02	-
1128	SSO	A*01	A*26	B*08	B*18	C*07	-
1129	SSO	A*02	A*24	B*18	B*51	C*07	C*14
1130	SSO	A*01	A*24	B*08	B*15	C*03	C*07
1131	SSO	A*02	A*32	B*08	B*44	C*05	C*07
1132	SSO	A*02	A*32	B*42	B*49	C*07	C*17
1133	SSO	A*24	A*26	B*15	B*44	C*03	C*05
1134	SSO	A*01	A*02	B*37	B*58	C*06	C*07
1135	SSO	A*02	A*24	B*14	B*18	C*08	C*18
1136	SSO	A*24	A*31	B*14	B*39	C*02	C*07
1137	SSO	A*02	A*36	B*40	B*53	C*04	C*15
1138	SSO	A*11	A*24	B*35	B*44	C*03	C*05
1139	SSO	A*02	A*11	B*49	B*58	C*07	C*07
1140	SSO	A*02	-	B*27	B*44	C*02	C*16
1141	SSO	A*11	A*24	B*45	B*52	C*12	C*16
1142	SSO	A*02	A*23	B*35	B*45	C*04	C*16
1143	SSO	A*02	A*24	B*07	B*18	C*07	C*12
1144	SSO	A*02	A*24	B*15	-	C*07	C*16
1145	SSO	A*03	A*23	B*35	B*44	C*04	-
1146	SSO	A*24	A*31	B*35	B*40	C*02	C*04
1147	SSO	A*02	A*29	B*44	B*58	C*07	C*16
1148	SSO	A*01	A*02	B*18	B*45	C*05	C*16
1149	SSO	A*24	A*26	B*08	B*38	C*07	C*12
1150	SSO	A*01	A*02	B*38	B*51	C*12	C*15
1151	SSO	A*24	A*68	B*15	-	C*03	-
1152	SSO	A*02	A*24	B*15	B*41	C*03	C*16
1153	SSO	A*30	A*32	B*18	B*40	C*02	C*05
1154	SSO	A*03	A*34	B*15	B*44	C*04	C*16
1155	SSO	A*24	A*32	B*13	B*40	C*03	-
1156	SSO	A*02	A*24	B*27	B*49	C*01	C*05
1158	SSO	A*01	A*24	B*35	B*37	C*06	C*12
1159	SSO	A*23	A*66	B*37	B*58	C*06	-
1160	SSO	A*02	A*03	B*18	B*44	C*05	-
1161	SSO	A*02	A*30	B*18	**B*57**	C*05	C*06
1162	SSO	A*03	A*24	B*15	B*40	C*03	-
1163	SSO	A*01	A*32	B*38	B*49	C*07	C*12
1164	SSO	A*29	-	B*18	B*44	C*12	C*16
1165	SSO	A*26	A*33	B*07	B*14	C*08	C*15
1166	SSO	A*24	A*32	B*35	B*51	C*04	C*14

Continuação Tabela 4

AMOSTRA	TÉCNICA	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
1168	SSO	A*02	-	B*35	B*40	C*03	C*04
1169	SSO	A*02	-	B*07	B*41	C*07	C*17
1170	SSO	A*02	-	B*07	B*51	C*07	C*14
1171	SSO	A*02	A*32	B*14	B*48	C*04	C*08
1172	SSO	A*24	A*32	B*15	B*73	C*03	C*15
1173	SSO	A*26	A*68	B*15	**B*57**	C*03	C*06
1174	SSO	A*23	A*24	B*44	**B*57**	C*07	C*16
1175	SSO	A*02	A*68	B*39	B*48	C*04	C*07
1176	SSO	A*31	A*68	B*39	B*53	C*04	C*07
1177	SSO	A*31	A*68	B*15	B*35	C*03	C*04
1178	SSO	A*02	-	B*44	B*51	C*05	C*15
1179	SSO	A*02	A*30	B*42	B*44	C*05	C*17
1180	SSO	A*31	A*68	B*45	B*48	C*04	C*06
1181	SSO	A*24	A*30	B*08	B*35	C*03	C*04
1182	SSO	A*02	A*33	B*15	B*40	C*03	-
1183	SSO	A*02	A*68	B*27	B*39	C*05	C*07
1184	SSO	A*24	A*68	B*14	B*18	C*05	C*08
1185	SSO	A*02	A*31	B*15	B*44	C*03	C*05
1186	SSO	A*02	A*32	B*07	B*15	C*03	C*07
1187	SSO	A*02	A*31	B*50	B*51	C*06	C*15
1188	SSO	A*03	A*29	B*07	B*41	C*15	C*17
1189	SSO	A*24	A*30	B*15	-	C*01	C*03
1190	SSO	A*02	A*24	B*35	B*52	C*03	C*12
1191	SSO	A*24	A*68	B*15	B*40	C*03	-
1192	SSO	A*01	A*30	B*13	B*15	C*03	C*06
1193	SSO	A*02	A*31	B*40	B*51	C*03	C*15
1194	SSO	A*03	A*26	B*27	B*40	C*02	-
2004	SSO	A*23	-	B*45	B*49	C*06	C*07
2005	SSO	A*02	A*11	B*39	B*58	C*07	C*12
2006	SSO	A*02	-	B*07	B*35	C*04	C*07
2008	SSO	A*24	A*26	B*35	B*38	C*04	C*12
2009	SSO	A*01	A*29	B*08	B*44	C*07	C*16
2010	SSO	A*03	A*26	B*14	B*35	C*04	C*08
2011	SSO	A*01	A*24	B*18	B*49	C*07	C*12
2012	SSO	A*02	A*25	B*15	B*39	C*07	C*12
2013	SSO	A*01	A*33	B*14	B*37	C*06	C*08
2014	SSO	A*24	-	B*39	B*44	C*02	C*07
2015	SSO	A*02	A*68	B*40	B*44	C*03	C*04
2016	SSP	A*02	A*11	B*35	B*44	C*04	C*16
2017	SSP	A*02	A*11	B*35	B*39	C*04	C*07
2018	SSO	A*02	-	B*44	B*51	C*05	C*14
2019	SSO	A*02	A*33	B*51	B*58	C*01	C*03
2020	SSO	A*02	A*29	B*07	B*44	C*07	C*16
2021	SSO	A*02	-	B*35	B*51	C*02	C*04
2023	SSO	A*02	A*25	B*18	B*58	C*06	C*12
2024	SSO	A*32	-	B*07	B*35	C*04	C*07
2025	SSO	A*29	A*32	B*40	B*49	C*02	C*07
2026	SSP	A*01	A*02	B*18	B*51	C*02	C*05
2027	SSO	A*23	A*24	B*08	B*51	C*07	-
2028	SSO	A*02	A*23	B*35	B*45	C*04	C*16
2029	SSO	A*02	A*23	B*49	B*51	C*07	C*16
2031	SSO	A*24	A*30	B*08	B*35	C*03	C*04

Continuação Tabela 4

AMOSTRA	TÉCNICA	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
2032	SSO	A*01	A*24	B*08	B*35	C*07	C*12
2033	SSO	A*02	A*34	B*07	B*58	C*06	C*07
2036	SSO	A*03	A*24	B*14	B*15	C*03	C*08
2037	SSO	A*33	A*68	B*53	B*58	C*03	C*04
2038	SSO	A*01	A*11	B*51	**B*57**	C*06	C*15
2039	SSO	A*32	A*33	B*45	B*49	C*06	C*07
2040	SSO	A*01	A*03	B*07	B*35	C*04	C*07
2041	SSO	A*02	-	B*35	B*50	C*04	C*06
2042	SSO	A*02	A*68	B*15	B*39	C*02	C*12
2043	SSO	A*02	A*23	B*35	B*41	C*03	C*08
2044	SSO	A*02	A*30	B*15	B*18	C*03	C*07
2045	SSO	A*11	A*24	B*35	B*55	C*03	C*04
2046	SSO	A*02	-	B*15	B*35	C*04	-
2047	SSO	A*02	A*74	B*18	B*40	C*02	C*03
2048	SSO	A*02	A*11	B*44	B*50	C*04	C*06
2049	SSO	A*02	A*29	B*44	B*51	C*15	C*16
2050	SSO	A*01	A*24	B*08	B*40	C*07	C*15
2051	SSO	A*01	A*02	B*08	B*51	C*07	C*14
2052	SSO	A*02	A*24	B*18	B*35	C*04	C*07
2053	SSO	A*02	A*24	B*39	B*59	C*01	C*07
2054	SSO	A*03	-	B*07	B*38	C*07	C*12
2055	SSO	A*31	A*33	B*44	-	C*02	C*07
2056	SSO	A*01	A*01	B*38	B*39	C*12	-

Legenda: (-), indica homozigose para o alelo expresso ou alelo não descrito.

5.3.1. Demonstração da frequência dos alelos HLA-A, HLA-B, HLA-C na coorte estudada.

Como podemos observar os alelos mais frequentes na população estudada foram: A*02 (46,5%), B*15 (18,9%), B*35 (21,9%) e B*44 (18,0 %), e C*07 (38,6%) e C*04 (25,0%). O presente estudo, entretanto, não teve como objetivo se configurar como um estudo populacional. Os alelos mais frequentes em todos os *locus* estão demonstrados na Figura 10A, 10B,e 10C respectivamente.

As frequências dos alelos são relativas ao total de 228 participantes. A frequência foi analisada, excluindo os alelos que não apresentaram uma relevância significativa (menor que cinco casos expressando o alelo).

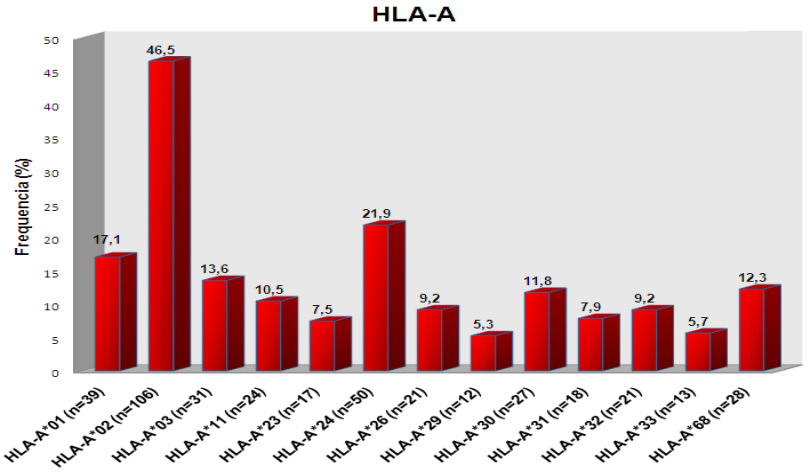


Figura 10 A- Frequência dos grupos alélicos do gene HLA- A

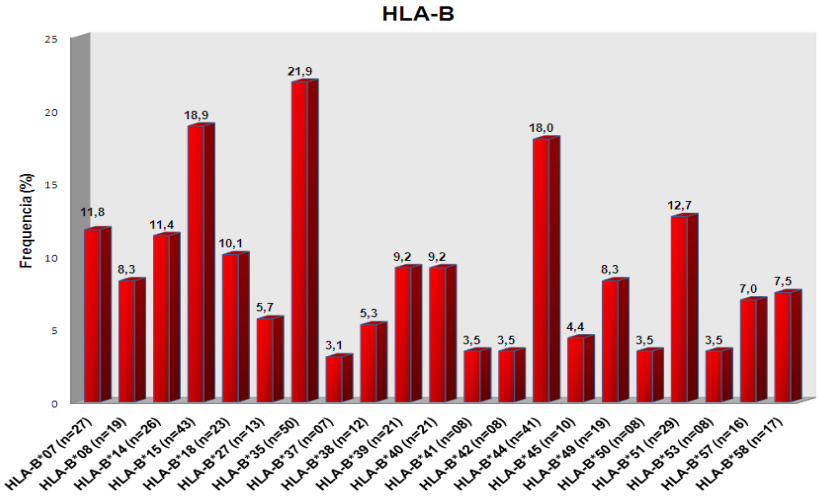


Figura 10 B- Frequência dos grupos alélicos do gene HLA-B

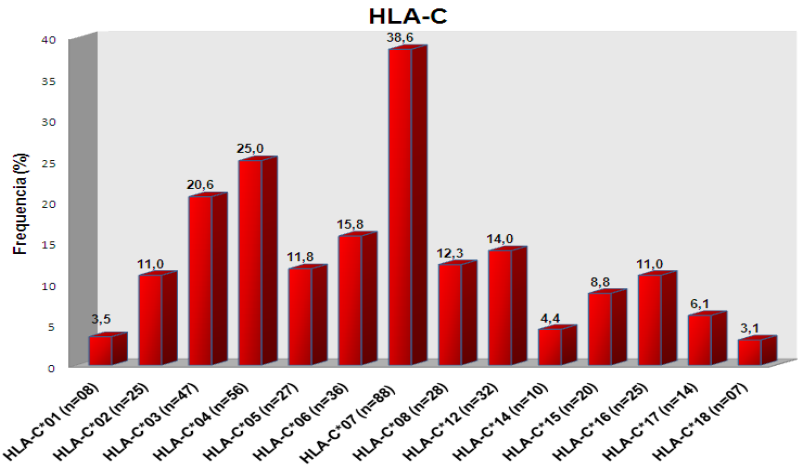


Figura 10 C- Frequência dos grupos alélicos do gene HLA-C

Dos 228 indivíduos tipificados para os alelos HLA, encontramos 14% do haplótipo B*35/C*04.

5.4. Correlação entre as variáveis laboratoriais (contagem de linfócitos T CD4+, CD8+ e Carga Viral) e os alelos HLA Classe I*, locus* A, B e C.

Dos 228 indivíduos tipificados para os alelos HLA-A, HLA-B e HLA-C, 20 foram excluídos desta análise. A análise dos demais demonstrou algum efeito protetor para progressão para AIDS no *locus* B em relação a carga viral (p=0,021) enquanto que para os alelos dos *locus* HLA-A e HLA-C nesta coorte estudada o valor de p não foi significativo; p>0,05 (Figuras 11,12 e13).

Figura 11. Análise comparativa entre os alelos HLA classe I *locus* A com as variáveis laboratoriais.

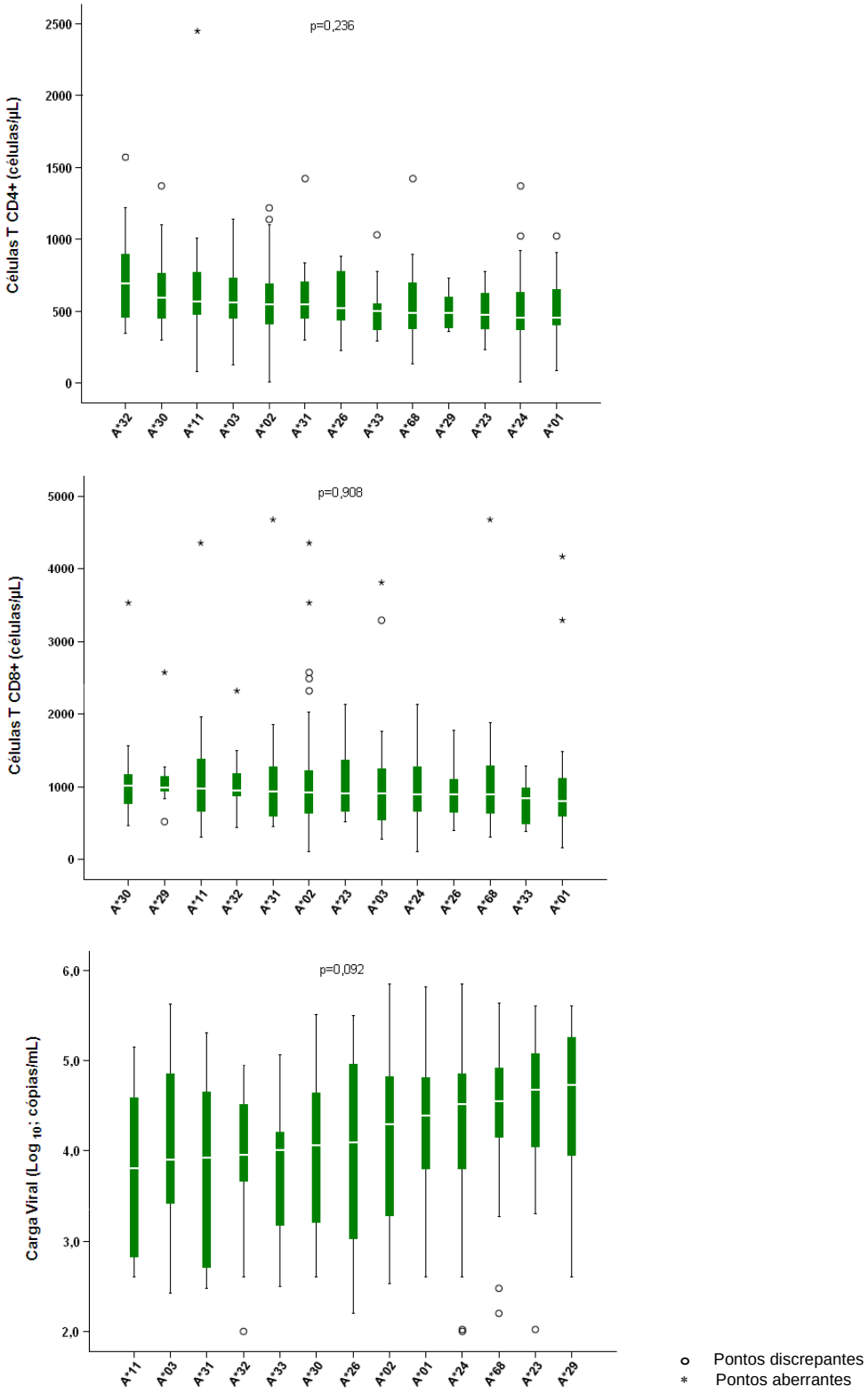


Figura 12. Análise comparativa entre os alelos HLA classe I, *locus* B, com as variáveis laboratoriais.

