



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Viviam Milanez Massolini

**Avaliação de polimorfismos genéticos na progressão da
infecção de pacientes monoinfectados e coinfectados com
os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus da
Hepatite C (VHC)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre(a) em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

**Botucatu
2015**

Viviam Milanez Massolini

Avaliação de polimorfismos genéticos na progressão da
infecção de pacientes mono infectados e co infectados
com os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus
da Hepatite C (VHC)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientadora: Profa.Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Coorientadora: Profa.Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Massolini, Viviam Milanez.

Avaliação de polimorfismos genéticos na progressão da infecção de pacientes monoinfectados e coinfectados com os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus da Hepatite C (VHC) / Viviam Milanez Massolini. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini
Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto
Capes: 20804008

1. HIV (Virus). 2. Infecções por HIV. 3. Hepatite por vírus. 4. Coinfecção. 5. Genes.

Palavras-chave: Coinfecção; Genes KIR; HIV; HLA; Vírus da Hepatite C.

VIVIAM MILANEZ MASSOLINI

Avaliação de polimorfismos genéticos na progressão da infecção de pacientes monoinfectados e coinfectados com os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus da Hepatite C (VHC)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de M. C. Pardini
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

_____/_____/_____
Membro: Prof. Dr. Alexandre Naime Barbosa
Departamento de Doenças Tropicais e
Diagnóstico por Imagem
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

_____/_____/_____
Membro: Prof. Dr. Atila Iamarino
Departamento de Microbiologia
Universidade de São Paulo - USP

Prefácio

O volume aqui apresentado intitulado **Avaliação de polimorfismos genéticos na progressão da infecção de pacientes mono infectados e co infectados com os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus da Hepatite C (VHC)**, constitui um estudo de caráter inédito, na linha de pesquisa de polimorfismos genéticos de indivíduos co infectados HIV/VHC, por tratar-se de uma análise completa da correlação dos 16 genes *KIR* relatados até o presente momento, com a progressão da infecção ocasionada pelo HIV.

Biomédica de formação iniciei minha vida acadêmica na Iniciação científica, ainda na graduação, ocasião a qual tive a oportunidade de trabalhar com a investigação de fatores virológicos, no caso a presença da variante B' do HIV, e a relação dos mesmos com a progressão da infecção pelo HIV em co infectados com os vírus HIV/VHC. Seguindo a mesma linha, agora com objetivo de correlacionar polimorfismos do hospedeiro com a progressão da infecção do HIV ingressei no mestrado e, o trabalho aqui apresentado é parte dos resultados destes anos de trabalho.

A primeira parte da dissertação consiste em uma revisão de literatura sobre os vírus HIV/VHC e a co infecção (HIV/VHC), os receptores *KIR*, sua importância e função nas células *Natural Killer* e, posteriormente uma breve revisão a respeito dos ligantes de *KIR*. Segue-se então os objetivos do estudo, as análises realizadas, resultados e discussão e a conclusão.

Durante o meu tempo de Mestrado também tive a oportunidade de realizar a padronização de uma metodologia *in house* para tipagem do HLA de classe I (A, B e C), a qual é apresentada aqui na forma de anexo que irá integrar o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Laboratório de Biologia Molecular, do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais **Wilson e Geraldá Massolini** e ao meu irmão **William Massolini**, que são minha família, meu porto seguro, que sempre estiveram ao meu lado nas horas difíceis e de felicidade e que sem o apoio deles não teria chegado até aqui. Obrigada por todo amor e carinho.*

*Dedico também aos **pacientes**, que lutam contra a doença em busca de uma qualidade de vida melhor e sem preconceitos e, que contribuíram para a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ *Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em minha vida, por me dar forças e por permitir a realização deste sonho me mostrando que não devo desistir frente às adversidades da vida.*

- ❖ *A minha mãe **Geralda Massolini** e ao meu pai **Wilson N. Massolini**, obrigada por se fazerem tão presentes e necessários, me ajudando gradativamente a ser a pessoa que sou, pelo apoio em todas as minhas decisões, por acreditarem em mim e pelo imenso amor e carinho. Obrigada por tudo.*

- ❖ *A minha tia **Maria Milanez**, meu tio **Antonio Milanez**, minha avó **Alvarina Massolini** e In memoriam aos meus avôs **Wilson Massolini** e **Francisco Milanez** e a minha avó **Luzia Milanez**, que contribuíram para que eu chegasse até aqui, obrigada pelo apoio, amor e carinho. Saudades dos que já se foram...*

- ❖ *A **Edmea F. M. Silva** e **Wilson Roberto da Silva** por todo o carinho e apoio para que eu chegasse até aqui.*

- ❖ *A minha orientadora Profa. Dra. **Maria Inês de Moura Campos Pardini**, pela oportunidade de ingressar na pesquisa e em seu laboratório ainda na iniciação científica, por acreditar em mim e na minha capacidade no desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo, pelo apoio e dedicação. Obrigada por me ensinar muito do que hoje eu sei.*

- ❖ *A minha coorientadora Profa. Dra. **Rejane Maria Tommasini Grotto**, que me ajudou a dar os primeiros passos na pesquisa, obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por acreditar em mim e na minha capacidade, obrigada pela orientação, pelo apoio e por tudo que me ensinou.*

- ❖ *A Profa. Dra. **Adriana Camargo Ferrasi**, muito obrigada pelo carinho, pelo apoio, pelos conselhos, ensinamentos e incentivo. Obrigada por ter participado e contribuído para que eu chegasse até aqui.*

- ❖ *A Profa. Dra. **Patrícia Carvalho Garcia**, pelos conselhos, pelo carinho, por se fazer presente nos momentos de dificuldade e também por estar sempre me incentivando e comemorando cada conquista minha. Obrigada pelos ensinamentos e por toda contribuição para que eu chegasse até aqui.*

- ❖ *A Dra. **Flávia Hebel Barboza Trovão**, por toda ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo tempo dedicado a me ensinar e pela ajuda nos experimentos. Obrigada pelo carinho, conselhos e incentivo, você foi muito importante para que eu conseguisse chegar até aqui.*

- ❖ *Ao Dr. **Alexandre Naime Barbosa** e a todos os funcionários do Serviço de Ambulatórios Especializados de infectologia “Domingos Alves Meira”, por toda ajuda e contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Dr. **Alexandre** pelos ensinamentos e colaboração e aos funcionários pela ajuda na coleta das amostras, dos dados e pelo carinho.*

- ❖ *Ao Dr. Giovanni Faria Silva e a todos os funcionários do Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da FMB-Unesp, pela colaboração e pela ajuda na coleta das amostras e dados.*

- ❖ *Aos pacientes que doaram as amostras para a realização deste trabalho.*

- ❖ *A todas as pessoas do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu em especial a Aline Faria Galvani, Francielle Martins, Caroline Nunes, Luiza Souza, Taize Beraldo, Kelly Precipito, Nathália Almeida e Michele Pronunciate pela ajuda durante o desenvolvimento do trabalho, pela companhia, pelo apoio, carinho, pelas conversas e risadas.*

- ❖ *A todos os funcionários da equipe do Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Regina Célia, Maércio Alho, Sarita Barreto e as aprimorandas Renata Zugaiib e Natália Picelli. Pela grande ajuda com as amostras e dados dos pacientes e a Renata pela ajuda na leitura dos resultados da tipagem do HLA.*

- ❖ *A todos os funcionários do Hemocentro da UNESP de Botucatu. Obrigada pelo apoio e carinho.*

- ❖ *A FAPESP por me contemplar com a bolsa de Mestrado e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.*

- ❖ *As minhas amigas Aliene Suzuki, Natália Cantão, Aline Galvani, Luiza Souza, Taize Beraldo, Renata Zugaib, Caroline Nunes, Fran Martins, Natália Coradi, Karina Massolini, Lethícia Massolini, por estar ao meu lado, pelos conselhos, apoio e carinho, obrigada pela amizade.*

- ❖ *Agradeço as companheiras de casa, Heloísa Garcia e Helga Nunes pela companhia, conselhos, conversas e pelas risadas.*

- ❖ *A Tathiane Silvestre e a Adrielle Levoratto pela amizade, conselhos e caronas.*