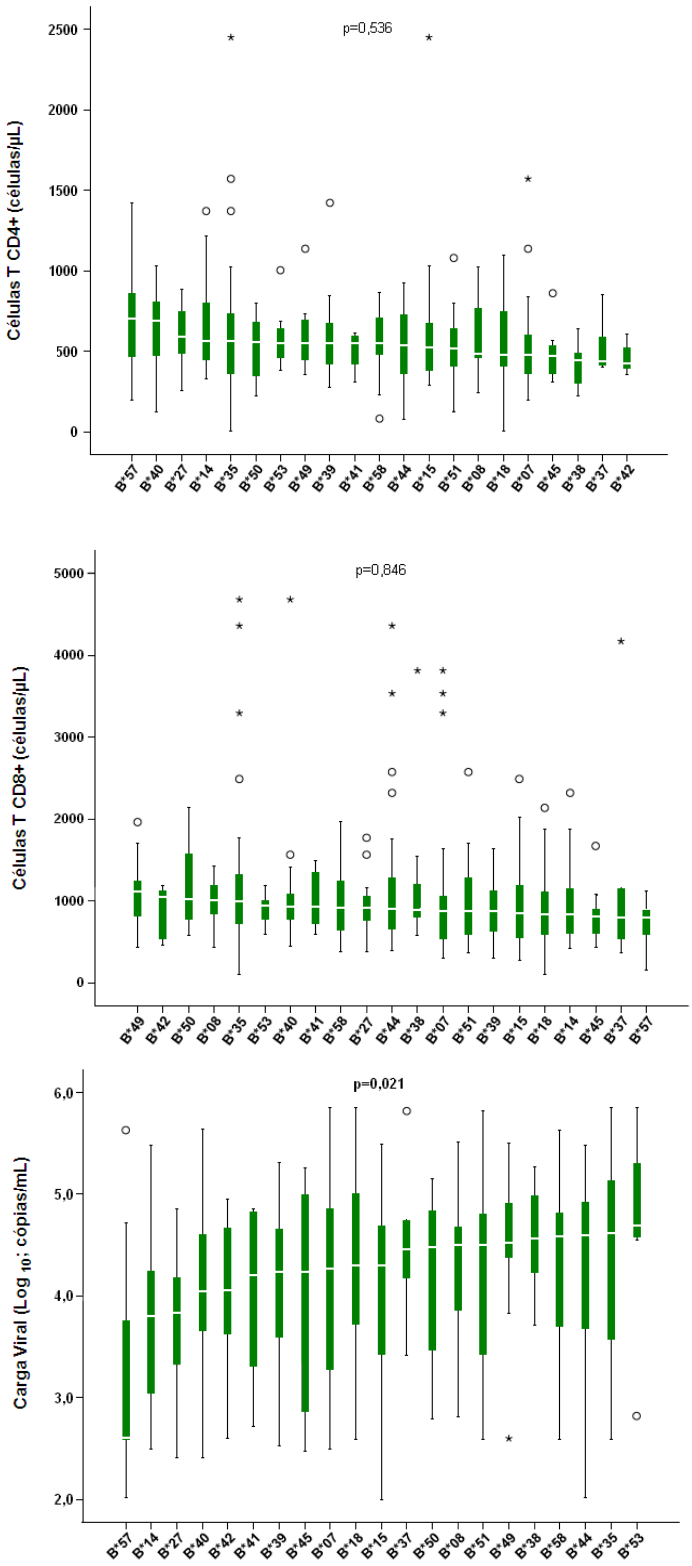
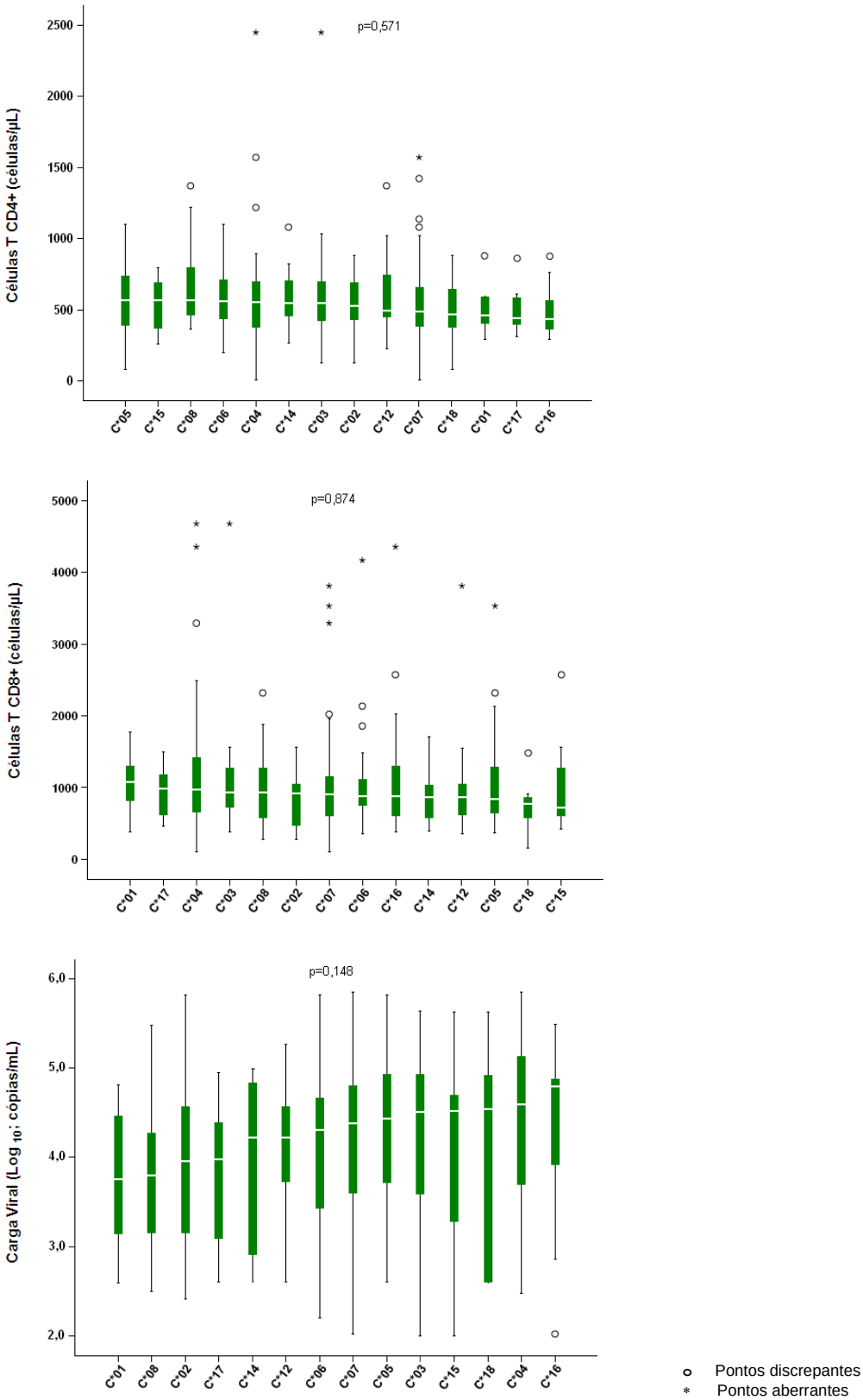


Figura 13. Análise comparativa entre os alelos HLA classe I *locus* C com as variáveis laboratoriais.



5.5. Comparação da contagem de linfócitos T CD4+ entre os indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57

Dos 228 pacientes tipificados para o *locus* B do HLA, não foi possível correlacionar as variáveis laboratoriais em 20 casos, que foram excluídos por não preencher os critérios de inclusão para esta análise. Dos demais, 208 indivíduos analisados para o *locus* B, 15 indivíduos (7,2%) expressam o alelo HLA-B*57.

O alelo HLA-B*57 foi fortemente correlacionado com os indivíduos que apresentam melhores parâmetros laboratoriais. A presença do HLA-B*57 foi associada com níveis basais de linfócitos T CD4+, nível mínimo durante todo o seguimento e contagem mínima sem terapia antirretroviral estatisticamente maiores com valores de p significativos, p=0,043, p= 0,034 e p=0,036 quando comparados com os indivíduos que não expressam este alelo. Embora o valor de p não tenha sido significativo p=0,059 e p=0,060 observamos valores mais elevados de linfócitos T CD4+ máximos durante todo o seguimento e na ausência de terapia antirretroviral respectivamente quando comparados aos indivíduos que não expressam este alelo (Figura 14).

Figura 14. Comparação da contagem de linfócitos T CD4+ entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57

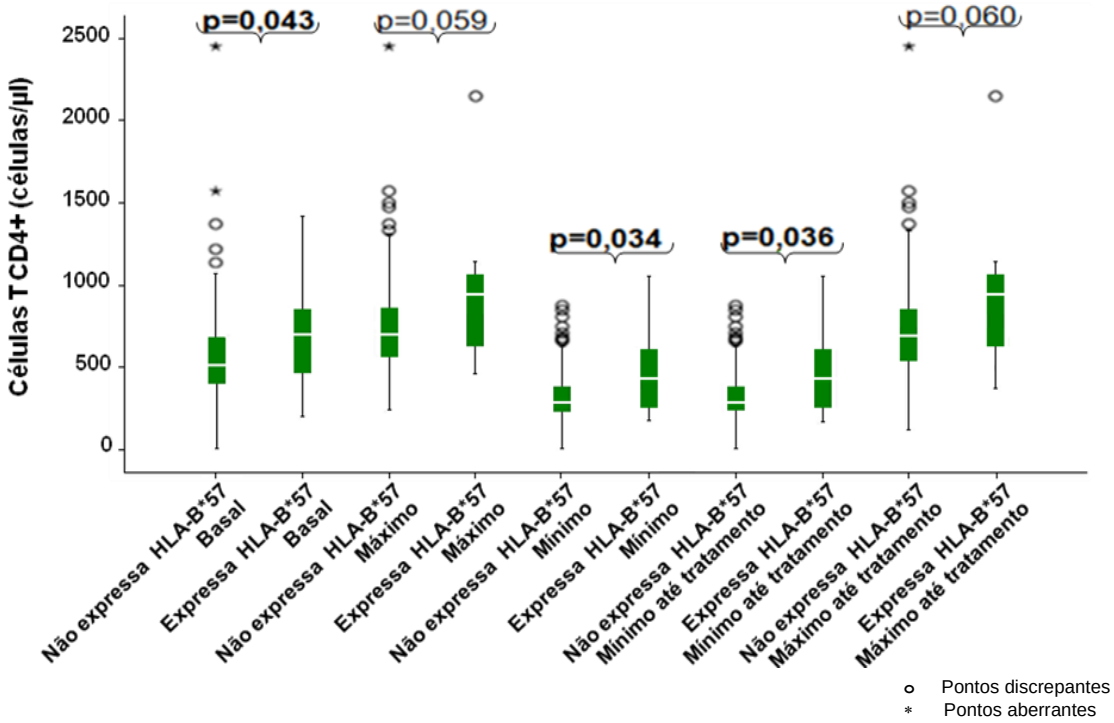


Tabela 5: Comparação da contagem de linfócitos T CD4+ entre indivíduos que expressam e não expressam alelo HLA-B*57

Variável	Alelo HLA-B*57	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
CD4+ mínimo até o tratamento	não expressa	327,89	145,90	289	7	876	193	**0,036**
	expressa	449,80	231,60	434	172	1055	15	
CD4+ máximo até o tratamento	não expressa	727,19	284,85	684	128	2449	193	**0,060**
	expressa	908,73	423,70	942	372	2147	15	

DP: Desvio Padrão, N: número de participantes da coorte

A Tabela 5 demonstra que pacientes sem tratamento que expressam o alelo B*57 apresentam estatisticamente maiores níveis de linfócitos T CD4+ mínimos quando comparados com os indivíduos que não expressam este alelo (p=0, 036). Observam-se, também, valores mais elevados de linfócitos T CD4+ máximos nos pacientes sem tratamento que expressam o alelo B*57, embora não apresente diferença estatisticamente significante (p=0, 060).

5.6. Comparação da contagem de linfócitos T CD8+ entre indivíduos que expressam e não expressam HLA-B*57.

Em relação à contagem de linfócitos T CD8+, podemos observar uma contagem menor inicial, máxima e mínima durante todo o seguimento e mínimo sem terapia antirretroviral nos indivíduos que expressam o alelo HLA-B*57; p=0, 030, p=0, 031, p=0, 041 e p=0, 013 respectivamente. Os valores máximos da contagem de linfócitos T CD8+ nos indivíduos sem terapia antirretroviral não mostraram diferença significante, p=0, 077, embora, as contagens sejam menores nos indivíduos que expressam o alelo HLA-B*57 (Figura 15).

Figura 15: Comparação da contagem de linfócitos T CD8+ entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57

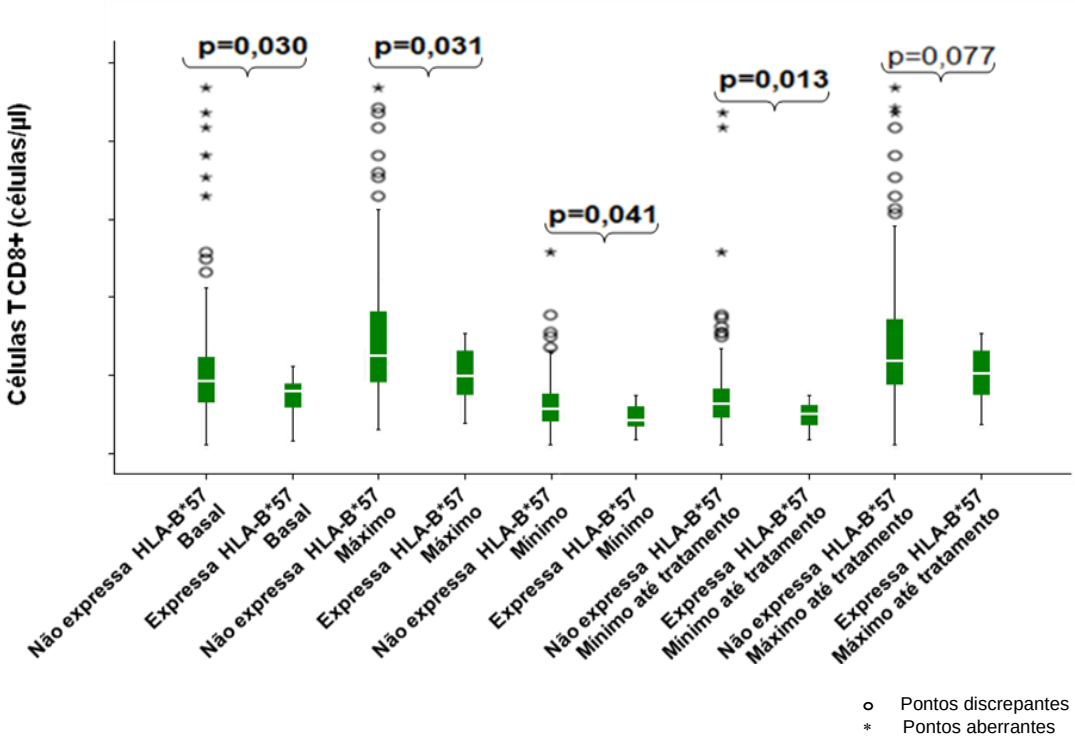


Tabela 6: Comparação da contagem de linfócitos T CD8+ entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57

Variável	Alelo HLA-B*57	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
CD8+ mínimo até o tratamento	não expressa	720,03	492,89	646	106	4358	193	**0,013**
	expressa	482,73	174,85	503	164	747	15	
CD8+ máximo até o tratamento	não expressa	1391,47	796,18	1189	106	4680	193	**0,077**
	expressa	1017,07	370,65	1009	360	1527	15	

DP: desvio padrão, N: número de participantes da coorte

A Tabela 6 demonstra que os indivíduos que expressam o alelo HLA-B*57 apresentam menores níveis de CD8+ mínimos estatisticamente significante (p=0,013) quando comparados aos indivíduos que não expressam este alelo. Observam-se, também, valores menores de CD8+ máximos nos indivíduos sem tratamento, que expressam o alelo HLA B*57, porém não estatisticamente significativos (p=0, 077).

5.7. Comparação do nível da carga viral entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57

A presença do HLA B*57 demonstrou estar associada a níveis virêmicos menores quando comparado aos indivíduos que não expressam este alelo, na V1, durante todo seguimento com carga viral máxima menor, antes do tratamento antirretroviral com carga viral mínima e máxima menores; p=0, 001, p=<0, 001, p=0, 006 e p=<0, 001, respectivamente (Figura 16).

Figura 16: Comparação do nível da carga viral entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57

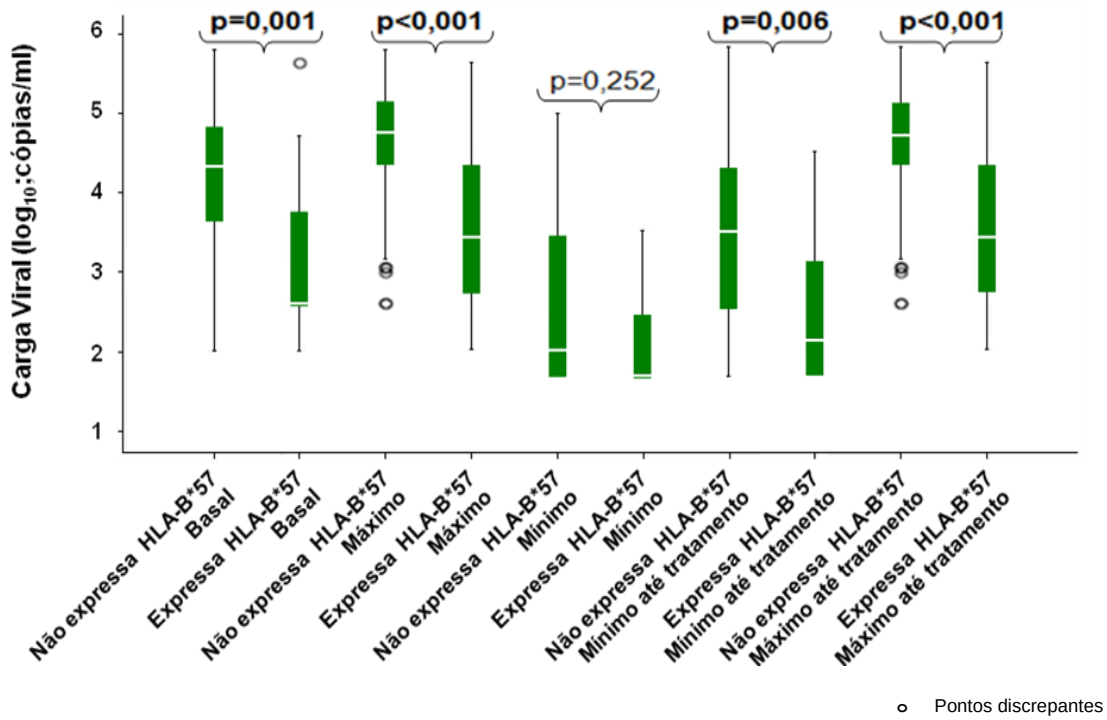


Tabela 7 : Comparação do nível da carga viral entre indivíduos que expressam e não expressam o alelo HLA-B*57

Variável	Alelo HLA-B*57	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Carga Viral mínima até o tratamento	não expressa	29481,24	90047,65	3247	49	704000	193	**0,006**
	expressa	4368,53	10103,24	139	49	33100	15	
Carga Viral máxima até o tratamento	não expressa	109431,27	139636,57	52500	399	704000	193	**<0,001**
	expressa	68096,87	149400,48	2756	105	437000	15	

DP: desvio padrão, N: número de participantes da coorte

A Tabela 7 demonstra que os indivíduos que possuem o alelo HLA-B*57 sem tratamento apresentam cargas virais mínimas e máximas estatisticamente

menores (p=0, 006 e p<0, 001 respectivamente), quando comparado aos indivíduos que não apresentam este alelo.

5.8 Parâmetros laboratoriais de 15 indivíduos com alelo HLA B*57

Dos 15 indivíduos que expressam o HLA-B*57, oito (53,3%) apresentaram-se com a viremia menor que 400 cópias/ml na visita inicial (Grupo A) (limite de detecção do teste de carga viral ao início da coorte) na ausência de terapia antirretroviral e sete (46,6%) apresentaram-se com viremia maior que 400 cópias/mL (Grupo B) (Tabela 8).

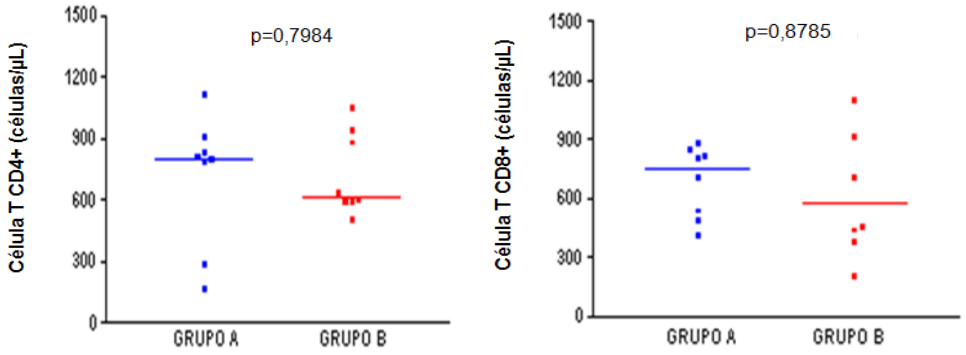
Tabela 8- Parâmetros laboratoriais de 15 indivíduos com alelo HLA-B*57. O primeiro grupo consiste naqueles com carga viral abaixo de 400 cópias/mL e o segundo com carga viral acima de 400 cópias/mL, na primeira visita.

	TRATADO	LOCUS A	LOCUS B	LOCUS C	V1 CD4	V1 CD8	V1 CV
Grupo A							
1034	N	A*02, A*03	B*15:10, **B*57:02**	C*02, C*08	534	283	**<400**
1060	N	A*30, A*32	B*14:02, **B*57:03**	C*08, C*18	799	904	**<400**
1073	N	A*01, A*34	B*35:03, **B*57:01**	C*07, C*18	486	164	**<400**
1098	N	A*03, A*26	B*27:05, **B*57:03**	C*01, C*18	879	812	**<400**
1103	N	A*01, A*02	B*35:05, **B*57:01**	C*04, C*06	813	796	**<400**
1123	N	A*01, A*30	B*14:02, **B*57:01**	C*06,C*08	702	1116	**<400**
1173	N	A*26, A*68	B*15:20, **B*57:01**	C*03, C*06	839	830	**<400**
1174	N	A*23, A*24	B*44:03, **B*57:03**	C*07, C*16	404	784	**<400**
				Mediana	751	804	**<400**
				percentil 25%	522	659	**<400**
				percentil 75%	820	849	**<400**
Grupo B							
1010	N	A*31, A*68	B*39:03, **B*57:03**	C*07, -------	1422	877	3800
1012	N	A*01, A*32	B*14:01, **B*57:01**	C*07, C*08	910	633	6330
1016	S	A*02, -------	B*51, **B*57:01**	C*02, C*15	372	1049	426000
1053	S	A*01, A*68	B*07:02, **B*57:01**	C*06, C*07	198	503	24500
1104	N	A*01, A*02	B*49:01, **B*57:01**	C*06, C*07	451	593	51900
1161	N	A*02, A*30	B*18:01, **B*57:01**	C*05, C*06	1098	938	906
2038	N	A*01, A*11	B*51, **B*57:01**	C*06, C*15	698	589	5100
				Mediana	698	633	6330
				percentil 25%	412	591	4450
				percentil 75%	1004	908	38200

Legenda: V1 (Visita 1), N (Não tratado), S (Em tratamento).

Embora tenha sido demonstrada uma diferença significativa em relação à carga viral basal (p=0,0002) entre o grupo A e grupo B, a contagem linfócitos T CD4+, CD8+ não apresentou diferença significativa, (p=0,7984 e p=0,8785) respectivamente, confirmando que o alelo HLA-B*57 desempenha um papel protetor em pacientes recém infectados pelo HIV-1 (Figura 17).

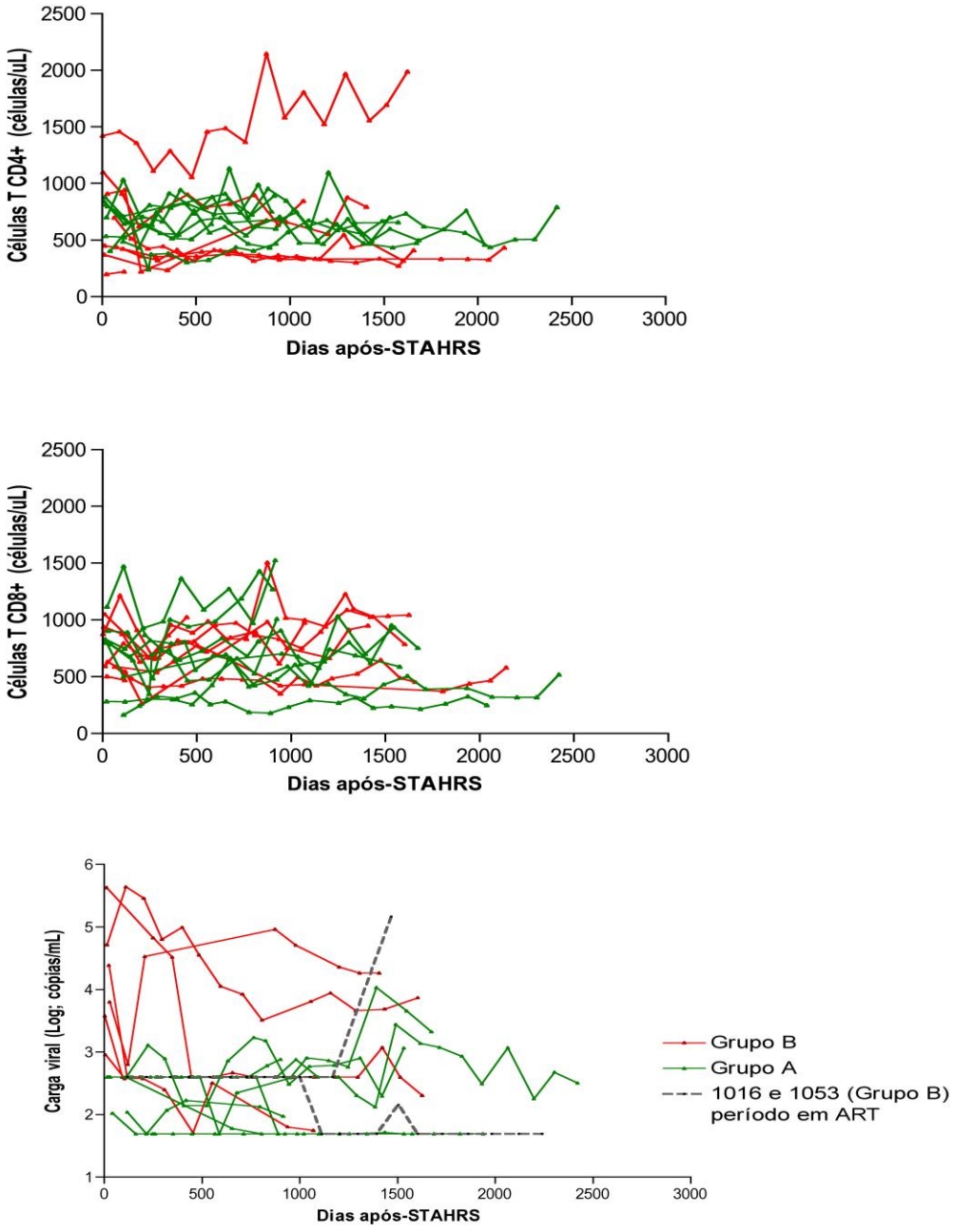
Figura 17- Comparação entre as variáveis laboratoriais no grupo A e no grupo B que expressam o HLA-B57.



5.8.1- Seguimento dos parâmetros laboratoriais dos grupos A e B

Embora o grupo B tenha apresentado uma carga viral maior que 400 cópias/mL, podemos observar neste estudo que os indivíduos que expressam o alelo HLA-B*57, mantêm os níveis da contagem de linfócitos T CD4+ e a carga viral durante todo o seguimento (Figura 18).

Figura 18- Curva de seguimento dos parâmetros laboratoriais dos grupos A e B. São apresentados os valores individuais históricos de linfócitos T CD4+, CD8+ e carga viral do HIV. No painel C, as linhas pontilhadas referem-se ao período em que dois participantes iniciaram tratamento antirretroviral, ambos pertencentes ao Grupo B.



5.9- Comparação entre os indivíduos que expressam os alelos HLA B*27, B*51,B*57 ou B*58 em relação à contagem de linfócitos T CD4+ , T CD8+ e carga viral

A análise estatística não demonstrou valor significativo quando comparado indivíduos que expressam os alelos HLA-B*27, B*51, B*58 com indivíduos que não expressam estes alelos durante o seguimento destes pacientes e na ausência de tratamento antirretroviral, em relação ás variações laboratoriais, Linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e carga viral respectivamente, mesmo após a exclusão dos indivíduos que expressam HLA B*57. Esses dados sugerem que os alelos HLA-B*27, B*51 e B*58 não apresentaram nenhum efeito protetor contra progressão, ao menos nesta coorte.

5.9.1- Comparação entre os indivíduos que expressam alelos HLA B*27, B*51, B*57 e B*58 em relação á carga viral basal >400 e <400 cópias/ml

Quando comparamos indivíduos que expressam os alelos HLA B*27, B*51, B*57 e B*58, com os indivíduos que não expressam estes alelos em relação á carga viral basal, podemos observar que os indivíduos HLA B*57 apresentam mais cargas virais <400 cópias/mL quando comparados aos demais pacientes; p=0,001. Os demais alelos não resultaram em diferenças estatisticamente significantes; p=>0,05, sugerindo, que o HLA B*57 desempenha um papel protetor contra a progressão para imunodeficiência (Tabela 9).

Tabela 9: Descrição da presença dos alelos B*27, B*51, B*57 e B*58 relacionado com carga viral .

Alelo		Carga Viral				Total	p
		<400		>=400			
		n	%	n	%		
HLA-B*27	não expressa	26	13,2	171	86,8	197	0,646
	expressa	2	18,2	9	81,8	11	
HLA-B*51	não expressa	26	14,1	159	85,9	185	0,746
	expressa	2	8,7	21	91,3	23	
HLA-B*57	não expressa	20	10,4	173	89,6	193	**<0,001**
	expressa	8	53,3	7	46,7	15	
HLA-B*58	não expressa	27	14,1	165	85,9	192	0,707
	expressa	1	6,3	15	93,8	16	
Total		**28**	**13,5**	**180**	**86,5**	**208**	

n: número de participantes da coorte

5.10. Tipificação de alta definição dos alelos HLA-B*57 pela metodologia PCR-SSO Luminex

Em virtude de alguns trabalhos demonstrarem diferença na resposta imunológica em indivíduos que expressam diferentes subtipos dos alelos HLA-B*57, em relação á proteção e progressão rápida da doença pelo HIV-1, foi também objeto do nosso estudo esta análise. Nesta corte estudada, não encontramos diferença em relação ao melhor controle da viremia nos indivíduos HLA-B*57 de diferentes subtipos, p>0,05 (Tabela 10) embora o número de cada subtipo encontrado tenha sido pequeno.

Tabela 10: Comparação entre os subtipos de HLA-B*57

Variável	Subtipo alelo B*57	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Linfócitos T CD4+ basal	5701	657,8	275,5	700	198	1098	10	0,626
	5702	534,0		534	534	534	1	
	5703	876,0	419,1	839	404	1422	4	
Linfócitos T CD8+ basal	5701	721,1	284,3	714,5	164	1116	10	0,299
	5702	283,0		283	283	283	1	
	5703	844,3	55,8	844,5	784	904	4	
Carga viral basal	5701	51609,1	132583,3	3003	<400	426000	10	0,287
	5702	<400		<400	<400	<400	1	
	5703	1175,8	1755,0	<400	<400	<400	4	

DP: Desvio padrão, N: número de participantes da coorte

5.11. Análise de fatores aditivos

5.11.1. Análise da expressão do alelo HLA-B*35

Neste estudo, podemos observar a influência do alelo HLA B*35 na carga viral. Indivíduos que expressam o alelo HLA-B*35, demonstraram carga viral basal, máxima durante todo seguimento e até início do tratamento estatisticamente maior em relação aos indivíduos que não expressam este alelo p=0,049, p=0,016 e p=0,019 respectivamente, sugerindo que o alelo HLA-B*35 está relacionado a desfechos desfavoráveis da infecção pelo HIV-1. (Tabela 11).

Tabela 11. Descrição dos níveis de carga viral segundo a presença do alelo HLA-B*35

Variável	Alelo HLA-B*35	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Carga Viral basal	Não expressa	56842	116086	16400	100	702999	160	**0,049**
	expressa	92240	136379	41850	399	704001	48	
	Total	65011	121646	19873	100	704001	208	
Carga Viral mínima	Não expressa	4488	14085	105	49	100000	160	0,897
	expressa	3769	8637	51	49	44100	48	
	Total	4322	13016	99	49	100000	208	
Carga Viral máxima	Não expressa	97065	135452	45900	105	703000	160	**0,016**
	expressa	152652	159004	76050	399	704000	48	
	Total	109892	142774	50195	105	704000	208	
Carga Viral mínima até o tratamento	Não expressa	22567	77630	2145	49	657000	160	0,084
	expressa	44681	112116	4731	49	704000	48	
	Total	27670	87008	2698	49	704000	208	
Carga Viral máxima até o tratamento	Não expressa	93543	131795	41617	105	703000	160	**0,019**
	expressa	149474	159961	70211	399	704000	48	
	Total	106450	140392	49051	105	704000	208	

DP: desvio padrão, N: número de participantes da coorte

Na coorte estudada, encontramos um indivíduo expressando HLA-B*35 e HLA-B*57, (amostra 1103); porém não observamos influência do alelo HLA-B*35 em relação ao alelo HLA-B*57. A carga viral inicial foi <400 cópias/mL.

5.11.2 Comparação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos

Neste estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os indivíduos homozigotos e heterozigotos, nos locus A, B e C, relacionados com as variáveis laboratoriais de contagem de linfócitos T CD4+, CD8+ e carga viral (p=>0,05). Não foi encontrado nenhum caso de homozigoto para o alelo HLA-B*57.

5.11.3 Análise do receptor CCR5

Dos 15 indivíduos HLA-B*57, apenas dois apresentaram o fenótipo CCR5Δ32/CCR5, demonstrando, portanto, que este fator genético não interferiu

na análise da influência do alelo HLA-B*57 nos valores laboratoriais iniciais e nos indicadores de progressão para imunodeficiência.

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

A investigação da distribuição e frequência dos alelos HLA em população saudável é importante para avaliar a participação destes genes na susceptibilidade e proteção contra doenças, para avaliar as origens genéticas das populações e essencial para realização de certos transplantes (144). O fato de termos analisado uma coorte infectada pelo HIV-1 também consistiu em oportunidade para uma análise da porcentagem dos alelos HLA encontrados com mais frequência nesta população.

Até hoje, são disponíveis poucos estudos populacionais que descrevem a distribuição de alelos de HLA classe I no Estado de São Paulo. Donadi e colaboradores (145), avaliaram dois grupos, o primeiro (G1) constituído de 100 indivíduos saudáveis, todos caucasóides, e o segundo (G2) com 257 doadores cadáveres de órgãos sólidos, ambos do interior do Estado de São Paulo. O HLA-A*02 foi o mais frequentemente encontrado, atingindo 46% em G1 e 50% em G2, o que está de acordo com a prevalência de 46,5% encontrada em nosso estudo. O alelo HLA-B*35 teve uma prevalência de 21,9% em nossa coorte, corroborado por estudo de prevalência alélica em diferentes etnias com 617 indivíduos da cidade de São Paulo, onde a frequência do alelo HLA-B35 estava aumentada (146).

A frequência do alelo B*5701, em coorte de 517 indivíduos infectados pelo HIV-1 foi de 6,4% (33 dos 517 expressaram este alelo) em estudo realizado para pesquisa da associação deste alelo com hipersensibilidade ao Abacavir (147). Paul Terasaki e colaboradores, em 1998 identificaram uma frequência fenotípica de B*57 em 100 indivíduos mestiços de 12% (148).

Em estudo realizado em colaboração com nosso grupo, a frequência do alelo B*5701 encontrada foi de 8% em uma coorte de 60 crianças brasileiras infectadas pelo HIV-1 (anexo página 93).

Dados do NMPD (*National Marrow Donor Program*), apresentam a frequência do alelo B*5701 como 0,03832 em europeus, 0,00477 em africanos, 0,02066 em asiáticos e 0,01176 em hispânicos, para o alelo B*5702 a

frequência é de 0,00038 em europeus,0,00415 em africanos, 0 em asiáticos e 0,00025 em hispânicos, e para o alelo B*5703 a frequência é de 0,00032 em europeus, 0,03382 em africanos, 0 em asiáticos e 0,00675 em hispânicos (149).

Podemos observar que o alelo B*57 não ocorre em frequência alta. Observando os dados do NMDP, a frequência do alelo B*5701 é maior em europeus e o alelo B*5703 em africanos. Em nosso estudo, a frequência foi 7,2% para o alelo B*57 (16 de 228), sendo 10 indivíduos B*5701, 1 indivíduo B*5702 e 4 indivíduos B*5703. A etnia brasileira apresenta muita miscigenação e isto pode explicar o fato de termos a expressão do alelo B*5701 e B*5703, B*5701 mais presente na população européia e B*5703 mais presente na população africana, uma vez que temos a influência destas duas etnias em nossa população. O fato de não termos acesso aos dados demográficos em relação á etnia de todos os indivíduos não nos permite afirmar a herança genética.

A investigação de alelos do sistema HLA relacionados com a patogenecidade do HIV-1 tem sido tema de muitos estudos atuais devido à sua importância para entender a resposta imunológica pelo hospedeiro e a fisiopatogenia da infecção pelo HIV-1.

O sistema HLA, tem demonstrado ser um fator genético importante do hospedeiro em doenças infecciosas, doenças autoimunes e câncer, com associações com susceptibilidade ou resistência em mais de 50 doenças diferentes (150). O papel do sistema HLA na suscetibilidade por infecção viral foi descoberta primeiramente por Zinkernagel e Doherty, que determinaram que as células T CD8+ (citotóxicas) reconheciam o antígeno viral e a molécula do MHC (restrição do MHC) (151). O HLA classe I desempenha um papel na resposta imune e na destruição das células infectadas por vírus.

Alguns alelos HLA classe I têm sido associados com menor progressão da infecção pelo HIV-1 para AIDS, incluindo A*23, A*25, A*26, A*32, A*68, B*27 e B*57 (152). Isto está em desacordo com o encontrado na nossa coorte estudada, onde apenas o Locus B, especificamente o alelo HLA-B*57

apresentou forte associação com melhores parâmetros laboratoriais, incluindo níveis de carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ e CD8+.

O sistema HLA tem sido associado à suscetibilidade ou resistência a diferentes viroses, e, há mais de dez anos, um grande número de estudos tem descrito a associação do HLA com a rápida ou lenta progressão para AIDS em infectados pelo HIV (135-137). Na infecção pelo HIV-1, indivíduos suscetíveis iniciam uma queda progressiva do sistema imune caracterizada por declínio dos linfócitos T CD4+, que resulta na imunodeficiência, infecções oportunísticas e morte na ausência de terapia antirretroviral. Após a infecção primária, as respostas imune celular e humoral atuam para manter o vírus sob controle, mas muitas vezes o vírus consegue se evadir destas respostas. Há, entretanto, pessoas que não requerem tratamento e apresentam uma boa sobrevida apesar da infecção pelo HIV-1. Geralmente denominados *long term non-progressors* (LNTP), estes indivíduos são muito importantes na análise imunogenética (99). Além disso, indivíduos em grupo de risco que foram expostos ao HIV-1, mas que não se tornaram infectados ou seus níveis de HIV-1 não são detectáveis, são importantes como controles em estudos de associação. Existem muitos fatores que podem modular a variação clínica da doença pelo HIV-1 e o sistema HLA tem sido relacionado como influência crítica no curso clínico da infecção pelo HIV-1 (99,135,152).