- ❖ *Obrigada a todos que de alguma forma, presenciaram a minha caminhada e que em algum momento do caminho se fizeram essências para que eu chegasse até aqui...*

EPÍGRAFE

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, nem somos o que iremos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther King

RESUMO

A vulnerabilidade humana à infecção pelo HIV não é uniforme, fatores virológicos e do hospedeiro são determinantes no risco da transmissão e na evolução natural da infecção. Polimorfismos (do hospedeiro) nos genes *KIR* estão sendo associados à evolução da infecção pelo vírus. Vários estudos vêm sendo realizados em monoinfectados pelo HIV-1, mas pouco se conhece a respeito da relação desses polimorfismos em coinfeção HIV/VHC. A finalidade deste estudo foi analisar a evolução da infecção pelo HIV em pacientes coinfectados HIV/VHC, baseada em parâmetros clínicos, laboratoriais e virológicos, correlacionando polimorfismos de genes *KIR*. Foram incluídas no estudo 251 amostras, as quais foram distribuídas em três grupos (Grupo 1: 100 indivíduos monoinfectados HIV-1; Grupo 2: 100 indivíduos monoinfectados VHC e Grupo 3: 51 coinfectados HIV/VHC). As determinações dos subtipos (HIV-1) e genótipos (VHC) foram realizadas por sequenciamento. As definições dos polimorfismos dos genes *KIR* foram determinados por PCR-SSP e do HLA, por sequenciamento. Dados referentes à evolução da infecção pelo HIV-1 e VHC foram analisados a partir dos prontuários médicos dos pacientes. Os resultados obtidos pelo presente estudo com relação aos genes *KIR*, *2DL2*, *2DS2* e *2DL5*, sugerem em caráter inédito a correlação destes polimorfismos com a evolução da infecção pelo VHC em indivíduos coinfectados. A inexistência de correlação dos polimorfismos dos genes *KIR* com a progressão da infecção pelo HIV-1 em coinfectados sugere que nesta condição, a presença do HIV-1 pode estar influenciando muito mais a progressão da doença pelo VHC do que o desenvolvimento de aids propriamente dito.

ABSTRACT

Human vulnerability to HIV infection is not uniform, virological and host factors are determinants on the risk of transmission and natural infection progression. *KIR* genes polymorphisms have been being associated with progression of HIV infection. Several studies have been performed in mono-infected by HIV-1, but few knowledge is known about the relation of these polymorphisms in coinfection by HIV/HCV. The purpose of this study was to assess the increasing of the infection by HIV in patients coinfecting HIV/HCV, based on clinical, laboratory and virological parameters and correlating *KIR* genes polymorphisms. The study included 251 samples which were divided into three groups (Group 1: 100 HIV mono-infected; Group 2: 100 mono-infected HCV; Group 3: 51 Co-Infected HIV/HCV). Determination of subtypes (HIV) and genotypes (HCV) was held using RNA sequencing. Polymorphisms definitions of *KIR* genes were determined by PCR-SSP and HLA were accomplished out by sequencing. Clinical and laboratory data, regarding the evolution of HIV and HCV infection were analyzed from the medical records of patients. The results obtained by this study concerning *KIR*, *2DL2*, *2DL5* and *2DS2* genes demonstrate the state-of-the-art on the correlation of these polymorphisms with evolution of HCV infection in coinfecting individuals. The absence of correlation between the polymorphism of *KIR* genes with progression of HIV-1 infection in co-infected, suggests that in this particular condition, the presence of HIV-1 may influence much more the disease progression by the HCV than the AIDS development in itself.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** Esquema representativo da estrutura do HIV, evidenciando RNA viral, glicoproteínas do envelope gp41 e gp120, proteína da matriz (p17), proteínas do capsídeo (p24) e a enzima transcriptase reversa.....31
- FIGURA 2:** Representação esquemática do Genoma do HIV, evidenciando os genes estruturais (*gag, pol, env*), acessórios (*nef, vpu, vif e vpr*), regulatórios (*tat e rev*) e as LTRs.....32
- FIGURA 3:** Representação da estrutura da gp120, evidenciando seus domínios interno e externo, além de uma região de ligação em forma de “*β-sheet*” (folha-beta), que é denominada *Bridging Sheet*. A molécula de CD4 se liga a uma cavidade da gp120 formada na junção entre os domínios interno, externo e a *Bridging Sheet*, enquanto que o correceptor liga-se provavelmente a uma região na base da proteína, entre a terceira região variável (alça V3) e a *Bridging Sheet*33
- FIGURA 4:** Representação esquemática da interação da gp 120 da membrana viral com o marcador de superfície celular CD4 na célula-alvo, expondo a terceira região variável da gp120 (V3) a qual se torna apta a ligação com os correceptores CCR5 e/ou CXCR4, conduzindo à condições necessárias para a fusão das membranas celular e viral, processo que é mediado pela gp41, ocorrendo internalização do nucleocapsídeo viral e continuidade do ciclo replicativo do HIV.....34
- FIGURA 5:** Representação esquemática da terceira região variável da gp120 do HIV-1 (alça V3), evidenciando a região conservada GPG no subtipo B e os dois resíduos de cisteína que se ligam por ponte dissulfeto dando, então, a essa região uma conformação em alça35

| | |
|--|----|
| FIGURA 6: Curso Clínico da Infecção pelo HIV..... | 37 |
| FIGURA 7: Esquema representativo da estrutura do VHC, evidenciando RNA viral, core protéico, proteínas do envelope e envelope viral..... | 40 |
| FIGURA 8: Representação esquemática da organização do RNA genômico do VHC, evidenciando as regiões 5'UTR que contêm IRES (<i>Internal Ribosome Entry Site</i>) e a 3'UTR que flanqueiam a ORF (<i>Open Reading Frame</i>), cuja poliproteína correspondente é clivada em proteínas estruturais e não estruturais, onde estão representados seus produtos proteicos e suas respectivas funções | 40 |
| FIGURA 9: Organização molecular e nomenclatura dos genes KIR. Os genes <i>KIR</i> apresentam três tipos de domínios: D0, D1 e D2. Os receptores <i>KIR</i> com três domínios têm configuração D0-D1-D2, já as moléculas com dois domínios podem ter configuração D1-D2, chamadas de tipo 1 ou D0-D2, conhecidas como tipo 2 | 46 |
| FIGURA 10: Receptores de ativação e inibição das células NK e suas respectivas funções..... | 47 |
| FIGURA 11: Sequência dos genes <i>KIR</i> nos haplótipos A e B | 48 |
| FIGURA 12: Eletrofosere em gel de agarose 2% do primeiro teste de <i>PCR-SSP</i> para genotipagem dos genes <i>KIR</i> | 59 |
| FIGURA 13: Eletrofosere em gel de agarose 2% referente à genotipagem dos genes <i>KIR</i> através de <i>PCR-SSP</i> da amostra de um indivíduo mono infectado HIV..... | 60 |

FIGURA 14: *Worksheet* utilizada na interpretação dos resultados obtidos através da *PCR-SSP* e revelados em gel de agarose 2%.....61

FIGURA 15: Eletroforese em gel de agarose 2% referente à Tipagem do HLA de classe I (A, B e C).62

FIGURA 16: Eletroforese em gel de agarose 2% da reação de *Nested-PCR* para amplificação da região *env* do HIV-1: (a) *Ladder* de 100pb, (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h),(i), (j), (l) e (m) pacientes positivos, banda única de aproximadamente 550pb correspondente a região *env* do HIV-1 e (n) controle negativo da reação.....64

FIGURA 17: Eletroforese em gel de agarose 2% da reação de *Nested-PCR* para amplificação da região genômica 5'UTR do VHC: (a) *Ladder* de 100pb (LGC Biotecnologia), (b), (c), (d), (e) e (f) pacientes positivos, banda de 214pb correspondente a região 5'UTR do VHC e (g) controle negativo.....65

FIGURA 18: Distribuição dos indivíduos de cada grupo com relação ao sexo.....66

FIGURA 19: Parte de um cromatograma obtido do sequenciamento da região genômica *env* do HIV, evidenciando uma sequência de boa qualidade, com espaçamento regular e picos nítidos.....68