Alguns alelos HLA classe I foram descritos como associados a baixas cargas virais e à progressão lenta para doença, incluindo o HLA-B27 e o HLA-B57 (135,136). Estudos recentes demonstraram que as pessoas com expressão de B57 apresentam com menor frequência os sintomas da infecção aguda pelo HIV e exibem um melhor controle na replicação viral a seguir à infecção aguda (131). Estes dados demonstram que os fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar as manifestações clínicas da infecção aguda pelo HIV na progressão da doença. A associação entre o HLA-B27 e o HLA-B57 e o controle da infecção pelo HIV-1 foi pesquisada, quando células T específicas ao HIV-1 restritas a esses alelos HLA foram capazes de manter a proliferação após um período longo de infecção crônica. Isto demonstra que as células T CD8+

específicas dos LTNP podem manter a capacidade proliferativa que é diretamente ligada a sua especificidade e restrita ao HLA, sugerindo que os alelos B27 e B57 possuem certa vantagem na proteção contra o HIV-1 (153).

O HLA-B57 está fortemente associado à baixa progressão da doença em pacientes infectados. Indivíduos sem terapia antirretroviral que mantém viremia plasmática abaixo de 50 cópias/mL e contagem normal de linfócitos T CD4+, denominados controladores de elite, bloqueiam com sucesso os efeitos nocivos do HIV, através de mecanismo não completamente esclarecido. Mutações nos epitopos restritos ao HLA-B57 têm sido observadas, mas o significado delas ainda não é claro (102).

Em nosso estudo, foi possível identificar associação do sistema HLA com a patogenicidade pelo HIV-1 em população brasileira o que corroborou com estudos desenvolvidos em outros países (99,135,137). Tais resultados têm importante implicação para o desenvolvimento de uma vacina anti-HIV. O presente estudo foi realizado com dados gerados a partir de uma coorte prospectiva em acompanhamento na cidade de São Paulo, e nos direciona para confirmação que o alelo B*57, está fortemente associado com uma baixa progressão para imunodeficiência após a infecção pelo HIV, na ausência de terapia antirretroviral em indivíduos com infecção recente, confirmando resultados encontrados por outros grupos de pesquisadores. O fato do grupo de indivíduos que expressam o alelo HLA-B*57 ser segregado em 2 grupos distintos pela carga viral inicial, <400 cópias/ml e >400 cópias/ml, sem diferença na contagem de linfócitos T CD4+, aponta para uma relação maior entre a presença desse alelo e o controle da viremia, mas não primordialmente como um meio de preservação direta de linfócitos T CD4+. Não foi possível avaliar o mecanismo pelo qual o sistema imune indica ser mais ativo nestes indivíduos. Sugerimos que está relacionado com a região imunogênica apresentada pelo HLA B*57. Este é o primeiro estudo em humanos que claramente identifica essas duas populações de indivíduos B*57 infectados pelo HIV-1.

A infecção aguda pelo HIV-1 é uma síndrome muito heterogênea e os indivíduos que apresentam sintomas mais graves durante a infecção aguda

tendem a progredir mais rapidamente para a AIDS (113,114). Os fatores que influenciam esta associação entre a intensidade da síndrome e evolução da doença não são bem compreendidos. Nossos dados demonstram que o alelo B*57 tem um impacto significativo detectado logo após a infecção aguda. Este estudo também fornece uma evidência da ligação entre os alelos B*57 com melhor controle imunológico precoce da viremia e uma associação em longo prazo de infecção não progressiva ou de lenta progressão.

Em alguns estudos, os alelos HLA-B57, HLA-B58 e HLA-B27 (153,154) foram descritos por estarem associados com a progressão lenta da doença.

Os HLA-B57 e HLA-B58 apresentam fortes similaridades, e vários de seus subtipos estão associados com baixa progressão para doença em vários estudos (101,135-137). Os muitos epitopos apresentados por esses alelos são utilizados para explicar o controle da replicação do HIV-1 (155,156). Os linfócitos T citotóxicos (CTL) restritos a molécula B*57 podem ser detectados na infecção recente, sugerindo sua importância para limitar o inicio da replicação viral e conservar a função da resposta imune (113,131). Isto sugere que o epitopo pode limitar a viremia *in vivo* (107,138). Consequentemente, já que diferentes alelos de classe I que podem apresentar diferentes epitopos, diferentes HLAs poderão estar associados a efeitos semelhantes na progressão para doença. Como HLA-B57 e HLA-B58 apresentam sítios de ligação semelhantes, isto pode explicar como ambos estão associados com a baixa progressão da infecção pelo HIV-1 (95). O HLA-B63 detectado por meio sorológico inclui os alelos HLA-B*1516 e o HLA-B*1517. Através de eventos recombinantes, o HLA-B*1516 e o HLA-B*1517 adquiriram sequências similares ao HLA-B-57 e o HLA-B58, especialmente com a cadeia pesada alfa 1 (α1) de classe I. Baseados em características comuns, os alelos HLA-B63 tem sido agrupados dentro dos subtipos de HLA-B58, juntos com HLA-B57 e HLA-B58 (157,158).

O alelo HLA-B63 também está associado à redução da carga viral em indivíduos cronicamente infectados e não tratados, demonstrando que os epitopos apresentados pelos alelos HLA-B57, HLA-B58 e HLA-B63 podem ter

um papel central na mediação do efeito benéfico associado a esses alelos. A capacidade do HLA-B57 e HLA-B58 apresentarem epitopos idênticos já foi demonstrada há alguns anos (139), porém os epitopos não apresentados pelo HLA-B57 são apresentados por subtipos de HLA-B58. A análise da sequência dos resíduos que formam a fenda do HLA-B*1516 sugere fortemente que epitopos do HLA-B57 podem ser acomodados no HLA-B*1516 (159,160).

Goulder *et al,* testou a idéia que a resposta dos CTL restritos a moléculas HLA classe I que conferem proteção ao HIV-1, impõem forte pressão sobre a replicação viral. Como medida de pressão imposta pelos alelos HLA classe I, foi determinado o tamanho do epitopo associado em uma coorte de indivíduos europeus infectados pelo HIV-1. Os resultados deste estudo foram validados em uma segunda coorte de pacientes africanos, descrevendo epitopos chaves do HIV-1 restritos pelas moléculas HLA (B27, B57 e B51 em pacientes europeus e B*5703, B*5801 e B*8101 em pacientes africanos), onde foram mais frequentemente mutados em indivíduos apresentando moléculas HLA restritas. Foi concluído que moléculas HLA classe I impõem forte seleção a epitopos chaves do HIV-1, revelado pela frequente associação entre a resposta efetiva de células T e mutantes virais circulantes em pacientes (139).

Na análise da associação entre os alelos HLA-B*27, HLA-B*51, HLA-B*58, com a baixa progressão da infecção pelo HIV-1, indicado pela análise dos parâmetros laboratoriais, não encontramos influência destes alelos com melhores parâmetros laboratoriais fato que está em desacordo com resultados obtidos por outros estudos citados acima que relacionam estes alelos com um papel protetor para doença pelo HIV-1. Quando comparado os níveis de carga viral <400 cópias/mL e >400 cópias/mL, nos indivíduos que expressam os alelos HLA-B*27, HLA-B*51, HLA-B*57e HLA-B*58, podemos observar que apenas os indivíduos que expressam HLA-B*57 apresentam uma diferença estatisticamente significante em relação ao controle da viremia e dos níveis linfócitos T CD4+ e CD8+ (Tabela 9).

Neste presente estudo, procuramos determinar o impacto da genética do sistema HLA classe I sobre a magnitude, extensão e manutenção do vírus a

uma resposta específica de linfócitos T CD8+ durante a infecção aguda. Os resultados obtidos demonstram que a expressão dos alelos B*57 podem estar associados significativamente com o controle da viremia e manutenção da contagem de linfócitos T CD4+ na infecção recente pelo HIV-1, e durante todo o seguimento desta coorte, mesmo quando comparamos a carga viral mínima e máxima até o tratamento, contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ (Figura 13, Gráficos 4 e 6). É interessante notar que em toda análise realizada o alelo HLA-B*57 está associado com melhor controle da viremia e melhor contagem de linfócitos TCD4+ e CD8+.

O fato de ter havido uma segregação consistente das amostras que expressam o alelo HLA-B*57 em dois grupos distintos: Grupo A: indivíduos que apresentaram carga viral basal <400 cópias/mL e Grupo B: indivíduos que apresentaram carga viral basal ≥400 cópias/mL, não interferiu nas contagens de linfócitos T CD4+ e CD8+. É interessante notar que as contagens de linfócitos T CD4+ se mantém elevadas mesmo nos indivíduos que apresentam carga viral mais alta, sugerindo que o efeito protetor pelo alelo HLA-B*57 pode ainda estar presente e 8 dos 15 indivíduos que expressam o HLA-B*57 foram capazes de controlar a replicação viral, na ausência de terapia antirretroviral em níveis <400 cópias do RNA-HIV-1/mL de plasma (Tabela 8, Gráfico 7). A natureza deste efeito, portanto, pode também envolver outros mecanismos protetores, além do controle da viremia.

A expressão dos alelos B*57 não é, por si só, suficiente para conferir uma proteção capaz de controlar espontaneamente a replicação do vírus a níveis abaixo do limite de detecção de carga viral. É possível, portanto, que a resposta observada nestes indivíduos pode ser o resultado de um segundo fator modificador da resposta que altera a resposta de linfócitos T CD8+ para favorecer a expansão dos clones. De qualquer forma, os acontecimentos no início da infecção pelo HIV-1 que podem formar uma resposta imune celular específica destes pacientes provavelmente fornecem mais informações importantes para uma restrição imune mediada. Estudos adicionais podem fornecer importantes informações sobre os mecanismos pelos quais o HIV-1

contorna a resposta imune celular de pacientes com doença progressiva e quais os parâmetros devem ser medidos para prever a capacidade de restrição da replicação do vírus.

Outra hipótese é que as diferenças que levam ao efeito favorável do B*57 na infecção pode residir na capacidade das células T CD8+ mediar a citólise, secretando fatores supressivos. Acreditamos, entretanto, que esta hipótese ainda não pode ser confirmada com os dados atuais disponíveis de ensaios *ex vivo* e *in vitro*.

Estudos têm demonstrado o papel central da resposta imune celular gerada durante a infecção aguda do HIV-1 no controle inicial da viremia e o estabelecimento de set point viral. A eficiência da resposta dos linfócitos T CD8+ ao HIV-1 pode ser comprometida pelas mutações virais que modificam os peptídeos que ligam ao complexo HLA.

Estes conceitos sustentam a teoria existente de que as respostas protetoras mediadas por linfócitos T CD8+ resistem à mutação de escape (161). Se isso for confirmado, uma futura vacina envolveria a seleção daqueles peptídeos do HIV-1 que teriam a resistência máxima às mutações de escape. Para os alelos que oferecem uma resposta menos protetora, uma estratégia possível seria pesquisar proteínas do HIV-1 com tais características que fossem comuns, independente do genótipo de HLA do indivíduo infectado. Podemos sugerir que nenhum alelo HLA é verdadeiramente protetor ao HIV-1, por si só, embora o nosso e outros estudos tenham demonstrado o efeito protetor do HLA-B57 esta proteção deve estar relacionada a outros componentes da resposta imune. Alguns alelos HLA classe I são associados com a progressão lenta da doença, mas a contribuição relativa do alelo contra os sítios restritos para esta proteção relativa permanece obscura.

Há um domínio do alelo HLA-B, visto em estudos imunológicos do HIV-1 (162) que permite acumular evidência do funcionamento e do equilíbrio microbiológico (163, 164). Estes resultados sugerem que os alelos, dentro de um subtipo, sejam funcionalmente diferentes nos termos da interação HLA-peptídeo, mesmo aqueles relacionados filogeneticamente e dentro do mesmo

genótipo. Os efeitos da seleção do alelo B*5701 e do alelo B*5703 são campo fértil para pesquisa da patogênese da infecção pelo HIV-1. As diferenças na progressão da doença associadas com o alelo B58 (162) e os subtipos HLA-B35(100) sugerem que a variação alélica do sistema HLA, em particular o alelo HLA-B, tenha uma base evolucionária funcional. Consequentemente, é importante elucidar as respostas das células T qualitativas relacionadas aos diferentes subtipos dos alelos HLA.

A resposta restrita das células T CD8+ ao HIV-1 ligada às moléculas de B*5701 e B*5703, que diferem por dois aminoácidos, demonstrou que ambos estão associados com a resposta dominante do mesmo epitopo do HIV-1 Gag KF11 (KAFSPEVIP). Quando este epitopo é apresentado pela molécula HLA-B*5701, é induzida uma conformação nos TCR que é altamente conservada em certos indivíduos que reconhecem epitopos virais variantes, raramente associados com escape mutacional. Em contraste, quando o KF11 apresentado pela molécula B*5703 a indução é totalmente diferente, demonstrando a influência dos subtipos dos alelos HLA na seleção de TCR e indicam que a grande diversidade nos TCRs não é um pré-requisito para a prevenção da mutação viral (165).

A convergência de ascendências africanas, européias, asiáticas e dos ameríndios na população brasileira reúne uma diversidade de alelos HLA através das linhagens alélicas múltiplas. Este tipo de amostragem da população, com a verificação baseada especificamente na raça e etnia e diversidade do sistema HLA consiste em uma ótima oportunidade para identificar uma vacina candidata contra o HIV-1. Mesmo com as distribuições diferentes dos alelos HLA nesta coorte, o enriquecimento estatístico significativo dos alelos B*57:01/57:02/57:03 associado com a progressão mais lenta da doença HIV-1 foi um achado notável e serviria de evidência para um estudo mais aprofundado da infecção pelo HIV-1 como uma influência seletiva na frequência de certos alelos do sistema HLA em uma população.

O fato de em nosso estudo encontrarmos um número pequeno de indivíduos que expressam os alelos B*57:01, 57:02 e 57:03 não nos permite

correlacionar com diferenças entre os subtipos de B*57 com efeito protetor para doença pelo HIV-1. É necessário, contudo, um número maior de indivíduos que expressam estes subtipos para uma análise comparativa, embora nossa análise estatística não tenha demonstrado valor significativo entre estes diferentes subtipos.

Estudos sugerem que os alelos HLA classe I têm influência na velocidade de progressão e que a força dos alelos protetores são comparáveis ao efeito protetor dos receptores CCR5Δ32 (166). Os homozigotos para esta deleção de 32 pares de bases (CCR5Δ32) não expressam o receptor de superfície celular e só podem ser infectados com estirpes de vírus que sejam capazes de usar outros co-receptores tais como CXCR4. O fato de que os alelos de CCR5Δ32 e algum HLA terem efeitos protetores independentes refletem a dualidade de sua ação na expansão viral: o primeiro limitando a replicação pela disponibilidade diminuída do co-receptor e o segunda levando a uma resposta imune celular mais eficiente contra o HIV-1. Isto está de acordo com o resultado obtido neste estudo, onde podemos observar que apenas dois indivíduos foram heterozigotos para o fenótipo CCR5Δ32 entre os 15 indivíduos que expressam B*57, sugerindo ausência de associação entre os dois fatores genéticos.

Em análise adicional, identificamos a associação do alelo HLA-B*35 com maior carga viral sugerindo que o alelo HLA-B*35 está relacionado com progressão para AIDS. Este resultado está de acordo com estudos que têm sido realizados que associam o alelo HLA-B*35 com progressão mais rápida para doença pelo HIV-1 (57,135). O alelo C*04 foi associado à rápida progressão devido ao forte desequilíbrio de ligação com HLA-B*35 em estudos que analisaram estes dois alelos (57,135). Embora não tenha sido objetivo principal, nosso estudo corrobora estes resultados, indicando uma frequência de 14% de desequilíbrio de ligação do alelo HLA-B*35 e C*04 nesta coorte analisada.

Pudemos também colaborar com um estudo de caso, onde o indivíduo após um mês de exposição ao HIV-1, manifestou pneumonia por *Pneumocystis*

jiroveci e a contagem de linfócitos T CD4+ foi abaixo de 200 cels./ μL por três meses consecutivos. A terapia antirretroviral foi introduzida, e o teste de resistência genotípica não identificou nenhuma mutação do vírus. A contagem de linfócitos T CD4+ atingiu contagem acima de 200 céls/μL após seis meses. A tipificação do HLA Classe I foi realizada e os alelos identificados foram A*23, 24, B*1503,35, C*02,04, corroborando com achados que descrevem o HLA-B*35, associado ao C*04 em desequilíbrio de ligação, relacionado á rápida progressão para imunodeficiência (Página 94).

A homozigose do sistema HLA pode diminuir o número de epítopos virais os quais poderiam ser alvo para os CTls. A homozigose do alelos HLA da classe I e especialmente dois *locus* apresentando homozigose parece estar associado com progressão para AIDS como reportado em estudos, incluindo homossexuais caucasianos, americanos e europeus, mulheres heterossexuais africanas e coortes de grupos de risco (176). A manutenção da variabilidade genética parece ser uma vantagem contra agentes patógenos, e a heterozigose do sistema HLA pode desempenhar um papel maior no combate de doenças infecciosas.

Embora, estudo realizado tenha correlacionado à sobrevida de caucasianos portadores do HIV-1 á heterozigose completa para os locus do sistema HLA, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre indivíduos homozigotos e heterozigotos para os alelos HLA-A, HLA-B e HLA-C, em relação á melhores parâmetros laboratoriais. O fato de não termos encontrado esta associação pode ser devido á ausência de homozigose completa dos alelos HLA classe I.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1- O alelo HLA-B*57 está associado à proteção contra marcadores de progressão para AIDS em indivíduos recém infectados pelo HIV-1, tanto em amostras iniciais, quanto durante o seguimento desta coorte. Os marcadores incluem menor carga viral, maiores níveis de linfócitos T CD4+ e menor nível de linfócitos T CD8+.

2- O efeito protetor contra progressão para AIDS não foi detectado em associação a outros alelos de HLA analisados.

3- Entre os indivíduos HLA-B*57 identificamos dois grupos bastante distintos, o primeiro favorecido com níveis de viremia muito baixos (<400 cópias/mL) e o segundo com viremia mais alta (>400 cópias/mL), comparável ao restante da coorte. Não foi detectada diferença na contagem de linfócitos T CD4+ ou CD8+ entre os dois grupos.

4- O alelo HLA-B*35 indica estar relacionado com maior nível de carga viral em indivíduos recém infectados pelo HIV-1 à um progressão mais rápida para doença pelo HIV-1, conforme o parâmetros laboratoriais.

5- Não detectamos influência da frequência do genótipo heterozigoto CCR5/CCR5Δ32 nos indivíduos HLA-B*57 em relação aos níveis de linfócitos T CD4+ e carga viral do HIV.

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética do HC-FMUSP (CAPPESQ)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/05/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0367/09**, intitulado: "**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO HLA-B57 COM O CONTROLE DA VIREMIA EM COORTE DE INDIVÍDUOS RECÉM INFECTDAOS PELO HIV-1.**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof.Dr. Esper Georges Kallas**
Pesquisador (a) Executante: **Dra. Nancy Alves de Lima Gouvea**

CAPPesq, 07 de Maio de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo II. Poster: Distribution of HLA Class I alleles and CCR5 genotypes in Brazilian HIV-1 infected children.

PP-074-48

Distribution of *HLA Class I* alleles and CCR5 genotypes in Brazilian HIV-1 infected children.

Giret, M. T. M.[1], Gouveia, C. J.[1], Gouveia, N. A. L.[1], Alencar, C.S.[4] , Succi, R.C.[2] , Nixon, D. F.[3], Kallas E. G.[1]

1. Division of Clinical Immunology and Allergy, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
2. Division of Pediatric Infectious Diseases, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.
3. Division of Experimental Medicine, Department of Medicine, UCSF, San Francisco, California, USA
4. Division of Hematology and Haemotherapy, University of Sao Paulo, Brazil.

Introduction

The number of people living with HIV worldwide continued to grow in 2008, reaching an estimated 33.4 million [31.1 million–35.8 million]

An estimated 430 000 [240 000–610 000] new HIV infections occurred among children under the age of 15 in 2008. Most of these new infections are believed to stem from transmission in uterus, during delivery or post-partum as a result of breastfeeding. The number of children newly infected with HIV in 2008 was roughly 18% lower than in 2001. AIDS continues to be a major global health priority.

In Brazil, where free antiretroviral therapy has been available since 1996, average survival following an AIDS diagnosis in São Paulo state rose from four months in 1992– 1995 to 50 months in 1998–2001. Most HIV-1infected children are on antiretroviral drug regimens, with many individuals surviving through adolescence and into adulthood. The course of HIV-1 infection in these children is variable, and understudied.

Host genetic factors play an important role in the HIV Pathogenesis. One of the genetic factor that influences the infection and disease progression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the deletion of 32 base pairs of the gene encoding the cell surface receptor CCR5.

HLA polymorphism has been shown to play a role in protection against HIV infection and several studies examining *HLA* associations with disease progression have suggested that certain *HLA* class I alleles, are associated with low set-point viremia and delayed onset of AIDS.

As Brazilian population is characterized by a mixture of ethnicity and Sao Paulo, epicenter of the epidemic, we also wanted to investigate the frequency of the CCR5 polymorphism in the group of HIV-1 infected children.

Objectives

The aims of this study were to determine the *HLA* allele distribution in HIV-1 infected children and the frequency of CCR5Δ32 polymorphism in the same population

Patients and Methods

A total of sixty HIV-infected children were enrolled in this study. Three out of sixty were ART-naive patients and fifty seven were under stable antiretroviral therapy, following guidelines.

All participants signed the IRB-approved informed consent. Venous blood was collected and the DNA was obtained from whole blood using the QIAamp DNA blood kit following the manufacturer's instructions.

The *HLA* class I molecular typing was carried out using LABType SSO PCR (sequence-specific oligonucleotide). LABType® SSO is a reverse SSO (rSSO) DNA typing solution that uses sequence-specific oligonucleotide (SSO) probes and color-coded microspheres to identify *HLA* alleles. The target DNA is amplified by polymerase chain reactions (PCR) and then hybridized with the bead probe array (Figure 1).

We also analyzed CD4+ and CD8+ T cell counts by flow cytometry (Becton Dickinson) and HIV-1 viral load by PCR using branched DNA assay (Versant® HIV-1 RNA 3.0 ASSAY (bDNA), Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) with a detection limit of 50 copies/ml. The CCR5Δ32 polymorphism was identify by PCR.

Nonparametric analyses were performed, significance threshold was defined at p<0.05

Figure 1: LABType princi[ple

Results

At the time of study, 57 were under treatment and 3 untreated children were analyzed. Of the 60 participants, 52% were women and their median age was 12.1 years (25-75% IQR,10.3 - 14.1). As depicted in Table 1, the median CD4+ T cell count was 535 cells/mm^3 (IQR, 420 - 699), The median CD8+ T cell count was 1,034 cells/mm^3 (IQR, 733 – 1280). The HIV-1 viral load was 220 HIV-RNA copies/ml (IQR, 49 - 7,530).

None patient with CCR5Δ32 heterozygous was found in this study.

Among the enrolled volunteers, we were able to identify as the most common *HLA* alleles *HLA-A*02* (39%), *-A*14* (21%), *-A*68* (19%), *-B*44* (25%), *-B*35* (22%), *-B*15* (13%), *-Cw*04* (33%), *-Cw*07* (28%), *-Cw*08* (21%).

From all *HLA-B*5701* patients (8%), only one was untreated (5%). Although a delay in the time to ART initiation in some allele (*HLA-B*15* and *B*51*) could be observed, no statistically significant differences were made evident when analyzing the frequencies of each *HLA-B* allele.

Table 1: Selected cohort characteristics at enrollment

Variable	Cohort participant N (%)
Age, in years: median (IQR)	12.1 (10.3, 14.1)
Sex=male	28 (48)
CD4+ T cells (per ul): median (IQR)	535 (420 - 699)
CD8 + T cells (per ul): median (IQR)	1,034 (733 – 1,280)
Viral load (copies/ml): median (IQR)	220 (49 – 7,530)

Table 2: Selected parameters according to the *HLA-B* locus

Parameters	*HLA* alleles/locus *B*									
	*B*13*	*B*14*	*B*15*	*B*27*	*B*35*	*B*44*	*B*51*	*B*53*	*B*57*	*B*58*
CD4+ T cells counts/ul, median	921	741	736	598	763	588	405	648	480	681
CD8+ T cells counts/ul, median	921	868	925	882	1,037	1,318	661	1,004	1,134	1,804
HIV-1 Viral Load, median	49	49	2,667	1,594	94	87	1,452	49	7,733	6,631
Time for ART treatment (months)	51.95	32.61	67.66	26.93	30.49	37.63	59.55	19.21	26.12	16.73
Frequency (%)	5	20	13	3.3	22	25	8.3	8.3	8.3	6.6

Conclusions

Brazilian patients express a mixture of *HLA* alleles reflecting the diverse groups of individuals that populated this country. In Brazil, the assessment of genetic markers among the HIV-1 infected individuals has been restricted to adult and this is the first cohort study to assess the distribution of CCR5 genotypes and prevalence of and *HLA* alleles in children of Sao Paulo, Brazil.

1. A considerable variety in the frequency of *HLA* allele distribution in HIV-1 infected children was observed.
2. The most common alleles were *HLA-A*02, -B*44, -B*35 and -Cw*04* .
3. A delay in the time to ART initiation in some allele does not reflect any significant effect when analyzed related to described HLA class I alleles, associated with low set-point viremia and delayed onset of AIDS.
4. None of the HIV-1 infected children studied hold the CCR5Δ32 polymorphism.

Footnotes
Esper Georges Kallas, M.D., Ph.D.
Maria Teresa Maidana Giret, Ph.D.

Laboratory of Medical Research, LIM 60
Department of Clin. Immunol and Allergy
School of Medicine, University of Sao Paulo
Av. Dr. Arnaldo 455, third floor
01246-903, Sao Paulo-Brazil.
E-mail: esper.kallas@gmail.com
maidana.giret@gmail.com

This study was supported with funding from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2009/54055-5/Kallas). M.T.M.G. was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (2009/52381-2/Kallas).

Anexo III. Artigo Científico: Acute HIV infection with rapid progression to AIDS

Acute HIV infection with rapid progression to AIDS

ABSTRACT

Acute HIV infection is rarely recognized as the signs and symptoms are normally unspecific and can persist for days or weeks. The normal HIV course is characterized by a progressive loss of CD4+ cells, which normally leads to severe immunodeficiency after a variable time interval. The mean time from initial infection to development of clinical AIDS is approximately 8-10 years, but it is variable among individuals and depends on a complex interaction between virus and host. Here we describe an extraordinary case of a man who developed *Pneumocisits jiroveci* pneumonia within one month after sexual exposure to HIV-1, and then presented with 3 consecutive CD4 counts bellow 200 cells/mm^3 within 3 months, with no other opportunistic disease. Although antiretroviral therapy (AZT+3TC+ATZ/r) was started, with full adherence of the patient, and genotyping indicating no primary antiretroviral resistance mutations, he required more than six months to have a CD4 restoration to levels above 200 cells/mm^3 and 10 months to HIV-RNA to become undetectable.

Keywords: HIV, acute infection, progression, AIDS.

[Braz J Infect Dis 2010;14(3):291-293]

©Elsevier Editora Ltda.

Authors
Marcio de Oliveira Silva[1]
Milena Bastos[1]
Eduardo Martins Netto[1]
Nancy Alves de Lima Gouvea[2]
Alex Jose Leite Torres[1]
Esper Kallas[2]
David I Watkins[3]
Marcus Altfeld[4]
Carlos Brites[1]

[1]Universidade Federal da Bahia, Brazil.
[2]Faculdade de Medicina de São Paulo, Brazil.
[3]Wisconsin National Primate Research, USA.
[4]Partners AIDS Research Center, Infectious Diseases Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, USA.

INTRODUCTION

HIV infection is characterized by a progressive loss of CD4+ cells, which normally leads to severe immunodeficiency after a variable time interval. Following infection with HIV-1, the majority of individuals present with a clinical picture characterized by a mononucleosis-like syndrome, a transient drop in CD4+ cells, and a subsequent recovery of these initially reduced CD4+ T cell counts to near normal levels.[1] The mean time from initial infection to development of clinical AIDS is approximately 8-10 years,[2-5] but can vary among individuals and depends on the complex interaction between virus and host. The strongest predictor for the speed of HIV-1 disease progression is viral load set point, and infected subjects with high levels of viremia usually progress to AIDS faster than those with lower viral load.[6,7]

Opportunistic infections that occur within the first months after infection with HIV-1 are extremely rare, and are often misdiagnosed or missed. Patients and treating physicians can be misguided by a negative HIV-1 test within the preceding months. Here we describe a case of a homosexual man who developed *Pneumocisits jiroveci* pneumonia within one month of infection by HIV-1. This case emphasizes that clinicians need to be aware of the possibility of opportunistic infections occurring during early HIV-1 infection.

CASE REPORT

A 28-year-old male patient presented on April 4, 2005, with fever of 38° C, a rash on the upper limbs, which extended to the trunk and face after 2 days, night sweats, headache, myalgia and fatigue. After 7 days, the symptoms spontaneously disappeared. This episode was preceded by a single high-risk sexual exposure to a partner of unknown HIV serostatus, seven days before the onset of symptoms. Apart from this single risk exposure, the subject reported to be in a monogamous relationship with his HIV-1-negative male partner that had no other risk factors for HIV infection (tested HIV-1 negative in March 2005 and still negative at the latest measurement in September 2008). He was also tested negative for HIV-1 on January 17, 2005 (antibody and p24 antigen negative), when an HIV-1 test was performed in a context of an acute episode of diarrhea.

Two weeks after rash onset (on April 22, 2005), the patient was seen at the emergency room of a private hospital complaining of cough and fever. A chest X-Ray showed interstitial

Submitted on: 08/14/2009
Approved on: 11/25/2009

Correspondence to:
Marcio de Oliveira Silva
Rua Jorge Simões, 156
Ed. San Juan, apt. 302,
Bonfim
Salvador – Bahia – Brazil
CEP: 40415-720
Phone: +55-71-91979086
E-mail: oliveiras_m@yahoo.com.br

We declare no conflict of interest.

infiltration and he was prescribed moxifloxacin (400 mg/d, PO). There was no improvement, and after 48 hours he returned to the hospital with persistent symptoms, malaise and shortness of breath. A chest computerized tomography scan revealed an interstitial infiltrate suggestive of *P. jiroveci* pneumonia. His arterial oxygen pressure was 70 mmHg, with an O_2 saturation index of 96%. He was hospitalized, and received prednisone 1mg/kg, and sulphametoxazole plus thrimethoprim (800/160 mg, qid, 21d). Acid fast baciloscopy (AFB) and blood pyogenic cultures were negative. Fever disappeared after 48 hours, and clinical symptoms resolved. A new HIV-1 serological test (EIA) performed on April 24, 2005, was positive for HIV (p24 Gag; p 41 Env) antibodies, which was confirmed by Western Blot (p17, p31, p51, p55, p66 = negative, p24 weakly positive, Gp41, Gp120, Gp160 positive).

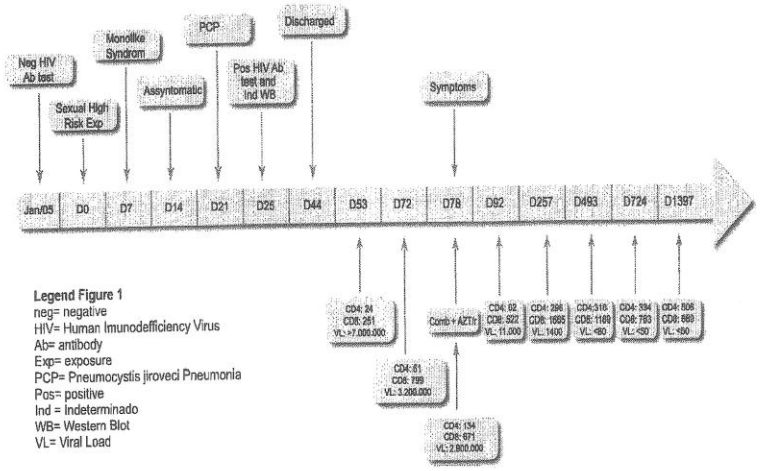
A CD4+ T cell count performed on May 24, 2005, was 24 cells/ mm^3, while the CD8+ T cell count was 251 cells/ mm^3. HIV-1 viral load was quantified using NASBA (NucliSENS, BioMerieux) and was over 7,000,000 copies HIV-1 RNA per mL plasma. At a follow-up visit on June 08, 2007, the HIV-1 viral load had decreased to 3,200,000 copies/mL and CD4+ and CD8+ T cell counts had increased to 61 and 799 cells/mm^3, respectively, without the initiation of any antiretroviral therapy. A genotyping test for potential antiretroviral drug resistance mutations performed on May 24, 2005, using the Trugene HIV-1 assay showed no evidence of drug-resistance mutations, mRNA flow cytometric analysis using ViroTect, Invirion Diagnostics Inc.[8] revealed a dual-tropic virus infection. He was discharged from hospital on May 11, 2005, without any symptoms.

He returned to hospital on June 11, 2005, with a clinical picture suggestive of upper respiratory tract infection (fever, headache, nasal congestion). An X-Ray of his face showed sinusitis, which was successfully treated with amoxacillin-clavulanate (500/125 mg, tid, 14d). His plasma viral load was 2,900,000 copies/mL; CD4+ cells count had increased to 136 cells/mm^3 (June 14, 2005). The patient was started on antiretroviral (ARV) therapy using AZT + 3TC + ATV/r on June 14, 2005, and then discharged. After 2 weeks of therapy (June 28, 2005), his viral load decreased to 11,000 copies/mL and CD4 count was 62 cells/mm^3. Four weeks after (July 12, 2005), his plasma viral load was 320 copies/mL, while his CD4+ cells count has increased to 196 cells/mm^3. Besides report of full adherence to ARV therapy, measures 3 and 5 months after initiation of viral load were 210 and 1400 copies/mL, respectively; he only became undetectable 9 months after and remained as such since then (36 months) (Figure 1). The patient's HLA type was Locus A*23, 24 B*1503, 35 Cw*02, 04.

DISCUSSION

The natural history of HIV infection is highly variable.[2,9] However, most infected individuals remain free of symptoms for 6-10 years after initial infection, and a subset of infected individuals do not progress to AIDS after being infected for more than 25 years (so called "long-term non-progressors"). Differences in the speed of HIV-1 disease progression have been linked to several factors; most consistently to genetic factors, including chemokine polymorphisms and the expression of specific HLA class I or KIR alleles.[10,11] On the other hand, there are rare individuals who progress to AIDS in a very short time after initial exposure to HIV. In MACS cohort a rate < 1% of rapid progression to AIDS within 12

Figure 1: Timeline



Legend Figure 1
neg= negative
HIV= Human Imunodefficiency Virus
Ab= antibody
Exp= exposure
PCP= Pneumocystis jiroveci Pneumonia
Pos= positive
Ind = Indeterminado
WB= Western Blot
VL= Viral Load

months of infection was reported with 0.007% of individuals reaching a CD4+ cell count less than 200 cells/ mm^3 within 6 months of infection, and 0.045% within one year.[12,13] The factors that are responsible for the rapid progression of disease in these individuals are not known.

Recently, a case of a man who developed AIDS, including the need for ARV therapy within 4-5 months after acute infection, was reported, and potential co-factors, such as life-style, use of drugs, or even an exceptionally virulent resistant strain of HIV have been discussed in this context.[14] There are some cases of *P. jiroveci* in literature, but all recovered CD4 levels without ARV therapy within four months after symptoms.[15] In the present case, the study subject did not report any drug use and he had stable HIV negative sex-partner. It was previously reported that HLA-B*35, Cw*04 and A*68 were associated with increased risk of fast progression to AIDS;[16-19] of these, our patient has the first two antigens. In addition, the HIV-1 strain isolated was sensitive to all current antiretroviral drugs, and belonged to subtype B, the most frequent viral subtype circulating in Bahia and associated with non-aggressive progression,[20] however, the dual tropic viral profile was related to a increased risk of fast progression.[14] Most importantly, this case emphasizes that physicians must be aware that life threatening opportunistic infections can occur during this early phase of infection. Acute HIV-1 infection can occasionally result in a rapid and dramatic loss of CD4+ T cells.

REFERENCES

1. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. N Engl J Med 1989; 339(1):33-9.
2. Munoz A, Wang MC, Bass S *et al.* Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) seroconversion in homosexual men. Am J Epidemiol 1989; 130:530-9.
3. Rutherford GW, Lifson AR, Hessol NA *et al.* Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow up study. Br Med J 1990; 301:1183-8.
4. Baccheti P, Moss AR. Incubation period of AIDS in San Francisco. Nature 1989; 16:251-3.
5. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. Nature Medicine 2003; 9:853-60.
6. Rodriguez B, Sethi AK, Cheruvu VK *et al.* Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. JAMA 2006 Sep 27; 296(12):1498-506.
7. Mellor JW, Rinaldo CR Jr, Gupto P *et al.* Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science 1996; 272(5265):1167-70.
8. Harrigan R. Predicting response to CCR5 Antagonists. Oral Session, 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, CROI 2009.
9. Lifson AR, Rutherford GW, Jaffe HW. The natural history of human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis 1998; 158:1360-7.
10. Magierowska M, Theodorou I, Debré P *et al.* Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes on predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus 1 infected individuals. Blood 1999; 93:936-41.
11. Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC *et al.* Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA BW4 homozygosity. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:5140-5.
12. Gange S. Data on natural history. Symposium on the Case of Rapidly Progressive Multi-drug Resistant HIV in New York City, February 10, 2005.
13. Phair J, Jacobson L, Detils R *et al.* acquired immunodefiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: The Multicenter AIDS Cohort Study. JAIDS 1992; 5:490-6.
14. Markowitz M, Mohri H, Mehandru S *et al.* Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report. Lancet 2005; 365:1031-8.
15. Vento S, Di Perri G, Garofano T *et al. Pneumocystis carinii* pneumonia during primary HIV-1 infection. Lancet 1993; 342:24-5.
16. Carrington M, Nelson GW, Martin MP *et al.* HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-CW*04 disadvantage. Science 1999; 283:1748-52.
17. Itescu S, Marthur-Wagh U, Skovron ML *et al.* HLA- B35 is associated with accelerated progression to AIDS. J Acquir Immune Defic Syndr 1992; 5:37-45.
18. Sahmoud T, Laurian Y, Gazengel C, Sultan Y, Gautreau C, Costagliola D. Progression to AIDS in French haemophiliacs: association with HLA-B35. AIDS 1993; 7:497-500.
19. Gao X, Nelson GW, Karacki P *et al.* Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. N Engl J Med 2001; 344:1688-75.
20. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE *et al.* The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Engl J Med 2008; 10:1590-602.