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Epítomos dos Antígenos Leucocitários Humanos que são reconhecidos pelos *receptores* semelhantes às *imunoglobulinas* das *células NK*49
- TABELA 2:** Faixa etária dos indivíduos monoinfectados HIV-1 (Grupo 1), monoinfectados VHC (Grupo 2) e coinfectados HIV/VHC (Grupo 3).....67
- TABELA 3:** Distribuição dos pacientes do Grupo 1 (N=100) e Grupo 3 (N=51) segundo o fenótipo do arco da alça V3 da gp 120 do HIV (GPG ou GWG).....68
- TABELA 4:** Distribuição dos pacientes do Grupo 1 (N=100) e Grupo 3 (N=51) segundo o fenótipo do arco da alça V3 da gp 120 do HIV (NSI ou SI).....69
- TABELA 5:** Distribuição do Grupo 1 com relação a Antigenicidade e Capacidade de Indução de Sincício.....69
- TABELA 6:** Distribuição do Grupo 3 com relação a Antigenicidade e Capacidade de Indução de Sincício.....70
- TABELA 7:** Distribuição dos 100 indivíduos monoinfectados HIV-1 (Grupo 1) e coinfectados HIV/VHC (Grupo 3), com relação a Carga viral, contagem de células T CD4+ e classificação CDC.....72
- TABELA 8:** Distribuição dos indivíduos do Grupo 1 (N=100) segundo a TARV utilizada e tratamento atual.....74
- TABELA 9:** Distribuição dos indivíduos do Grupo 3 (N=51) segunda a TARV utilizada e tratamento atual.....75

| | |
|---|----|
| TABELA 10: Distribuição dos indivíduos dos Grupos 2 e 3 segundo variáveis relacionadas a evolução da infecção pelo VHC..... | 76 |
| TABELA 11: Distribuição dos Grupos 2 e 3, segundo a terapêutica utilizada no tratamento da Hepatite C..... | 78 |
| TABELA 12: : Distribuição da frequência absoluta, relativa e gênica dos genes <i>KIR</i> , nos Grupos 1, 2 e 3..... | 80 |
| TABELA 13: Frequência de cada gene <i>KIR</i> dos pacientes coinfetados (n=51) Grupo 3 e população controle Grupo 1 monoinfectados HIV-1 e Grupo 2 monoinfectados VHC..... | 82 |
| TABELA 14: Frequência absoluta e relativa de cada ligante de <i>KIR</i> dos pacientes coinfetados (n=30) Grupo 3 e população controle Grupo 1 monoinfectados HIV-1 e Grupo 2 monoinfectados VHC..... | 86 |
| TABELA 15: Frequência de <i>KIR</i> e seus ligantes..... | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C : Grau Celsius

CCR5 : Receptor C-C de quimiocina tipo 5, que funciona como correceptor viral

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control*)

cDNA: DNA complementar

CD4: Marcador de superfície celular

CD81: Tetraspanina diferenciação celular 81

CLDN: Claudinas

CRFs: Formas Recombinantes Circulatórias

CXCR4: Receptor C-X-C de quimiocina tipo 4, que funciona como correceptor viral

C1 a C5: Regiões constantes da gp120

CV: Carga viral

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTPS: Desoxinucleotídeos trifosfato

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

et al: e colaboradores

E1: Glicoproteína do envelope 1

E2/NS1: Glicoproteína do envelope 2

g: Expresso de RCF (força da centrífuga relativa à aceleração da gravidade)

gag, env, pol: Genes estruturais do genoma do HIV

gp120: Glicoproteína de superfície do envelope viral do HIV

gp41: Glicoproteína transmembrana do envelope viral do HIV

GPGR: Sequência de aminoácidos Glicina-Prolina-Glicina-Arginina

GWGR: Sequência de aminoácidos Glicina-Triptofano-Glicina-Arginina

G1: Grupo 1, representado pelos indivíduos monoinfectados HIV-1

G2: Grupo 2, representado pelos indivíduos monoinfectados VHC

G3: Grupo 3, representado pelos indivíduos coinfectados HIV/VHC

HGNC: *HUGO Gene Nomenclature Committee*

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Vírus*)

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

HUGO: *The Human Genome Organization*

IQR: Intervalo Interquartil

IRES: Sítio de entrada interno do ribossomo (*Internal Ribosome Entry Site*)

IF: Inibidores de fusão

II: Inibidores da integrase

IMGT: *International ImMunoGeneTics information system*

IP: Inibidores da Protease

ITAM: Motivo de ativação à base de tirosina do imunorreceptor

ITIM: Motivo de inibição a base de tirosina do imunorreceptor

ITRN/ITRnt: Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

ITRNN: Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

Kb: Kilobases (1 Kb= 1000 pares de bases)

KCl: Cloreto de potássio

KDa: Kilodaltons

KIR: *Receptores semelhantes às imunoglobulinas (killer immunoglobulin-like receptors)*

LDL-R: Receptor de lipoproteína de baixa densidade

Log: Logarítimo

LTR: *Long terminal repeat*

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mg: Miligrama

μL: Microlitro

mL: Mililitros

μM: Micrometro

mM: Milimolar

mm³: Milímetro cúbico

MQV: Maraviroque

nef, vpu, vif e vpr: Genes acessórios do genoma do HIV

NK: Natural Killer

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B: Proteínas não estruturais do genoma do VHC

NSI: Não Indutor de sincício

NR: Não respondedor

OCLN: Ocludinas

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORF: *Open Reading Frame*

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR-SSP: *Reação em cadeia da polimerase de seqüência de "primers" específicos*
(*Polymerase chain reaction-sequence-specific primers*)

PTK: Proteína tirosina cinase

PTP: Tirosina fosfatase

p7: Proteína do nucleocapsídeo do genoma do HIV

p11: Enzima protease do genoma do HIV

p17: Proteína da matriz do genoma do HIV

p24: Proteína do capsídeo do genoma do HIV

p32: Enzima integrase do genoma do HIV

p66: Enzima transcriptase reversa do genoma do HIV

pmol: Picomol

PVHA: Pessoas vivendo com HIV/AIDS

RE: Retículo endoplasmático

RNA: Ácido Ribonucléico

RVS: Resposta virológica sustentada

SAEI/DAM: Serviço de Ambulatório Especializado em Infectologia Domingos Alves

Meira

SI: Indutor de sincício

SR-BI: Scavenger Receptor Classe B tipo I

tat, rev: Genes regulatórios do genoma do HIV

TARV: terapia antirretroviral

TBE: Tris-Borato

Tris-HCl: Tris Hidrocloro

UNAIDS: Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV / AIDS (*Joint United Nations Program on HIV/AIDS*).

U : Unidades

U/ μ L: Unidades por microlitro

UTR: Região não traduzida (*Untranslated regions*)

UV: Luz ultravioleta

VGDN: *Viral Genetic Diversity Network*

VHC: Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C vírus*)

V1 a V5: Regiões variáveis da gp120

WHO: *WORLD HEALTH ORGANIZATION*

%: Porcentagem

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 26 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 30 |
| 2.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA..... | 30 |
| 2.1.1 Aspectos epidemiológicos..... | 30 |
| 2.1.2 Classificação genética, estrutura e ciclo de replicação..... | 30 |
| 2.1.3 Transmissão..... | 36 |
| 2.1.4 Curso Clínico da Infecção pelo HIV | 36 |
| 2.1.5 Terapia Antirretroviral (TARV) | 37 |
| 2.2 VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)..... | 38 |
| 2.2.1 Aspectos epidemiológicos..... | 38 |
| 2.2.2 Classificação, estrutura e ciclo de replicação | 39 |
| 2.2.3 Transmissão..... | 41 |
| 2.2.4 Curso Clínico da Infecção pelo VHC | 42 |
| 2.2.5 Tratamento Hepatite C..... | 42 |
| 2.3 COINFECÇÃO DO HIV COM VHC..... | 43 |
| 2.4 CÉLULA <i>NATURAL KILLER</i> (NK)..... | 43 |
| 2.5 RECEPTORES KIR | 44 |
| 2.6 LIGANTES DE KIR..... | 48 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 50 |
| 4 OBJETIVOS | 51 |
| 4.1 Objetivo Geral | 51 |
| 4.2 Objetivos Específicos..... | 51 |
| 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS..... | 52 |
| 5.1 Casuística..... | 52 |
| 5.2 Métodos..... | 53 |
| 5.2.1 Processamento inicial das amostras | 53 |
| 5.2.2 Subtipagem viral dos pacientes monoinfectados HIV-1 e coinfectados..... | 54 |
| 5.2.3 Genotipagem viral dos pacientes monoinfectados VHC e coinfectados..... | 56 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.4 Genotipagem dos genes <i>KIR</i> | 57 |
| 5.2.5 Tipagem do HLA de classe I: A, B e C | 61 |
| 5.2.6 Análise de prontuários | 62 |
| 5.2.7 Análise dos Dados | 62 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 6.1 Triagem das amostras: Confirmação da infecção pelo HIV-1 e/ou VHC | 64 |
| 6.2 Subtipagem e inferência do fenótipo do arco da alça V3 do HIV-1 | 67 |
| 6.3 Variáveis relacionadas a infecção ocasionada pelo HIV-1 | 71 |
| 6.4 Terapia antirretroviral (TARV) | 73 |
| 6.5 Variáveis relacionadas a infecção ocasionada pelo VHC | 75 |
| 6.6 Terapêutica anti-VHC | 77 |
| 6.7 Frequência dos genes <i>KIR</i> entre os grupos de mono infectados HIV-1, mono infectados VHC e co infectados HIV-1/VHC | 79 |
| 6.8 Análise da correlação dos polimorfismos (do hospedeiro) de genes <i>KIR</i> com a evolução da infecção pelo HIV-1 | 82 |
| 6.9 Análise da correlação dos polimorfismos (do hospedeiro) de genes <i>KIR</i> com variáveis relacionadas a evolução da infecção pelo VHC | 84 |
| 6.10 Frequência absoluta e relativa dos ligantes de <i>KIR</i> | 86 |
| 6.11 Frequência de <i>KIR</i> e seus ligantes | 87 |
| 6.12 Análise da correlação dos polimorfismos (do hospedeiro) de genes <i>KIR</i> associados a seus ligantes com variáveis relacionadas a infecção pelo HIV-1 e pelo VHC | 88 |
| 7 CONCLUSÃO | 89 |
| 8 REFERÊNCIAS | 91 |
| 9 ANEXOS | 107 |

1 INTRODUÇÃO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) constitui o agente etiológico de uma infecção que conduz ao comprometimento progressivo do sistema imune resultando em uma síndrome denominada aids (LEMP et al., 1990).

A vulnerabilidade humana a infecção pelo HIV não é uniforme, fatores virológicos e do hospedeiro são determinantes não só quanto ao risco da transmissão, mas também quanto à evolução natural da infecção (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Vários estudos vêm demonstrando a diversa variabilidade interindividual na resposta a infecção pelo HIV. Essa variabilidade se deve a progressão da doença, transmissão, susceptibilidade a infecção pelo vírus e fenótipos que variam de indivíduos assintomáticos com um melhor prognóstico a até indivíduos com alta viremia e progressão rápida, culminando em aids e morte (PETZL-ERLER, 1999).

Alterações fenotípicas virais relacionadas à terceira região variável da gp120 do HIV também afetam a progressão da infecção, sendo esta região viral essencial ao ciclo replicativo do vírus. A alça V3 da gp120 é constituída de aproximadamente 35 aminoácidos (CANN et al., 1992), com sequência CTRPNNNTRKSIH**GP**GRAFYTTGEIIGDIRQAHC (STANFIELD et al., 1999) nos vírus do subtipo B, mais frequente no Brasil (FOLEY; KORBER, 1995).

Estudos vêm demonstrando que algumas variantes B isoladas no Brasil apresentam uma modificação na sequência desta região, onde uma prolina é substituída por um triptofano gerando a sequência GWGR no arco da alça V3 (GALVÃO-CASTRO et al., 1996), designada B', também denominada por alguns autores como B-Br ou B'' (NAGANAWA et al., 1997) e, como é amplamente distribuída no Brasil, com proporção em torno de 40% entre os isolados de subtipo B, sugere-se que ela surgiu ou foi introduzida desde o início da epidemia (MORGADO et al., 1994).

Estudos conduzidos com isolados virais do Brasil vêm demonstrando que pacientes infectados com a variante B' do HIV, apresentam um maior tempo entre a

infecção e a progressão para aids, conduzindo então a um melhor prognóstico. Esse efeito protetor da variante B' parece também apresentar uma relação com o sexo feminino (SANTORO-LOPES et al., 2000; CASSEB et al., 2002; BRITO et al., 2006).

Algumas células infectadas pelo HIV são capazes de formar células gigantes multinucleadas, que podem produzir grandes quantidades de vírus, essa característica é denominada indução de sincício (WIGDAHL; GUYTON; SARIN, 1987) e também está relacionada à sequência de aminoácidos da região da alça V3. Assim, o HIV pode ser classificado, quanto a citopatogenicidade, em indutor de sincício (SI) e não indutor de sincício (NSI), sendo que, vírus NSI já foram relacionados a fase inicial da doença, assintomática e com melhor prognóstico (ROSS et al., 1992), enquanto que o fenótipo SI foi associado a um pior prognóstico e imunodepressão pronunciada, caracterizando progressão da infecção (JORDAN et al., 1991).

O HIV apresenta tropismo por células CD4+, podendo infectar células do sistema imune que expressam esse marcador de superfície, como linfócitos T, células dendríticas e macrófagos, que são fundamentais para o desenvolvimento da resposta imunológica celular (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O sistema imune inato é nossa primeira linha de defesa contra organismos invasores e entre os diferentes constituintes desta linha imunológica do organismo (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MALE et al., 2006) estão as células *natural killer* (NK), uma subpopulação de linfócitos, fundamentais na resposta contra infecções virais (COOPER et al., 2001; MIDDLETON et al., 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O controle da atividade das células NK é realizado pela presença de receptores de ativação e inibição, dentre estes, encontram-se um grupo de receptores denominados como *KIR* (*killer immunoglobulin-like receptors*) que contribuem para a regulação da função destas células pelo reconhecimento de ligantes ao HLA de classe I (Antígeno Leucocitário Humano) do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex-MHC*) nas células alvo (ABBAS; LICHTMAN, 2005; QI et al., 2006).

Estudos têm proposto uma associação de polimorfismos dos genes *KIR* com a progressão da infecção pelo HIV (QI et al., 2006; CARRINGTON; MARTIN; VAN BERGEN, 2008; TIEMESSEN et al., 2011; MARUTHAMUTHU et al., 2014).

Os genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1* apresentam-se como variantes alélicas no mesmo *locus*, sendo que ambos os grupos de alelos neste *locus* apresentaram envolvimento na patogênese do HIV (MARTIN et al., 2003).

O receptor ativatório *KIR3DS1* foi correlacionado a uma alta capacidade inibitória da replicação do HIV-1, com menor carga viral e lento declínio de células T CD4⁺ (MARTIN et al., 2002; QI et al., 2006; ALTER et al., 2007). Da mesma forma, várias combinações alélicas do receptor inibitório *KIR3DL1* ligante de HLA-Bw4, foi associada a uma menor carga viral do HIV-1 e progressão mais lenta para aids (MARTIN et al., 2007).

Relatos recentes têm também demonstrado que as células NK expressam genes *KIR* que podem estar associados a uma evolução da infecção viral pelo HIV (ALTER et al., 2011), como é o caso dos receptores *KIR2DS2* e *KIR2DL2* que já foram relacionados a um rápido declínio da taxa de células T CD4⁺ (GAUDIERI, 2005).

Atualmente muitos pacientes infectados com HIV apresentam também, infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC). Na população mundial, aproximadamente 40% das pessoas que são infectadas pelo HIV, são coinfetadas pelo VHC, devido à similaridade nas vias de transmissão (DIETERICH; PUROW; RAJAPAKSA, 1999). No Brasil a coinfeção HIV/VHC foi referida em 11,4% do total de casos confirmados entre os anos de 2007 e 2010 (BRASIL, 2011). Esta porcentagem pode variar dependendo dos diferentes grupos de risco, sendo elevada entre usuários de drogas injetáveis e hemofílicos (DODIG; TAVILL, 2001).