Anexo IV- Artigo Científico

HLA B*57 and recent HIV infection: laboratory characteristics and impact on viral control

Suggested author and order: Nancy Alves L. Gouvea[1], Celso Gouvea[1], Mariana Mellilo Sauer[1], Maria Teresa Maidana Giret[1], João L. Miraglia[1], Helena Tomiyama[1], Leandro F. Tarosso[1], Maria Cecília Sucupira[2], Ricardo Sobhie Diaz[2], Esper Georges Kallas[1]*

[1] Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil

[2] Infectious Diseases Division, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

3 Department of Infectious Diseases, School of Medicine, University of São Paulo

***Corresponding author**

Esper Georges Kallas, M.D., Ph.D.

Laboratório de Investigação Médica 60

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo 455, terceiro andar

São Paulo – SP 01246-903

Phone: (11) 3061-8395

Fax: (11) 3061-8392

E-mail: esper.kallas@gmail.com

Key words: Human immunodeficiency virus **(**HIV); HLA; B57; viral load; CD4; CD8; T lymphocyte

Running title: B*57 and HIV disease progression (32 characters with spaces)

Word count (excluding face pages, abstract, and references): 1,571 words.

Funding: This study was supported with funding from the Brazilian Program for STD and AIDS, Ministry of Health (914/BRA/3014-UNESCO/Kallas), the São Paulo City Health Department (2004-0.168.922-7/Kallas), and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (04/15856-9/Diaz, Sabino & Kallas; and 05/01072-9/Levi). N.A.L.G. and M.T.M.G. scholarships were supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Conflicts of interest: The authors have no competing conflicts of interest to declare.

Acknowledgments: We would like to thank Dr. Elkin Hernán Bermudez for his help in the laboratory work, Rogério Ruscitto do Prado who provided support in the statistical analyses, and the study participants for their contribution and availability.

Authors' contributions: NALG and EGK participated in the study design; NALG and EGK wrote the project; MMS followed the patients in the clinic; HT, LFT, and MCS processed the samples and established the repository; NALG, CJG, and MTMG,

performed the laboratory assays; NALG, CJG, JLM, LFT, and EGK analyzed the data, NALG and EGK wrote the manuscript; NALG, RSD and EGK reviewed the manuscript; RSD, ECS, and EGK obtained funds for the study.

ABSTRACT (182 words)

Introduction: After HIV-1 infection, a priviledged group of subjects control viral replication to low levels, without the use of antiretroviral drugs. Some HLA alleles are associated with this control and to slower progression to immunodeficiency, especially the HLA-B*57. Objectives: The aim of this study was to confirm the association of HLA-B*57 with viral control in recently HIV-1-infected subjects. Patients and Methods: A cohort of 228 recently HIV-1-infected subjects was evaluated for CD4+, CD8+ T cell counts, viral loads, and HLA typing .Results: Of those, 15 (7.2%) were HLA-B*57. This genotype was strongly correlated with favorable laboratory outcomes. HLA-B*57 subjects presented higher CD4+ T cell counts (p=0.043) and lower viral loads at the baseline visit (p=0.001). Eight (53.3%) out of 15 HLA-B*57 subjects presented undetectable viral load at the baseline visit (Group A) and seven (46.6%) had detectable viremia (Group B). However, the CD4+ T cell counts were not different between the two groups. Conclusions: These results confirms the protective association of HLA-B*57 allele with better laboratory outcomes in HIV-1 infection, demonstrated by better CD4+ T cell counts and lower viral loads. Nevertheless, different profiles may exist within this group of subjects. The diverse viral control in such subjects may help better understand the pathogenesis of HIV-1 infection.

INTRODUCTION

HLA-B57 has been shown to be strongly associated with slow disease progression in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Rare HIV-1 infected individuals, termed long-term nonprogressors (LTNPs), maintain stable and/or low plasma viral load and normal CD4+ T cells counts without therapy for longer time (1,2) another privileged group, the elite controllers, seem to control viral replication to very low levels, despite the use of antiretroviral drugs (1). In both groups, HIV-1 induces to a vigorous and effective immune response to the virus antigens, which is unfortunately not the case for the majority of HIV-infected subjects. . Because CD8+ T cell responses are widely detected in such individuals, class I major histocompatibility complex (MHC) pathway has been long thought as a one of the key mechanisms for virus control. Among the several evidences, the association of better disease outcome and human leukocyte antigen (HLA) heterozygosity strongly suggested that the breath of class I MHC-mediated responses is important for the host (3).

Some HLA alleles have been described to be associated with lower HIV viral loads and with slower progression to immunodeficiency, such as B27 and B*57 (4,5). Acute HIV infection in B*57 patients are also less likely to present symptoms and better control viral replication after acute phase (6). On the other side of the spectrum, B35 positive individuals seem to progress faster to disease (3).

The mechanisms governing the protection induced by MHC pathway remains to be determined. It has been suggested that HLA molecules directly interfere in viral replication (7), although more studies are warranted to confirm this hypothesis.

The aims of this study was to address how HLA B*57 interferes with disease progression in a cohort of recently HIV-1-infected subjects and better characterize this group of individuals. We were able to identify two distinct groups of subjects: the first who successfully control HIV replication and the second who presents with detectable viremia. The identification of such groups provides a unique fertile ground to investigate the details of cellular immune control of HIV and the pathogenesis of disease progression.

PATIENTS AND METHODS

In this prospective study, 228 recently HIV-1-infected, antiretroviral naïve subjects were evaluated. All patients were enrolled as a part of the prospective cohort of recently HIV-1-infected subjects, after providing Institutional Review Board-approved written informed consent. The recently HIV-1-infected patients were identified by the Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS) (8,9).

Laboratory exams were performed in every 3-4 months after the initial clinical appointment. The initiation of treatment followed the Ministry of Health Guidelines for HIV therapy in Brazil (10). The patients were tested for clinical and virological status as well as the presence of others coinfections at enrollment and after one year of follow up. Age, gender, race, transmission route, and laboratory data were obtained as previously described

CD4+ and CD8+ T cell counts were performed using a lymphocyte marking technique with CD3, CD4, and CD8 conjugated monoclonal antibodies (TriTest, BD Biosciences, San Diego, California, USA). The plasma RNA measurements were performed using the Amplicor HIV-1 Monitor test, version 1.5 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) until January 2007, which was subsequently replaced by the branched DNA (bDNA) assay (Versant® - bDNA HIV-1 RNA 3.0 ASSAY, Bayer Health Care LLC Tarrytown, NY). Both were performed according to manufacturer's protocols.

Genomic DNA extraction was performed using QIAamp® DNA Blood Kit (QIAGEN), following manufacturers' instructions. HLA typing was carried out either by SSP, using the SSP Uni tray kit (Pel Freez, Brown Deer, Wisconsin, USA) or by PCR-SSOP, using the LABType SSO kit (One Lambda, Inc., Canoga Park, California, USA). Both kits were used following the manufacturers' instructions.

All baseline plasma samples were also tested for the presence of E2 antibodies against GBV-C envelope glycoprotein E2 and the presence of GBV-C RNA in plasma was determined by a GBV-C-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction assay and GBV-C viral load was determined by real-time PCR, as previously described (11). The evaluation was performed after HIV seroconversion in order to establish the

prevalence of GBV-C infection near the time of HIV seroconversion and after one year of enrollment (12).

Viral load, CD4+ and CD8+ T cells were defined as variables at baseline, as well as their zenith and nadir values throughout each participant's follow-up, until initiation of antiretrovirals when applicable. Each allele was analyzed for all the laboratory variables and compared using Mann-Whitney non-parametric test. Viral loads were also categorized as <400 or >400 copies/ml for allele associations using Fisher exact test. Significant differences were considered when $p<0.05$.

RESULTS

Out of 228 subjects included in this cohort, 208 (91.6%) were men, 194 (85.5%) of whom reported practicing sex with men. Almost half declared themselves as Caucasians (125, 55.0%), the median age was 32 years-old (range, 18 to 70), and all participants reported HIV acquisition via sexual practices. The demographic and laboratory findings are summarized in Table 1. Twenty participants were excluded from the analyses of HLA associations to disease progression because the baseline CD4+ T cell count or viral load was not available at baseline. The baseline laboratory findings are also described in Table 1, compatible to what would be expected in recently infected subjects.

The allele B*57 was detected in 7.2% of the subjects, who presented lower HIV viral load values, either the zenith or the nadir values in their follow-up ($p=0.006$ and $p<0.001$, respectively), when compared to those who did not have this allele (Table 2). Like HIV viral loads, nadir CD4+ T lymphocyte counts were higher in B*57 subjects ($p=0.036$), although the zenith values were not significantly higher ($p=0.060$, Table 3). The nadir CD8+ T lymphocyte values were lower in B*57 subjects ($p=0.013$), but, again, no significant differences were noted in the zenith values ($p=0.077$, Table 4).

We further investigated the influence of other alleles besides B*57. As shown in Table 5, no influence in HIV viral load was detected when other alleles previously associated with protection against disease progression were evaluated, such as B27, B51, and B58.

We could clearly identify two distinct groups of HLA B*57 subjects at baseline. As demonstrated in Table 6, eight (53.3%) out of 15 subjects (Group A) had viral loads <400 copies of HIV-RNA/ml, whereas seven (46.6%) had >400 copies of HIV-RNA/ml (Group B), which resulted in a significant difference between the two groups ($p=0.0002$). On the other hand, no difference was observed in CD4+ or CD8+ T cell counts at baseline comparing the two groups ($p=0.7984$ and $p=0.8785$, respectively). The laboratory profile comparing the two groups is shown in Figure 1.

DISCUSSION

In this study, we aimed at determining the impact of HLA B*57 in a cohort of recently HIV-1-infected subjects. Our data confirmed previous observations that this genotype is associated with a favorable effect in disease pathogenesis (1,2,4-6). By showing a lower early HIV viral load and higher historical values in subjects prior to initiation of antiretroviral therapy, we speculate the main effect of such association is related to better control of HIV replication. Nevertheless, a favorable effect was also detected in CD4+ T lymphocyte counts, but at a lesser extent than what was seen in HIV viral load.

To ascertain the independency of such effect, we have also addressed potential influence of other HLA alleles in the cohort's outcomes, especially those belonging to the serological Bw4 motif. No association was observed when we analyzed B*27, B*51, and B*58, the latter closely related to B*57 (13). In fact, B*57 and B*58 present several resemblances, including their preferred binding peptides (14-16), leading to the hypothesis that other mechanisms may be involved in the B*57 protection phenotype. In fact, CD8+ T cells restricted to B*57 are readily detected in recent infection, which suggests that cellular immune response is involved in early viral control (17).

The protection association of B*57 and HIV viral control seems to be variable. As demonstrated in Table 6, two quite distinct groups of subjects were identified, the first with outstanding control of viral replication, fitting the definition of elite controllers, and the second group who allows viral replication. It is not clear why distinct outcomes are seen in B*57 subjects who acquire HIV infection.

The first possibility could be related to the allele subtype. Yu et al. have explored how B*5701 and B*5703, despite a difference in two aminoacids, present the same dominant Gag KAFSPEVIPMF peptide (KF11), but with distinct TCR beta-chain repertoire heterogeneity, which results in less effective response by B*5703 (18). Therefore, one can speculate that specific B*57 subtypes could carry the protective effect. However, as seen in Table 6, we could not identify an enrichment of B*57:01 genotype in the controllers' group to confirm this hypothesis; on the contrary, no particular subtype distribution pattern could be detected.

The second possibility is that the B*57 allele could only constitute a particular haplotype. Due to the limited number of subjects in our cohort, in particular those who are B*57 positive, we could not further explore this hypothesis. Population based studies or combinations of different cohorts of HIV-infected subjects may be required for such analyses.

The third possibility could involve other factor that, in combination with B*57, may lead to better disease outcome. This could involve, but are not limited to, antigen intracellular processing mechanisms, antigen presentation pathways, recognition by the T cell receptor, and cross-stimulation of NK cells through HLA and KIR receptors interactions (19-21) Unfortunately, we did not have access to the KIR genetic typing from our B*57 subjects to evaluate potential HLA and KIR interactions.

CONCLUSIONS

In this report, we were able to confirm the association between HLA B*57 and better laboratory outcomes in HIV-1 infection. This is the first description of B*57 frequency in a population of HIV-1-infected subjects, at 7.2%. The presence of this allele was associated with lower HIV viral loads and higher CD4+ T cell counts and lower CD8+ T cell counts, the latter potentially reflecting lower cell activation status. Two distinct groups of subjects were identified at baseline: the first with viremia control and the second with detectable viral replication. Surprisingly, no difference was observed in the levels of CD4+ T cell counts between the two groups. This finding reflect that other factors may play a role in the protective role of B*57, which remain to be determined.

REFERENCES

1. Migueles S, Sabbaghian M, Shupert W, Bettinotti M, Marincola F, Connors M et.al. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Nat. Acad Sci*. 2000;97:2709-14.

2. Poropatich K, Sullivan D J J. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. Journal of General Virology (2011), 92, 247–268

3 Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, O'Brien SJ, et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*. 1999;283:1748-52.

4. O´Brien SJ, Gao X, Carrington M. HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends Mol Med.* 2001;7:379-81.

5. Kaslow A, Carrington M, Apple R, Lark L, Munoz A, Saah A, Mann D, et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature Med*. 1996;2:405-11.

6. Altfeld M, Addo M, Rosenberg E, Hecht F, Lee P, Walker B, et al. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS.* 2003;17:2581.

7. Gillespie G, Stewart-Jones G, Rengasamy J, Beattie T, Bwayo J, Rowland-Jones, et al. S. 2006. Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity characterize a B*57-restricted iimune response in HIV-1 infection. *J Immunol.* 2006;177:3893-902.

8. Kallas EG, Bassichetto KC, Oliveira SM, Goldenberg I, Bortoloto R, Moreno DM et al. Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency

virus (HIV) seroconversion (STARHS) strategy in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2004:8:399-406.

9. Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *Jama.* 1998;280:42-8.

10. http://www.aids.gov.br/publicação.

11. Maidana-Giret MT, Silva TM, Sauer MM, Tomiyama H, Levi JE, Kallas EG, et al. GB virus type C infection modulates T-cell activation independently of HIV-1 viral load. AIDS. 2009 Nov 13;23(17):2277-87.

12**.** Giret MTM, Miraglia JL, Sucupira MCA, Nishiya A, Levi JE, Kallas EG, et al. revalence, Incidence Density, and Genotype Distribution of GB Virus C Infection in a Cohort of recently HIV-1-Infected Subjects in Sao Paulo, Brazil. PLoS ONE 2011.6(4).

13. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Goulder PJ, et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*;2004;432:769-74.

14. Frahm N, Goulder P, Brander C.2003. Broad HIV-1 specific derived, optimally defined CTL epitopes. HIV immunology and HIV/SIV vaccine databases, 3-24.

15. Leslie A, Pfafferott K, Chetty P, Draenert R, Addo M, Goulder P et al.. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med*. 2004;10:282-9.

16. Goulder P, Bunce M, Krausa P, Mcintyre k, Crowlwy s, Mcmichael J, et al. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12:1691-8.

17. Koup R, Safrit J, Cao Y, Andrews C, Mcleod G, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994;68:4650-5.

18 Yu X, Lichterfeld M, Chetty S, Williams K, Mui S, Goulder P, et al. Walker B. Mutually exclusive T-cell receptor induction and differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 mutational escape associated with a two-amino-acid difference between HLA class I subtypes. *J Virol*. 2007;81:1619-1931.

19. Martin M. P., X. Gao, J H Lee, G W. Nelson, R. Detels, O'Brien, et. Al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. Nat Genet 2002 31:429-434.

20. Alter G., M. P. Martin, N. Teigen, W. H. Carr, T. J. Suscovich, A. Schneidewind, H. Streeck, M. Waring, A. Meier, C. Brander, J. D. Lifson, T. M. Allen, M. Carrington, and M. Altfeld.. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. J Exp Med 2007 204:3027-3036.

21. Alter G., S. Rihn K. Walter, A. Nolting, M. Martin, E. S. Rosenberg, J. S. Miller, M. Carrington, and M. Altfeld. 2009. HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol 83:6798-6805).

Table 1: Demographic and laboratory characteristics at baseline of the study participants

.

	Total	*Percentage*	*Median*	*IQR*** 25%-75%*
Gender				
- Male	209	91.6		
- Female	19	8.4		
Ethnicity				
- Caucasian	126	55.0		
- Mullato	44	19.4		
- Black	15	6.6		
- Other *	43	19.0		
Route of acquisition				
- MSM **	195	85.5		
- Heterosexual	33	14.5		
Age (years)			30.8	24.8 - 36.3
CD4+ T lymphocytes (cells/µl)			520	402 - 698
CD8+ T lymphocytes (cells/µl)			912	631 - 1199
Viral load				
- HIV-RNA copies/ml			20300	3875 - 64076
- $\log_{10}$			4.3	3.6 - 4.8

* Indian descendents, Asia descents, multirracial
** MSM: men who have sex with men
*** IQR: interquartile range

Table 2. Presence or absence of B*57 allele was analyzed for the levels of viral load during the subjects' follow-up, before initiation of antiretroviral therapy.

	B*57	Mean	SD*	Median	Minimum	Maximum	n	p
Nadir viral load	Negative	29481.24	90047.65	3247	49	70400	193	0.006
	Positive	4368.53	10103.24	139	49	33100	15	
Zenith viral load	Negative	109431.27	139636.57	52500	399	704000	193	<0.001
	Positive	68096.87	149400.48	2756	105	437000	15	

* SD: standard deviation

Table 3. Presence or absence of B*57 allele was analyzed for the levels of CD4+ T lymphocyte counts during the subjects' follow-up, before initiation of antiretroviral therapy.

	B*57	Mean	SD*	Median	Minimum	Maximum	n	p
Nadir viral load	Negative	327.89	145.90	289	7	876	193	0.036
	Positive	449.80	231.60	434	172	1055	15	
Zenith viral load	Negative	727.19	284.85	684	128	2449	193	0.060
	Positive	908.73	423.70	942	372	2147	15	

* SD: standard deviation.

Table 4. Presence or absence of B*57 allele was analyzed for the levels of CD8+ T lymphocyte counts during the subjects' follow-up, before initiation of antiretroviral therapy

	B*57	Mean	SD*	Median	Minimum	Maximum	n	p
Nadir viral load	Negative	720.03	492.89	646	106	4358	193	0.013
	Positive	482.73	174.85	503	164	747	15	
Zenith viral load	Negative	1391.47	796.18	1189	106	4680	193	0.077
	Positive	1017.07	370.65	1009	360	1527	15	

* SD: standard deviation

Table 5. Association between HIV viral load at baseline and different HLA-Bw4 alleles.