Estudos tem também demonstrado a relação de polimorfismo em genes *KIR* com a progressão da infecção pelo VHC (KNAPP et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2013; VIDAL-CASTINEIRA et al., 2014).

Quando ocorre a coinfeção por estes dois vírus, HIV e VHC há um pior prognóstico para ambas as infecções (MELLO; PIRES, 2004).

A presença do VHC associado ao HIV vem sendo relacionada a algumas alterações na progressão da infecção pelo HIV. Estudo anterior demonstrou, em caráter inédito, que o efeito “protetor” da variante B’ do HIV em coinfectados HIV/VHC é perdido (MASSOLINI, 2011).

Embora vários estudos já tenham relatado uma associação de alguns polimorfismos dos genes *KIR* com a progressão da infecção pelo HIV em monoinfectados, não há muitas informações sobre a influência desses polimorfismos genéticos na população coinfectada HIV/VHC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

2.1.1 Aspectos epidemiológicos

A aids foi descrita pela primeira vez no ano de 1981 nos Estados Unidos, quando o Centro de Controle e Prevenção de Doenças do governo americano (CDC) relatou que um grupo de pacientes jovens, homossexuais masculinos, exibiam uma série de sintomas, incluindo casos de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (carinii), sarcoma de Kaposi, perda de peso súbita, linfadenopatia e supressão geral da função imune (DREW et al., 1981).

Atualmente a infecção pelo HIV representa um dos maiores problemas de saúde pública mundial, afetando, segundo dados da UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV / AIDS) cerca de 35 milhões de indivíduos no mundo (UNAIDS, 2014), sendo que no Brasil é estimado que 734 mil pessoas estejam infectadas (BRASIL, 2014a).

2.1.2 Classificação genética, estrutura e ciclo de replicação

O HIV é classificado em dois tipos, o HIV-1 que estabelece uma epidemia global e o HIV-2 com maior prevalência no oeste da África (PANTALEO; GRAZIOSI; FAUCI, 1993). O HIV-1 é ainda subdividido em quatro grupos, M (*Major*), O (*Outlier*), N (*non-M, non-O*) e mais recentemente, P (PLANTIER et al., 2009). O grupo M ainda se subdivide em subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) o que evidencia a grande diversidade genética viral (SIMON et al., 1998), a qual se eleva ainda mais pela presença das formas recombinantes circulatórias (CRFs) (TAVEIRA, 2002).

Entre os subtipos do HIV-1, o subtipo B é encontrado na Europa e nas Américas, mas apresenta uma frequência menor na África e na Ásia, onde os subtipos A, C, D e E são predominantes (REQUEJO, 2006). No Brasil, estudos indicam que aproximadamente 80% das infecções pelo HIV-1 são ocasionadas pelo subtipo B, sendo este subtipo prevalente na maioria das regiões geográficas, seguido

pelos subtipos F, recombinantes B/F e subtipo C (QUEIROZ et al., 2007; GALVÃO-CASTRO et al., 1996). Entretanto a região Sul do País tem se caracterizado pela maior frequência do subtipo C (SANTOS et al., 2007).

Com 100 nm de diâmetro, o HIV é um retrovírus do gênero *Lentivirus* (GALLO et al., 1984; ABBAS; LICHTMAN, 2005), cuja estrutura é constituída por um core proteico envolvendo duas moléculas de RNA idênticas de, aproximadamente, 9,2 kb, que constituem seu genoma e enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease), circundados por um envelope lipoproteico, no qual se inserem as glicoproteínas de membrana gp120 e gp 41 (Figura 1) (CONNOR; HO, 1992; FREED; MARTIN, 2001).

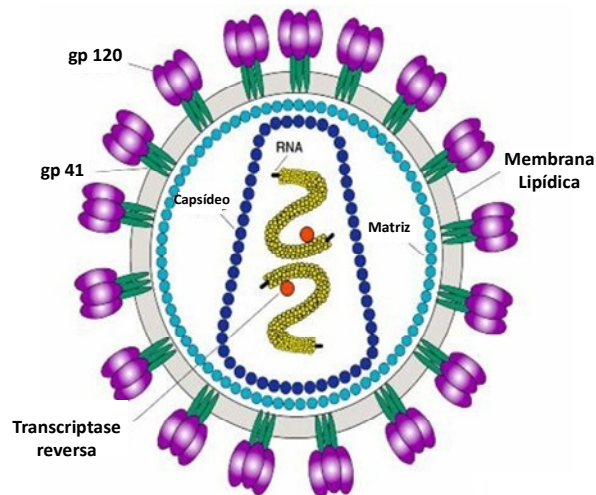


Figura 1: Esquema representativo da estrutura do HIV, evidenciando RNA viral, glicoproteínas do envelope gp41 e gp120, proteína da matriz (p17), proteínas do capsídeo (p24) e a enzima transcriptase reversa (Adaptado de NIAID, 2004).

O genoma do HIV codifica genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*), acessórios (*nef*, *vpu*, *vif* e *vpr*) e regulatórios (*tat* e *rev*) (BARRÉ-SINOUSSE, 1996). Entre os genes estruturais, *gag* codifica uma poliproteína a qual após clivagem origina as proteínas da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo virais, *env* codifica as glicoproteínas do envelope gp120 e gp41 e *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase, essenciais ao ciclo replicativo viral (CONNOR; HO, 1992). O RNA viral é ainda flanqueado por sequências não traduzidas, as *Long Terminal Repeats* (LTRs), importantes na replicação viral (Figura 2) (VARMUS; BROWN, 1989).

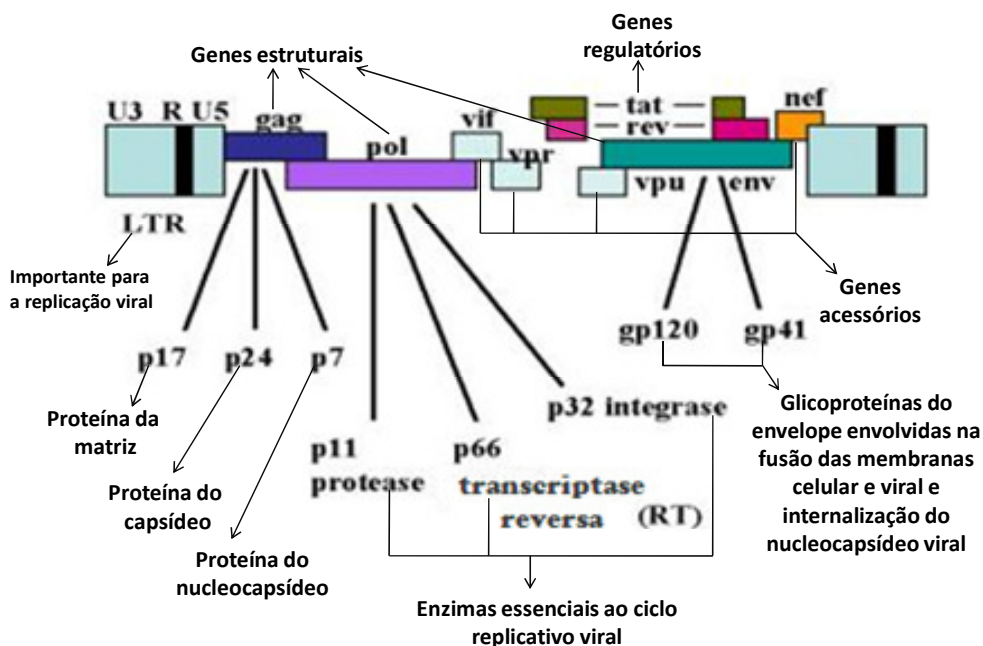


Figura 2: Representação esquemática do Genoma do HIV, evidenciando os genes estruturais (*gag*, *pol*, *env*), acessórios (*nef*, *vpu*, *vif* e *vpr*), regulatórios (*tat* e *rev*) e as LTRs (Adaptado de RUBBERT; BEHRENS; OSTROWSKI, 2006).