HLA allele	HLA status	HIV-RNA viral load				n	p value
		<400 copies/ml		≥400 copies/ml			
		n	%	n	%		
B*27	Negative	26	13.2	171	86.8	197	0.646
	Positive	2	18.2	9	81.8	11	
B*51	Negative	26	14.1	159	85.9	185	0.746
	Positive	2	8.7	21	91.3	23	
B*57	Negative	20	10.4	173	89.6	193	<0.0001
	Positive	8	53.3	7	46.7	15	
B*58	Negative	27	14.1	165	85.9	192	0.707
	Positive	1	6.3	15	93.8	16	
Total		28	13.5	180	86.5	208	

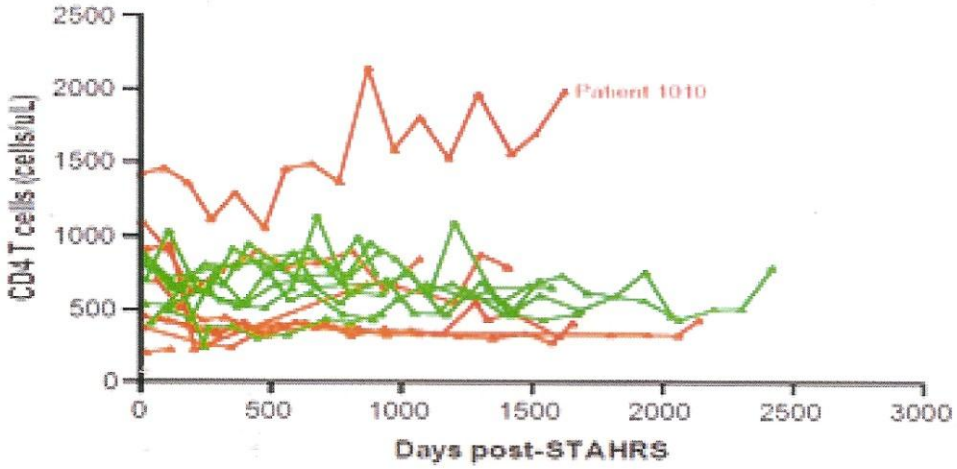
Table 6. Laboratory characteristics of two distinct groups of B*57 subjects. Group A successfully controlled viral replication, whereas Group B had detectable HIV viral load at baseline B*57 alleles were typed at four digits resolution.

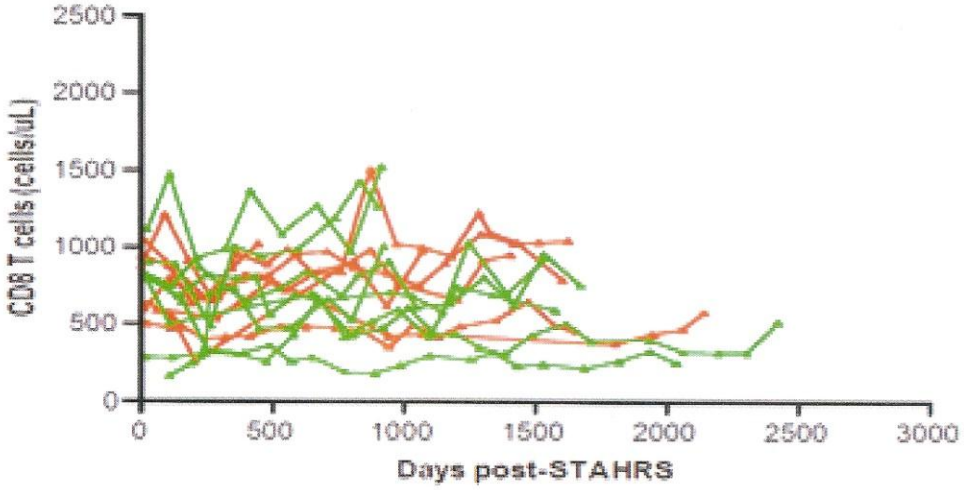
	Treated	HLA			Baseline CD4+ T cells	Baseline CD8+ T cells	Baseline HIV-RNA viral load
		Locus A	Locus B	Locus C			
Group A							
1034	No	A*02, A*03	B*15:10, **B*57:02**	C*02, C*08	534	283	**<400**
1060	No	A*30, A*32	B*14:02, **B*57:03**	C*08, C*18	799	904	**<400**
1073	No	A*01, A*34	B*35:03, **B*57:01**	C*07, C*18	486	164	**<400**
1098	No	A*03, A*26	B*27:05, **B*57:03**	C*01, C*18	879	812	**<400**
1103	No	A*01, A*02	B*35:05, **B*57:01**	C*04, C*06	813	796	**<400**
1123	No	A*01, A*30	B*14:02, **B*57:01**	C*06,C*08	702	1116	**<400**
1173	No	A*26, A*68	B*15:20, **B*57:01**	C*03, C*06	839	830	**<400**
1174	No	A*23, A*24	B*44:03, **B*57:03**	C*07, C*16	404	784	**<400**
				Median	751	804	**<400**
				Percentile 25%	522	659	**<400**
				Percentile 75%	820	849	**<400**
Group B							
1010	No	A*31, A*68	B*39:03, **B*57:03**	C*07, -------	1422	877	3800
1012	No	A*01, A*32	B*14:01, **B*57:01**	C*07, C*08	910	633	6330
1016	Yes	A*02, -------	B*51, **B*57:01**	C*02, C*15	372	1049	426000
1053	Yes	A*01, A*68	B*07:02, **B*57:01**	C*06, C*07	198	503	24500
1104	No	A*01, A*02	B*49:01, **B*57:01**	C*06, C*07	451	593	51900
1161	No	A*02, A*30	B*18:01, **B*57:01**	C*05, C*06	1098	938	906
2038	No	A*01, A*11	B*51, **B*57:01**	C*06, C*15	698	589	5100
				Median	698	633	6330
				Percentile 25%	412	591	4450
				Percentile 75%	1004	908	38200

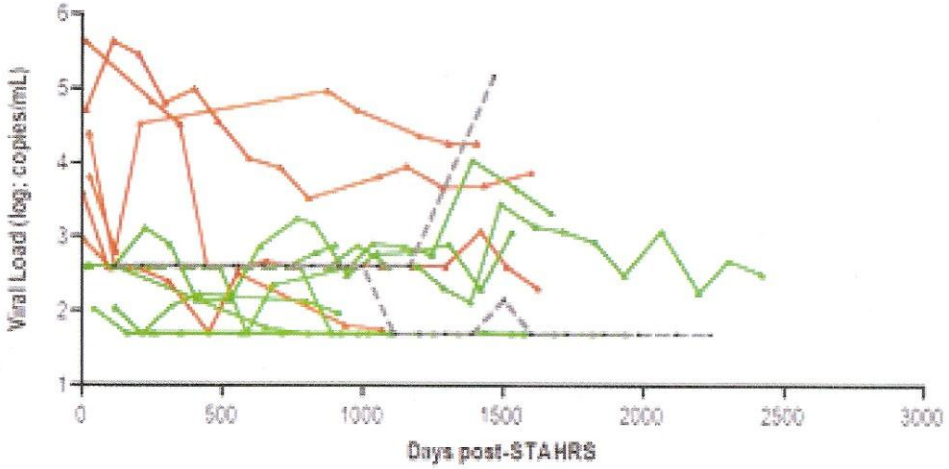
Figure 1: Follow-up cohort B*57

Figure Legends

Figure 1: The laboratory follow-up of HLA B*57 subjects is shown for (A) CD4+ T cell counts, (B) CD8+ T cell counts, and (C) HIV-RNA viral load. The subjects are divided into two groups based on their baseline HIV-RNA viral loads: Group A (green lines) baseline viral loads were <400 HIV-RNA copies/ml, whereas Group B (red lines) subjects presented with >400 HIV-RNA copies/ml. In panel C, viral loads in two participants, 1016 and 1053 (both in Group B), are represented in dashed lines when they were put on antiretroviral therapy. Patient 1010 is highlighted in panel A because he is HTLV-coinfected. Two patients from Group B (1016 and 1053) started on antiretrovirals and their lines are converted in dashed lines upon initiation of therapy.


CD4 T cells (cells/uL)
2500
2000
1500
1000
500
0
Patient 1010
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
Days post-STAHRS


CD8 T cells (cells/uL)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
Days post-STAHRS


Viral Load (log; copies/mL)
6
5
4
3
2
1
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
Days post-STAHRS

Anexo V. Submissão do artigo científico (páginas 96-117)

---------- Mensagem encaminhada ----------
De: <sgpbjid@sgponline.com.br>
Data: 19 de abril de 2011 19:11
Assunto: Artigo Submetido SGP/ BJID
Para: nancylgouvea@gmail.com

Brazilian Journal of Infectious Deseases
Rua Alfredo Magalhães, 04
Salvador, BA - Brazil
CEP 40140-140

Bahia, terça-feira, 19 de abril de 2011

Ilmo(a) Sr.(a)
Prof(a), Dr(a) Nancy Alves de Lima Gouvea

Referente ao código de fluxo: 847
Classificação: Artigo Original

Informamos que recebemos o manuscrito HLA B*57 and recent HIV infection: laboratory characteristics and impact on viral control. e será enviado(a) para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) Brazilian Journal of Infectious Diseases. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número de código de fluxo apresentado acima.

O (s) autor (es) declara(m) que o presente trabalho é original, sendo que o seu conteúdo não foi nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, brasileiro ou do Exterior, seja no formato impresso ou eletrônico.
Obrigado por submeter seu trabalho para a(o) Brazilian Journal of Infectious Diseases.
Atenciosamente,

Carlos Brites
Managing Editor

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. UNAIDS. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS AIDS Epidemic Update. *Special Report on HIV//AIDS*; 2006.

2. Levi GC, Vitoria M. Fighting against AIDS: the Brazilian experience. *Aids.* 2002;16:2373-83.

3. Levi JA, Shimabukuru J, Mchugh, T, Casavant, C, Stites D, Oshiro, L. AIDS-associated retroviruses (ARV) can produtivetly infect othor cells besides human T helper cells*. Virology.* 1985b;147:441-8.

4. Salahuddin SZ, Markham PD, Popovic M . Sarngadharan MG, Ornforff S, Fladagar A, Patel A, Gold J, Gallo RC. Isolation of infection human T-cell leukemia/lymphotropic virus type III (HTLV-III) from patients with acquired immunodeficiency sydrome (AIDS) or AIDS-related complex (ARC) and from healthy carries: a study of risk groups and tissue sources. *Proc Natl Acad Sci USA*.1985;82:5530-4.

5. Coffin JM. Structure and classification of retrovirus. In: Levy, J. A. *The Retroviridae*. New York: Plenum Press; 2006.

6. Gelderblom HR, Ozel M, Hausmann EHS, Wi1992nkel T, Pauli Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV), immunolocalization of structural proteins and virus-cell relation. *Micron Microscop.1988;*19:41-60.

7. Mccclune JM, Rabin LB, FeinbergMB, Lieberman M, Kosec JC, Reyes GR, Weismann IL. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988;53:55-67.

8. Ozel M, Pauli G, Gelderblom HR. The organization of the envelope projections on the surface of VIV. *Arch Virol*., 100:255-66, 1988.

9. Pinter A, Honenn WJ, Tilley SA, Bona C, Zaghouani H, Gorny MK, Zolla-Pazner S. Oligomeric struture of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1989; 63:2674-9.

10. Earl PL, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA. 1990;*87:648-52.

11.Weiss CD, Levy JA, Whitw JM. Oligomeric organization of gp120 on infections human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol.* 1990*;* 645674-77.

12. Deng HK, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di-marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a Major Co-receptor for Primary Isolates of HIV-1*. Nature*. 1996;381:661-6.

13. Ratner L, Gallo RC, Wong Stall F. HTLV III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature*. 1985;313:636-7.

14. Varmus HE, Swanstrom R. Replication of retrovirus. In: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J, editors. *RNA tumor viruses*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory. 1985;75-134.

15. Panganiban A, & Fiore D. Ordered interstrand and intrastrand DNA tranfer during reverse trancription. *Science*. 1988;241:1064-9.

16. Luciw PA, Shaw KE, Unger RE, Planelles V, Stout MW, Lackner JE, Pratt-Lowe E, Leung NJ, Banapour B, Marthas ML.Genetic and biological comparisons of pathogenic and nonpathogenic molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIVmac) *AIDS Res Hum Retrov.* 1992*;*8:395-402.

17. Sheridan PL, Sheline CT, Miloco SH, Jones KA. Tat and the HIV promoter: a model for RNA-mediated regulation of transcription*. Semin Virol. 1991;*4:69-80.

18. Cullen BR, Greene WC. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell.* 1989*;* 58:423-6.

19. Pomerantz RJ, Seshamma T, Trono D. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Ver: potential implicationns for latency. *J Virol*. 1992;66:1809-13.

20. Delassus S, Cheynier R, Wain Hobsons. Evolution of human immunodeficiency virus type I Nef and long terminal repeat sequences over 4 years in vivo and in vitro*. J Virol.* 1991*;*65:225-31.

21. Cullen BR. The role of Nef in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses. *Virology. 1994;*205:1-6.

22. Janvier K, Petit C, Le Rouzic E, Schwartz O, Benichou S. HIV auxiliary proteins: an interface between the virus and the host. *AIDS*. 2000;14(Suppl3):S21-30.

23. Learmont J, Cook L, Dunckley H, Sullivan JS. Update on long-term syptom-less HIV type 1 infection in recipients of blood products from a single donor. *AIDS Res Hum Retrovir.*1995*;*11:1.

24. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*. 1970;226:1209-11.

25. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature*. 1970;226:1211-3.

26. Clappham PR. HIV and chemokines: Ligants Sharing Cell-Surface Receptor. *Trends Cell Biol*. 1997;7: 264-68.

27. Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1995;9:76-7.

28. Abbas AK, Lichtman AH. O complexo principal de histocompatibilidade. In*: Imunologia celular e molecular*. 2005; 65-81.

29. Dausset J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol*. 1958;20:156-66.

30. Porto LCMS, Pontes LFS. E*studos de associação HLA x doenças*: extratos do I Simpósio Brasileiro. Rio de Janeiro: EdUerj; 2007. cap. 1.

31. Bender K. The HLA System. *Biotest Diagnostics*. 1991;5 ed Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

32. Abbas AK, Lichtman AH. O complexo de histocompatibilidade principal. Abbas AK, Lichtman AH editors. *Imunologia celular e molecular*. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter Editora; 1998. cap. 5, p.102-21.

33. Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet. 1948;*49:87-108.

34. Killmann SA. A study of antigens of human leukocytes. *Vox Sang.*1958*;* 3:409-25.

35. Van Rood JJ, Van Leeuwen A. Leukocyte grouping. A method and its application. *J Clin Invest*.1963;42:1382-90.

36. Yunis EJ, Amos DB. Three Closely Linked Genetic Systems Relevant to Transplantation. *Proc Nat Acad Sci*. 1971; 68:3031-5.

37. Eijsvoogel VP. Position of a locus determining mixed lymphocyte reaction distinct from the known HL-A loci. *Eur J Immunol*. 1972;2:413-8.

38. Duquesnoy RJ, Marrai M, Annen K. Identification of an HLA-DR-associated system of B cell alloantigens. *Transpl Proc.* 1979*;*11:1757-60.

39. Shaw S, Johnson AH. Evidence for a new segregant series of B-cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogenic proliferative and cytotoxic responses. *J Exp Med*. 1980;152:565-80.

40. Steinmetz M, Hood L. Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. *Science. 1983;*222:727-33.

41. Bjorkman PJ, Saper M, A, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class i histocompatibility antigen, hla-A2*. Nature*. 1987;329: 506-12.

42. Lamm LU. Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome no. 6 in a family with a pericentric inversion. *Hum Hered.* 1974*;* 24: 273-84.

43. Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia celular e molecular. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.p.71.

44. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. *HLA Class I antigens and alleles*: Workshops and Nomenclature. The HLA Facts Book. London: Academic Press; 2000 p.14-25.

45. Rammensee HG, Bachmann J, Stevanović S. *MHC ligands and peptide motifs*. Austin: Landes Bioscience; 1997.

46. Janeway CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchick M. *Immunobiology*: the immune system in health and disease. 5. ed. New York: Garland Publishing, 2001.

47. Mcdevitt HO. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. Palo Alto: *Ann Rev Immunol.* 2000*:*18:1-17.

48. Doherty PC, Zinkernagel RM. A biological role for the major histocompatibility antigens*. Lancet*. 1975:1406-9.

49. Magalhães PSC, Bohlke M, Neubarth F. Complexo principal de histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. *Rev Med UCPEL Pelotas. 2004;*2:54-9

50. Dorak MT, Shao W, Machulla HKG, Lobashevsky ES, Tang J, Park MH, Kaslow RA. Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization, *Genes Immun*. 2006;7:450-67.

51. http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/, acesso em 18/08/10

52. The HLA Informatics Group. The IMGT/HLA sequence database. Disponível em: http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/. Acesso em 30 nov. 2007.

53. Full list of HLA class II alleles assigned as of September 2007. Disponível em: http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/, lists/class2list.html. Acesso em:

54. Parham P. Virtual reality in the MHC. *Immunol Rev.* 1999;167:5-15.

55. Hill AVS, Jepson A, Plebanski M and Gilbert SC. Genetic analysis of host-parasite coevolution in human malaria. *Phi Trans R Soc Lond*. 1997b; 352:1317-25.

56. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, MunozA, Saah AJ. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*. 1996;2:405-11.

57.Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'brien SJ. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*. 1999;12 283:1748-52.

58. Borghans JA, Beltman JB, Boer RJ. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*. 2004;55:732-39.

59. Porto LCMS, Pontes LFS. *Estudos de Associação HLA x Doenças*: extratos do I Simpósio Brasileiro. Rio de Janeiro: EdUerj; 2007; 2.

60. Laivoranta-Nyman S, Mottonen T, Hermann R, Tuokko J, Luukkainen R, Hakala M, Hannonen P, Korpela M, Yli-Kerttula U, Toivanen A, Llonen J, FIN-RACo Trial Group. HLA-DR-DQ haplotypes and genotypes in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:1406-12.

61. Porto LCMS, Pontes LFS. *Estudos de Associação HLA x Doenças*: extratos do I Simpósio Brasileiro. Rio de Janeiro: EdUerj; 2007;1.

62. WHO Terminology Comitee. Nomenclature for Factors of the HLA System. *Tissue Antigens*.1984; 24:73-80.

63. WHO Terminology Comitee. Nomenclature for Factors of the HLA System. *Tissue Antigens*. 1987; 28:391-8.

64. Magor KE, Taylor EJ, Shen SY, Martinez-Naves E, Valiente NM, Wells RS, Gumperz JE, Adams EJ Little AM, Williams F, Middleton D, Gao X, Mccluskey J, Parham P, Lienert-Weidenbach K. Natural inactivation of a common HLA allele (A*2402) has occurred on at least three separate occasions. *J Immunol*. 1997;158:5242-50.

65. Alves C, Souza T, Toralles MBP and Oliveira I. Influência dos antígenos de histocompatibilidade humanos na susceptibilidade e expressão clínica de doenças psiquiátricas. *Rev Psiquiatr Rio Gd Sul* [online]. 2006;28:178-85.

66. http:// www.ebi.ac.uk/imgt/hla

67. http.:// www.hla.alleles.org

68. Marsh SG. Who Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update. *Tissue Antigens.* 2007;70:531-3.

69. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Terasaki P. Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Tissue Antigens*. 1992;39:161-73.

70. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Terasaki P. Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens.* 1994:44:1-18.

71. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998–1000.