Dos três genes estruturais o gene *env* é o que possui maior variabilidade genética e essa característica favorece o escape ao sistema imune do hospedeiro (FREED; MARTIN, 2001). As duas glicoproteínas codificadas por este gene (*gp120* e *gp41*) estão envolvidas na fusão e entrada do vírus na célula hospedeira (CONNOR; HO, 1992).

A *gp41* é uma proteína transmembrana com o domínio N-terminal externo e o domínio C-terminal interno à partícula viral, envolvida na fusão do envelope viral e membrana da célula hospedeira (CHAN et al., 1997).

A *gp120* é uma proteína que apresenta cinco regiões constantes (C1 a C5) e cinco regiões variáveis (V1 a V5) (STARCICH et al., 1986; KOHLSTAEDT et al., 1992), sendo responsável pela ligação com o receptor viral na superfície da célula hospedeira (Figura 3) (TAVEIRA, 2002).

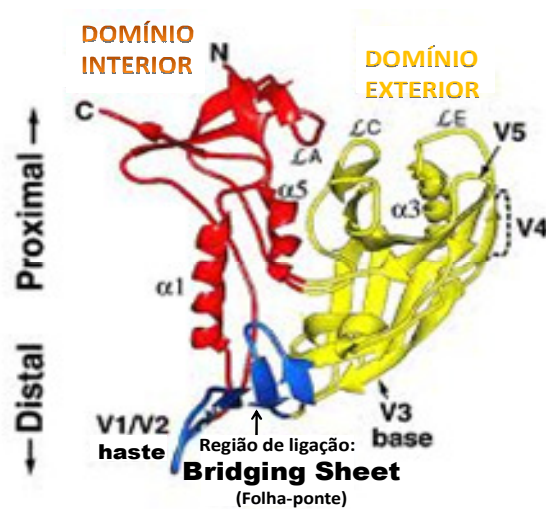


Figura 3: Representação da estrutura da gp120, evidenciando seus domínios interno e externo, além de uma região de ligação em forma de “ β -sheet” (folha-beta), que é denominada *Bridging Sheet*. (Adaptado de WYATT et al., 1998). A molécula de CD4 se liga a uma cavidade da gp120 formada na junção entre os domínios interno, externo e a *Bridging Sheet*, enquanto que o correceptor liga-se provavelmente a uma região na base da proteína, entre a terceira região variável (alça V3) e a *Bridging Sheet* (WYATT; SODROSKI, 1998).

A primeira etapa para o ciclo replicativo viral envolve a interação da gp120 do envelope viral com o marcador de superfície celular CD4 na célula-alvo. Após a interação inicial, a terceira região variável da gp120 (V3) torna-se exposta e apta à ligação com correceptores (CCR5 e/ou CXCR4) (CLAPHAM; WEISS, 1997). As interações com os correceptores conduzem a condições necessárias para a fusão das membranas celular e viral, processo mediado pela gp41 (CAFFREY et al., 1998), ocorrendo internalização do nucleocapsídeo do vírus (Figura 4) (KATZ; SKALKA, 1994).

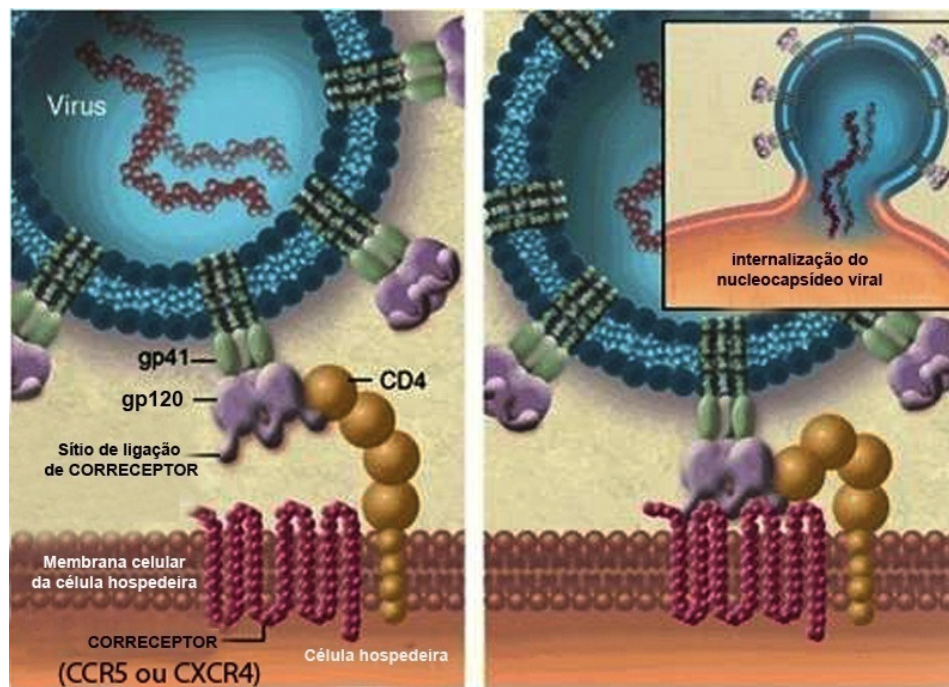


Figura 4: Representação esquemática da interação da gp 120 da membrana viral com o marcador de superfície celular CD4 na célula-alvo, expondo a terceira região variável da gp120 (V3) a qual se torna apta a ligação com os correceptores CCR5 e/ou CXCR4, conduzindo à condições necessárias para a fusão das membranas celular e viral, processo que é mediado pela gp41, ocorrendo internalização do nucleocapsídeo viral e continuidade do ciclo replicativo do HIV (Adaptado de LITWAK, 2009).

Após liberação do genoma viral no citoplasma da célula, a enzima transcriptase reversa converte o RNA em DNA, o qual é integrado ao genoma celular pela ação da enzima integrase, formando um provírus. Para que ocorra a transcrição dos genes do provírus integrado é necessário à ativação da célula T por antígenos ou citocinas. Após essa ativação, ocorre a transcrição do DNA, produzindo então o RNA mensageiro, o qual é transportado do núcleo para o citoplasma, onde é traduzido e assim as proteínas do HIV são sintetizadas. A protease viral cliva as proteínas recém formadas em fragmentos menores, e em seguida ocorre montagem das partículas virais. Após essa montagem, os vírions são liberados da célula por um processo de brotamento da membrana plasmática, ficando livres para infectar outras células e reiniciar o ciclo de replicação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; KLIMAS et al., 2008).

Assim, pode-se notar que a terceira região variável da gp120 é essencial ao

ciclo replicativo viral. Esta região é constituída de aproximadamente 35 aminoácidos (DALGLEISH et al., 1984; CANN et al., 1992), com sequência CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYYTTGEIIGDIRQAHC (STANFIELD et al., 1999). A formação de ponte dissulfeto entre os dois resíduos de cisteína das posições 296 e 331 da gp120 conferem a esta região uma conformação em alça. No topo da alça encontra-se uma região conservada, a sequência Glicina-Prolina-Glicina-Arginina (GPGR) (Figura 5) (FOLEY; KORBER, 1995).

Estudos vêm demonstrando que algumas variantes B isoladas no Brasil apresentam uma modificação na sequência desta região, onde uma prolina é substituída por um triptofano gerando a sequência GWGR no arco da alça V3 (GALVÃO-CASTRO et al., 1996), designada B', também denominada por alguns autores como B-Br ou B" (NAGANAWA et al., 1997) e, como é amplamente distribuída no Brasil, sugere-se que ela surgiu ou foi introduzida desde o início da epidemia (MORGADO et al., 1994).

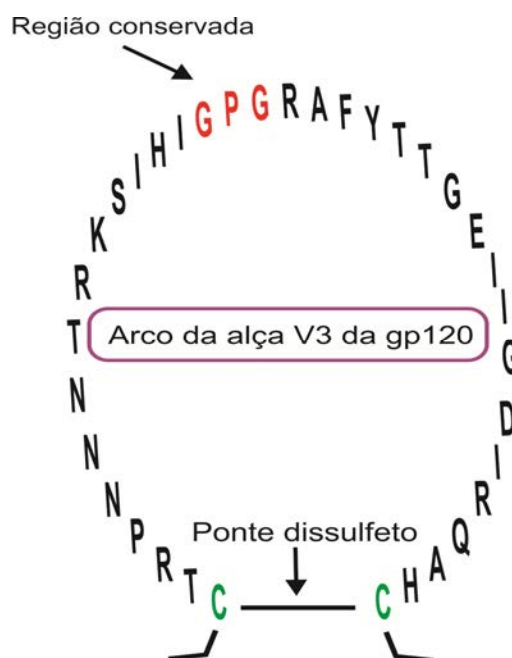


Figura 5: Representação esquemática da terceira região variável da gp120 do HIV-1 (alça V3), evidenciando a região conservada GPG no subtipo B e os dois resíduos de cisteína que se ligam por ponte dissulfeto dando, então, a essa região uma conformação em alça (Adaptado de WILLIAM, 2008).

Sendo a alça V3 a principal região imunodominante do HIV, induzindo a formação de anticorpos neutralizantes e funcionando como alvo da resposta celular citotóxica (GOUDSMIT et al., 1988; KENEALY et al., 1989), modificações na estrutura secundária da proteína como a presença do GWG no lugar do GPG na região do arco da alça V3 podem alterar a antigenicidade e, conseqüentemente a resposta imunológica ao HIV (GALVÃO-CASTRO et al., 1996).

2.1.3 Transmissão

As principais vias de transmissão do HIV são a sexual, a vertical de mãe para filho, através de sangue ou secreções contaminados, através do compartilhamento de agulhas contaminadas e por acidentes ocupacionais (MANAVI, 2006; LEVY, 2009).

2.1.4 Curso Clínico da Infecção pelo HIV

Após a infecção inicial é observado um período de incubação que pode variar de 3 a 6 semanas, durante essa fase ocorre um rápido aumento da replicação viral e queda inicial da contagem de linfócitos T CD4+. Neste período, o vírus inicia sua disseminação pelo organismo principalmente através dos tecidos linfáticos, podendo o indivíduo infectado apresentar-se assintomático ou com sintomas inespecíficos (BRASIL, 2011a).

A infecção pelo HIV até o desenvolvimento de aids apresenta um curso clínico clássico, o qual pode didaticamente ser dividido em três etapas distintas: fase aguda, fase de latência clínica e aids (Figura 6) .

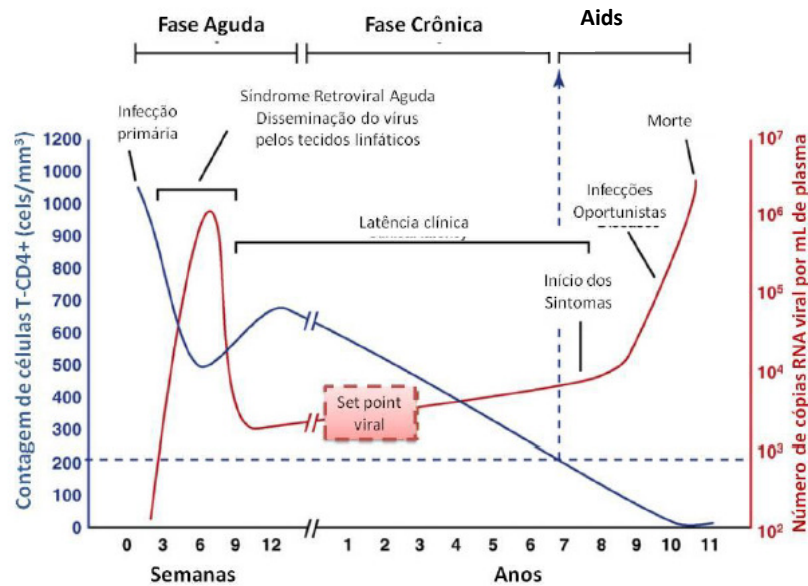


Figura 6: Curso Clínico da Infecção pelo HIV. A fase aguda é caracterizada pelo rápido aumento da replicação viral e queda inicial da contagem de linfócitos T CD4+, essa fase pode apresentar-se assintomática ou com sintomas inespecíficos, sendo denominada como Síndrome Retroviral Aguda, com uma duração em torno de 1 a 4 semanas, o que pode dificultar o diagnóstico precoce da infecção. Esta fase é parcialmente controlada por uma rápida resposta do sistema imune que permite, em parte, a estabilização da replicação viral (*set point* viral) e a restauração parcial dos níveis de linfócitos T CD4+, dando início à fase crônica da infecção (FAUCI et al., 1996). A fase crônica se caracteriza por um longo período assintomático onde a replicação viral se mantém estabilizada, enquanto os níveis de T CD4+ diminuem lentamente. Esta fase pode ter uma duração em média de 4 a 10 anos (BACCHETTI; MOS, 1989). Quando os níveis de linfócitos T CD4+ diminuem drasticamente (geralmente com contagem abaixo de 200 células/mm³) e o sistema imune se torna ineficaz no combate a agentes externos, permanecendo o hospedeiro vulnerável ao aparecimento de infecções oportunistas, identifica-se a fase de aids (PEDERSEN et al., 1989), na qual se o paciente não for tratado pode ir a óbito (Adaptado de AN; WINKLER, 2010).

2.1.5 Terapia antirretroviral (TARV)

Os antirretrovirais surgiram na década de 1980 e apresentam como objetivo reduzir a replicação do vírus no organismo, diminuindo a morbidade e mortalidade

melhorando a qualidade e expectativa de vida das pessoas, contudo, não erradicam a infecção pelo HIV (BRASIL, 2013).

Foi observado, que após manter a carga viral indetectável, as pessoas com reconstituição imune em uso da terapia antirretroviral conseguem obter contagem de linfócitos T CD4+ acima de 500 células/mm³, o que é esperado, atingindo expectativa de vida muito próxima a da população geral (BRASIL, 2013).

Atualmente o Ministério da Saúde, disponibiliza vários medicamentos para compor a terapia antirretroviral, sendo que já entraram no mercado 22 drogas, as quais são divididas em seis classes, Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ITRNt) que apresentam a capacidade de se incorporar a cadeia de DNA viral, atuando por interação específica à enzima transcriptase reversa (HALLAL et al, 2010); Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (ITRNN), os quais bloqueiam a ação da enzima transcriptase reversa e a multiplicação do vírus diretamente, sem utilizar nucleosídeos (RANG et al, 2012); Inibidores de Protease (IP) que impedem a produção de novas cópias do HIV, atuando na enzima protease do vírus (RANG et al, 2012); Inibidores de fusão, agem bloqueando a entrada do vírus na célula e, conseqüentemente, sua reprodução por se ligarem especificamente à uma proteína do HIV (BRITO, 2011); Inibidores da Integrase, os quais inibem a replicação viral por bloquear a atividade desta enzima (POMMIER, 2005) e os Antagonistas de correceptores CCR5 , que previnem a interação da glicoproteína viral gp120 com o receptor celular CCR5, necessário para a entrada do vírus nas células do hospedeiro (BRITO, 2011; MIRANDA, 2010).

2.2 VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

2.2.1 Aspectos epidemiológicos

O VHC foi descrito pela primeira vez em 1989 como sendo o agente etiológico associado a hepatites não-A e não-B por Choo e colaboradores (CHOO et al., 1989). Atualmente, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que

aproximadamente 180 milhões de indivíduos estejam infectados no mundo e, que no Brasil exista cerca de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas, sendo que, a maioria desconhece esse diagnóstico (BRASIL, 2014b).

2.2.2 Classificação, estrutura e ciclo de replicação

O VHC é do gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae* (ROMANOS; SANTOS; WIGG, 2002; SIMMONDS et al., 2005), sua classificação é baseada na topologia de árvores obtidas através de análises filogenéticas entre diferentes variante virais, sendo classificado em seis genótipos principais denominados de 1 a 6 e vários subtipos (a, b, c, etc), sendo que um novo genótipo, designado genótipo 7 foi recentemente descrito (MURPHY et al., 2007).

Além dos genótipos e subtipos, múltiplos variantes virais podem estar presentes em um mesmo indivíduo infectado, originando as *quasispecies* (ROSEN; GRETCH, 1999; LAUER; WALKER, 2001; SIMMONDS et al., 2005).