72. Vooter CME. Sequence-based typing technical handbook. Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference., Utrecht: AZU Printing Office;1996, p.1-15.

73. Ayed K, Ayed-Jendoubi S, Sfar I, Labonne MP, Gebuhrer L. HLA class-I and HLA class-II phenotypic, gene and haplotypic frequencies in Tunisians by using molecular typing data. *Tissue Antigens.* 2004;64:520-32.

74. Middleton D, Hawkins BR, William F, Meenagh A, Moscoso J, Zamora J, Arnaiz-Vellena A. HLA class I allele distribution of a Hong Kong Chinese population based on high-resolution PCR-SSOP typing. *Tissue Antigens*. 2004;63:555-61.

75. Cao K, Moormann AM, Lyke KE, Masaberg C, Sumba OPP, Doumbo OK, Koech D, LancasterA, Nelson M, Meyer D, Single R, Hartzman RJ, Plowe CV, Kazura J, Mann DL, Sztein MB, Thomson G, Fernadez-Viña MA. Differentiation between African populations is evidenced by the diversity of alleles and haplotypes of HLA class I loci. *Tissue Antigens*. 2004;63:293-325.

76. Tiercy JM. Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transplant Immunol*. 2002;9:173-80.

77. Shankarkumar U, Prasanavar D, Ghosk K, Mohanty D. HLA A*02 allele frequencies and B haplotype associations in Western Indians. *Human Immunol.* 2003;64:562-66.

78. Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernadez-Viña MA. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Human Immunol*. 2001;62:1009-30.

79. Jaini R, Kaur G, Mehra NK. Heterogeneity of HLA-DRB1*04 and its associated haplotypes in the north indian population. *Human Immunol*. 2002;63:24-9.

80. Blanco-Gelaz MA, Lopez-Vazques A, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. Genetic variability, molecular evolution, and geographic diversity of HLA-B27. *Human Immunol.* 2001;62:1042-50.

81. Birinci A, Bilgici A, Kuru O, Durupinar B. HLA-B27 polymorphism in Turkish patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2005;26:285-7.

82. Huttley GA, Smith MW, Carrington M, O'brien SJ. A scan for linkage disequilibrium across the human genome. *Genetics.* 1999;152:1711-22.

83. Sanchez-Velasco P, Gomez-Casado E, Martinez-Lazo J, Moscoso J, Zamora J, Lowy E, Silvera C, Cemborain A, Leyva-conian F, Arnaiz-Villena A. HLA alleles in isolated populations from North Spain: Origin of the Basques and ancient Iberians. *Tissue Antigens* 2003;61:384-92.

84. Gomez-Casado E, Del Moral P, Martinez-Laso J Garcia-Gomez A, Allende L, Silvera-Redondo C, Longas J, Gonzalez-Hevilla m, Kandil M, Zamora j, Arnaiz-Villena A. HLA genes in Arabic speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians. *Tissue Antigens* 2001;55:239-49.

85. Arnaiz-Villena A, Dimitroski K, Pacho A, Moscoso J, Gomez-Casado E, Silvera-Redondo C, Varela P, Blagoevska M, Zdravkovska V, Martinez-Laso J. HLA genes in Macedonians and the Sub-Saharan origin of the Greeks. *Tissue Antigens* 2001a;57:118-27.

86. Muro M, Marin L, Torio A, Moya-Quiles M, Minguela A, Rosique-Roman J, Sanchis M, Garcia-Calatayud M, Garcia-Alonso A, Lvarz-Lopez M. HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): in the cradle of the archeological Iberians. *Hum. Immunol.* 2001;62:910-21.

87. Cresswell P. Antigen processing and presentation. *Immunol. Rev*. 2005;207:5-7.

88. Jacoby RK, and Jayson M I. HL-A 27 in Crohn's disease. *Ann Rheum Dis.* 1974;33:422-4.

89. Bluestone R. HL-A antigens in clinical medicine. *Dis Mon.* 1976;23:1-27.

90. Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N. The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Rev.* 2007;6:183-9.

91. Michou L, Croiseau P, Petit-Teixeira E, Du Montcel ST, Lemaire I, Pierlot C, Osorio J, Frigui W, Lasbleiz S, Quillet P, Bardin T, Prum B, Clerget-Darpoux F, Cornélis F, European Consortium on Rheumatoid Arthritis. Validation of the reshaped shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther.* 2006;8:R79.

92. Rammensee HG, Friede T, Stevanoviic S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetic.* 1995;41:178-228.

93. Gao XH, Winsey S, Ahmad T, Cook J, D agudeloJ, Zhai N, Powell J, Fuggle SV and Wojnarowska F. The Association Between HLA DR, DQ Antigens, and Vulval Lichen Sclerosus in the UK: HLA DRB1*12 and its Associated DRB1*12/DQB1*0301/04/09/010 Haplotype Confers Susceptibility to Vulval

Lichen Sclerosus, and HLA DRB1*0301/04 and its Associated DRB1*0301/04/DQB1*0201/02/03 Haplotype Protects from Vulval Lichen Sclerosus. *J Invest Dermatol.* 2005;125:895-9.

94. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996;382:722-5.

95. Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections*. Elsevier*, Curr Opin Immunol. 17: 510-16, 2005.

96. O`brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet.* 2004;36:565-74.

97. Robinson J, Waller MJ, Parham P, De Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SG. IMGT/HLA and IMGT/MHC: Sequence databases for the study of the Major Histocompatibility Complex*. Nucl Acids Res Oxford. 2003*;31:311-4.

98. Gillespie G, Stewart-Jones G, Rengasamy J, Beattie T, Bwayo J, Plummer F, Kaul R, Mcmichael A, Easterbrook P, Dong T, Yvonne Jones E, Rowland-Jones S. 2006. Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity characterize a B*57-restricted iimune response in HIV-1 infection. *J Immunol.* 2006;177:3893-902.

99. Poropatich K, Sullivan D J J. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. Journal of General Virology (2011), 92, 247–268

100. Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, O`brien SJ, Carrington M. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *New Engl J Med* 2001;344:1668-75.

101. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferott KJ, Hilton L, Zimbwa P, Moore S, Allen T, Brander C, Addo MM, Altfeld M, James I, Mallal S, Bunce M, Barber LD, Szinger J, Day C, Klenerman P, Mullins J, Korber B, Coovadia HM, Walker BD, Goulder PJ. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*;2004;432:769-74.

102. Justin RB, Thomas MW, Robert FS, Joel NB. Maintenance of viral suppression in HIV-1 infected HLA-B*57 elite suppressors despite CTL escape mutations. *JEM.* 2006;203:1357-69.

103. Kaslow R, Carrrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah A, Goedert J, Winkler C, O`brien S, Rinaldo C. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*. 1996;2:405-11.

104. Carrington M, O`brien S. The influence of HLA genotype on AIDS Annu.*Ann Rev Med.* 2003;54:535-51.

105. Hendel H, Caillat-Zucman S, Rappaport J, Winkler C. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol*. 1999;162:6942-6.

106. Jin X, Bauer D, Tuttleton S, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin C, Safrit J, Mittler J, Weinberger L. Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*. 1999;189:991-8

107. Goulder P, Philips R, Colbert R, Mcadam S, Ogg G, Nowak M, Giangrans P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, Mcmichael A, Rowland-Jones S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med.* 1997;3:212-17.

108. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz M, Peffer N, Meyers H, Nelson J, Gairin J, Hahn B, Oldstone M, Shaw G. Antiviral pressure exerted by HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med*. 1997;3:205-11

109. Price D, Goulder P, Klenermen P, Sewell A, Easterbrook P, Troop M, Bangham C, Phillip SR. Positive selection of HIV-1 Cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:1890-95.

110. Cao J, Mcnevin J, Malhotra U, Mcelrath M. Evolution of CD8+ T cell immunity and viral escape following acute HIV-1 infection. *J Immunol*. 2003;171:3837-46.

111. Allen TM, O´Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Mothe BR, Vogel TU. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viremia. *Nature* 2000;407:386-90.

112. O´Connor DH, Allen TM, Vogel TU, Jing P, Desouza IP, Dodds E. Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nat Med*. 2002;8:493-9.

113. Koup R, Safrit J, Cao Y, Andrews C, Mcleod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho D.1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994;68:4650-5.

114. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, and Odstone MB. 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia

in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68:6103-10.

115. Yang OO, Kalams SA, Trocha A, Cao H, Luster A, Johnson RP. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol.* 1997;71:3120-8

116. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999;283:857-60.

117. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature*. 1994;370:463-7.

118. Gupta KK. Acute immunosuppression with hiv seroconversion. *N Engl J Med*. 1993:328:288-9.

119. Martin AMA, Almeida CA, Cameron PB, Purcell AWC, Nolan DA, James LA, McCluskey JD, Phillips EE, Landay AF, Mallal SAB. Immune responses to abacavir in antigen-presenting cells from hypersensitive patients. *AIDS*. 2007;21:1233-44.

120. Hsin-Yun S, Chien-Ching H, Pi-Han L, Shu-Fang C, Ching-Yao Y, Sui-Yuan C and Shan-Chwen C. Incidence of abacavir hypersensitivity and its relationship with HLA-B*5701 in HIV-infected patients in Taiwan. *J Antimicrob Chemoth*. 2007;60:599-604.

121. Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, Shortino D, Baker KL, Spreen W, Lai E, Davies K, Handley A, Dow DJ, Fling ME, Stocum M, Bowman C, Thurmond LM, Roses AD. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. *Lancet*. 2002;359:1121-2.

122. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, Jagel-Guedes E, Rugina S, Kozyrev O, Cid JF, Hay P, Nolan D, Hughes S, Hughes A, Ryan S, Fitch N, Thorborn D, Benbow A. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med*. 2008;358:568-79.

123. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, Montefiori D, Orenstein JM, Fox C, Schrager LK. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1995;332:209-16.

124. Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC and Martin MA. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol.* 1998;72:164-9.

125. Evans DT, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Sidney J da Silva, Allen TM, Horton H, Venham JE, Rudersdorf RA, Vogel T, Pauza CD, Bontrop RE, Demars R, Sette A, Hughes AL, and Watkins DI. Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus *Env Nef. Nat Med.* 1999;5:1270-6.

126. O'Connor DH, McDermott AB, Krebs KC, Dodds EJ, Miller JE, Gonzalez EJ, Jacoby TJ, Yant L, Piontkivska H, Pantophlet R, Burton DR, Rehrauer WM, Wilson N, Hughes AL, Watkins DI. A dominant role for CD8+-T-lymphocyte selection in simian immunodeficiency virus sequence variation. *J Virol*. 2004;78:14012-22.

127. Barouch DH, Kunstman J, Glowczwskie J, Kunstman KJ, Egan MA, Peyerl FW, Santra S, Kuroda MJ, Schmitz JE, Beaudry K, Krivulka GR, Lifton MA, Gorgone DA, Wolinsky SM, Letvin NL. Viral escape from dominant simian immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in DNA-vaccinated rhesus monkeys. *J Virol*. 2003;77:7367-75.

128. Friedrich TC, Frye CA, Yant LJ, O'Connor DH, Kriewaldt NA, Benson M, Vojnov L, Dodds EJ, Cullen C, Rudersdorf R, Hughes AL, Wilson N and Watkins DI. Extraepitopic compensatory substitutions partially restore fitness to simian immunodeficiency virus variants that escape from an immunodominant cytotoxic-T-lymphocyte response. *J Virol*. 2004;78:2581-5.

129. Peyerl FW, Barouch DH, Yeh WW, Bazick HS, Kunstman J, Kunstman KJ, Wolinsky SM, and Letvin NL. Simian-human immunodeficiency virus escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition at a structurally constrained epitope. *J Virol.* 2003:77:12572-8.

130. Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, and Mallal SA. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. Science 2002;296:1439-43.

131. Altfeld M, Addo M, Rosenberg E, Hecht F, Lee P, Vogel M, Yu X, Draenert r, Johnston M, Strick D, Allen T, Feeney M, Kahn J, Sekaly R, Levy J, Rockstroh J, Goulder P, Walker B. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS.* 2003;17:2581-91.

132. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA. Vigorous HIV-1 specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997;278:1447-50.

133. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN. Loss of HIV-! Specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1 specific CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2004;200:701-12.

134. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predictis outcome after seroconversion. *Ann Intern Med.* 1995;122:573-9.

135. O´Brien SJ, Gao X, Carrington M. HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends Mol Med.* 2001;7:379-81.

136. Kaslow A, Carrington M, Apple R, Lark L, Munoz A, Saah A, Goedert J, Winkler C, O´Brien S, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, Mann D. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature Med*. 1996;2:405-11.

137. Migueles S, Sabbaghian M, Shupert W, Bettinotti M, Marincola F, Martino L, Hallahan C, Selig S, Schwart D, Sullivan J, Connors M. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Nat. Acad Sci*. 2000;97:2709-14.

138. Feeney M, Tang Y, Rooselvelt K, Leslie A, Mcintosh K, Karthas N, Walker B, Goulder P. Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-termnonprogressing child. *J. Virol*. 2004;78:8927-30.

139. Goulder P, Bunce M, Krausa P, mcintyre k, crowlwy s, morgan b, edwarsa a, giangrande p, phillips e, mcmichael J. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12:1691-8.

140. Kallas EG, Bassichetto KC, Oliveira SM, Goldenberg I, Bortoloto R, Moreno DM et al. Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (STARHS) strategy in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2004:8:399-406.

141. Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *Jama.* 1998;280:42-8.

142. http://www.aids.gov.br/publicação.

143. Terasaki, P.I. Histocompatibility testing.. Los Angeles: UCLA *Tissue* Typing Laboratory; 1980.

144. Alves C. Souza T, Veiga S, Toralles MBP, Lemaire DC. Polimorfismo do HLA de classe II em populações brasileiras. *Rev Ciências Med Biol*. 2005; 4.

145. Donadi EA, Silva ML, Santos PCM, Silveira RD, Deghaide NHS, Ferraz AS, Voltarelli JC. Frequência dos antígenos de histocompatibilidade na população normal da região nordeste do estado de São Paulo Brasil. *Medicina, Ribeirão Preto*. 2000;33: 19-26.

146. Rosales T, Guilherme L, Chiarella J, Marin ML, Rosales C, Melo CP, Goldeberg AC, Kalil, J. Human leukocyte a and B antigen, gene and haplotype frequencies in the population of the city of Säo Paulo in Brazil*. Braz J Med Biol Res*. 1992;25:39-47.

147. Araujo C, Belizário D, Cuiabano IS, Freire, Miriam Estela de Souza, Diaz CVC, silva SR, f. g. s.; silva, i. D. C. G. Screening do alelo HLA-B*5701 em associação à hipersensibilidade ao Abacavir em pacientes hiv positivos do estado de Mato Grosso*. J Hematol Hemother.* 2010;32(Supl.3)

148. Gjertson DW, Terasaki P. *HLA*;1998.

149. http://bioinformatics.nmdp.org/HLA/hla_res_idx.html

150. Tiwari JL, TerasakiP. *HLA and disease associations*. Springer-Verlag; 1985.

151. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenei or semiallogeneic system. *Nature* 1974; 248:701–702.

152. Trachtenberg EA and Erlich HA. A Review of the Role of the Human Leukocyte Antigen (HLA) System as a Host Immunogenetic Factor Influencing HIV Transmission and Progression to AIDS. HIV sequence database, 2010.

153. Horton H, Frank I, Baydo R, Jalbert E, Penn J, Wilson S, Mcnevin J, Mcsweyn M, Lee D, Huang Y, De Rosa S, Mcelrath M. Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is critical for immune control of HIV-1. *infection. J. Immunol*. 2006;177:7406-15

154. Brander C, Frahm N, Sango K, Adams S,Pae E, Cohen D, Wurcel A, Walker BD, Marincola F. International Conference on AIDS (15th : 2004 : Bangkok, Thailand): HLA-B15 subtypes associated with slow HIV disease progression share promiscuously binding, HLA-B27 or HLA-B57 restricted HIV CTL epitopes. Int Conf AIDS. 2004 Jul 11-16.

155. Frahm N, Goulder P, Brander C.2003. Broad HIV-1 specific derived, optimally defined CTL epitopes. HIV immunology and HIV/SIV vaccine databases, 3-24.

156. Leslie A, Pfafferott K, Chetty P, Draenert R, Addo M, Feeney M, Tang T, Holmes E, Allen T,Prado J, Altefeld M, Brander C, Dixon C, Ramduth D, Jeena P, Thomas S, St John Aroach T, Kupfer B, Luzzi G, Edwards A, Taylor G, Lyall H, Tudor-Williams G, Novelli V, Martinez-Picado J, Kiepiela P, Walker B, Goulder P. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med*. 2004;10:282-9.

157. Lund O, Nielsen M, Kesmir A, Petersen G, Lundegaard C, Worning P, Sylvester Hvid C, Roder G, Justesen S, Buus S, Brunak S. Defination of supertypes for HLA molecules using clustering of spcefificity matrices. *Immunogenetics*, 2004;55:797-810.

158. Sette A, Sidney J. Nine major HLA classe I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and HLA-B polymorphism. *Immunogenetics.* 1999;50:201-12.

159. Barber L, Percival L, Arnettt K, Gumperz J, Chen L, Parham P. Polymorphism in the alpha 1 helix of the HLA-B heavy chain can have an overrind influence on peptide-binding specificity. *J Immunol*. 1997;158:1660-9.

160 .Prilliman K, Jackson K, Lindsey M, Wang J, Crawfor D, Hildebrand W. HLA-B15 peptide ligands are preferentially anchored at their C termini. *J Immunolol*. 1999;162:7277-84.

161. Goulder PJ, Watkins DI. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol*. 2008 Aug;8(8):619-30

162. Kiepiela PA, leslie AJ, Honeyborne I, Ramduth D, Thobakgale C, Chetty S, Rathnavalu P, Moore C, Pfafferott KJ, Hilton L, et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*. 2004;432:769–75.

163. Meyer D, Single RM, Mack SJ, Erlich HA, Thomson G. Signatures of demographic history and natural selection in the human major histocompatibility complex Loci. *Genetics* 2006;173:2121-42.

164. Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guégan JF,Guernier E, Balloux F. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr. Biol*. 2005;15:1022–27.

165. Yu X, Lichterfeld M, Chetty S, Williams K, Mui S, Miura T, Frahm N, Feeney M, Tang Y, Pereyra F, Labute M, Pfafferott K, Leslie A, Crawford H, Allgaier R, Hildebrand W, Kaslow R, Brander C, Allen T, Rosenberg E, Kiepiela P, Vajpayee M, Goepfert P, Altfeld M, Goulder P, Walker B. Mutually exclusive T-cell receptor induction and differential susceptibility to human

immunodeficiency virus type 1 mutational escape associated with a two-amino-acid difference between HLA class I subtypes. *J Virol*. 2007;81:1619-1931.

166. Richard A. Kaslow, Janet M. Mcnicholl. Genetic Determinants of HIV-1 Infection and Its Manifestations. *Issue* 4, 1999;299–307.

167. Tang, J. Costello, C I. Keet, P. Rivers, C. Leblanc, S. Karita, E. Kaslow. A. HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type I infection . *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:317–24, 1999.

168. http://www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm

169. http://hivweb.lanl.gov/content/immunology/pdf/2000/intro/GenomeMaps.pdf

170. http://www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm

171. http://e-gastroped.com.br/jun05/cel02.jpg

172. http://igridext.cryst.bbk.ac.uk/www/PhD thesis.htm>. Acesso em: 03 jun. 2008.