A distribuição dos genótipos do VHC é distinta nas diferentes regiões geográficas (ALVARIZ, 2004), sendo os genótipos 1, 2 e 3 os mais frequentes no Japão, Europa e nas Américas do Norte e do Sul; os genótipos 4 e 5 na África e no Oriente Médio e o genótipo 6 no Sudeste da Ásia (NAINAN et al., 2006; GOTTWEIN; BUKH, 2008). No Brasil, o genótipo 1 é o mais prevalente, seguido pelo 3 e 2 (CAMPIOTTO et al., 2005; CORVINO et al., 2006).

O VHC possui genoma de RNA fita simples de aproximadamente 9,7 kb, flanqueado por duas regiões não traduzidas 5' e 3' UTR (*untranslated regions*) (Figura 7). O RNA viral possui apenas uma região aberta de leitura (*Open reading frame*), a qual codifica uma poliproteína precursora que é clivada por proteases celulares e virais dando origem às proteínas estruturais, como a proteína C (core) e glicoproteínas de membrana E1 e E2/NS1 e às proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) que estão envolvidas na replicação viral (Figura 8) (ROSEN; GRETCH, 1999; SIMMONDS et al., 2005).

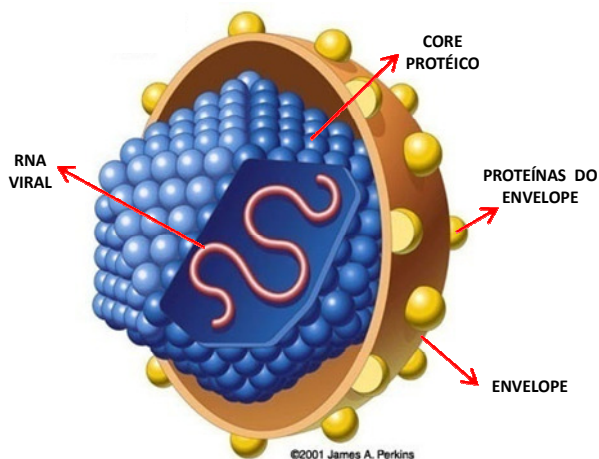


Figura 7: Esquema representativo da estrutura do VHC, evidenciando RNA viral, core protéico, proteínas do envelope e envelope viral (Adaptado de PERKINS, 2001).

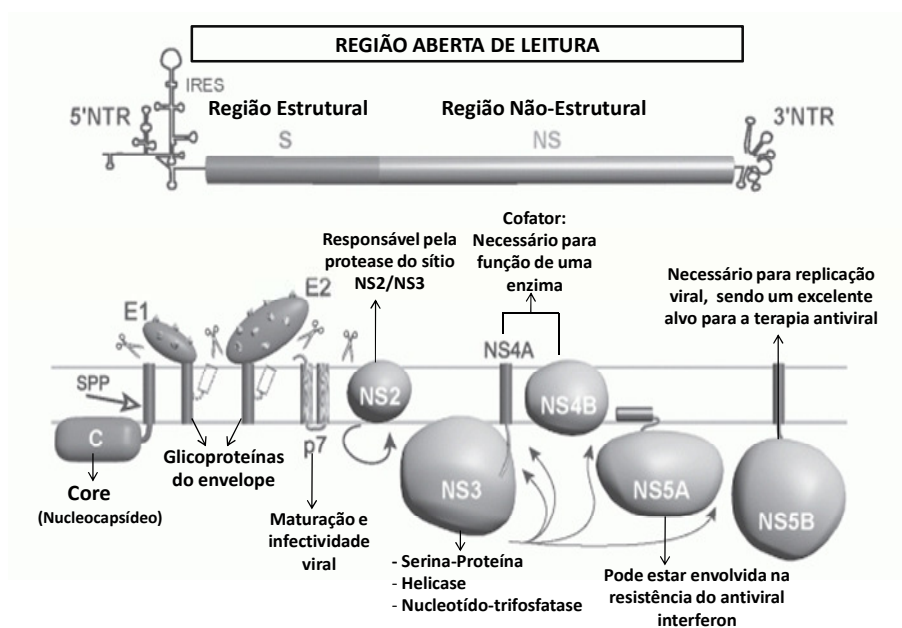


Figura 8: Representação esquemática da organização do RNA genômico do VHC, evidenciando as regiões 5'UTR que contêm IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) e a 3'UTR que flanqueiam a ORF (*Open Reading Frame*), cuja poliproteína correspondente é clivada em proteínas estruturais e não estruturais, onde estão representados seus produtos proteicos e suas respectivas funções (Adaptado de PENIN et al., 2004).

O ciclo replicativo tem início quando partículas virais circulantes associadas a lipoproteínas de alta e baixa densidade se ligam através destas nas superfícies das células do hospedeiro e tem a entrada na célula mediada por receptores/ co-

receptores de superfície celular, como receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R), Scavenger Receptor Classe B tipo I (SR-BI), a tetraspanina Diferenciação celular 81 (CD81), claudinas (CLDN) e ocludinas (OCLN) (TANG; GRISE, 2009). As partículas virais são reconhecidas pelos receptores celulares por intermédio das proteínas do envelope E1 e E2. Após a etapa de reconhecimento ocorre a entrada na célula através de endocitose mediada por receptor (BARTENCHSCHLAGER; LOHMAN; PENIN, 2013).

Posteriormente, o endossoma formado sofre acidificação, o que induz a fusão das glicoproteínas da membrana fazendo com que ocorra a liberação do genoma viral no citosol da célula hospedeira (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Com a liberação do material genético, o IRES promove o início da tradução da poliproteína que segue com a produção das proteínas virais. Para a montagem da nova partícula viral as proteínas estruturais associam-se (core) ou integram-se (E1, E2 e p7) com a membrana do retículo endoplasmático (RE) e formam oligômeros funcionais. As proteínas não estruturais formam a maquinaria de replicação viral e para isso se associam do lado citoplasmático da membrana do RE onde interagem entre si e com as proteínas da célula hospedeira. Essa maquinaria usa seu próprio genoma como molde para transcrição de fita complementar negativa de RNA. A fita negativa serve como uma molécula replicativa intermediária na síntese de uma nova molécula de RNA de polaridade positiva que pode ser usada para tradução, replicação ou então ser empacotada para constituir novos vírus (DE FRANCESCO et al., 2003).

2.2.3 Transmissão

A transmissão ocorre através do contato com sangue contaminado por transfusão de sangue, compartilhamento de material para uso de drogas (seringas, agulhas, entre outros), higiene pessoal (lâminas de barbear e depilar, por exemplo), ou para confecção de tatuagens. Pode ocorrer de mãe para filho durante a gravidez, ou por relação sexual, no entanto essas duas vias são bem mais raras, desta maneira a hepatite C não é considerada uma doença sexualmente transmissível clássica (BRASIL, 2014b).

2.2.4 Curso Clínico da Infecção pelo VHC

A hepatite C crônica é geralmente assintomática durante a maior parte da evolução e uma das complicações tardias da infecção é a fibrose hepática, que quando progressiva pode alterar a função hepática e o fluxo sanguíneo local (ROCKEY; FRIEDMAN, 2006). Embora aproximadamente 70-80% dos indivíduos portadores de VHC evoluam para a forma crônica da doença com progressão da fibrose hepática, aproximadamente 20% dos infectados erradicam o vírus em semanas ou meses depois da infecção (HALLIDAY; KLENERMAN; BARNES, 2011) caracterizando o denominado clareamento viral espontâneo. O clareamento viral é definido como a não detecção do RNA viral no plasma ou soro do paciente com sorologia anti-VHC reagente em pacientes que não realizaram tratamento específico (ALTER, 1997; BRASIL, 2011b).

A cirrose hepática ocorre em aproximadamente 20% dos casos que evoluem para a forma crônica da doença, geralmente após 15 a 20 anos de infecção e o hepatocarcinoma é detectado em 1 a 3% dos casos de cirrose ao ano. No entanto, a evolução para cronicidade está na dependência de fatores virais, como carga viral e genótipo do VHC e fatores do hospedeiro como sexo, idade, uso de álcool ou coinfeção com outros vírus (STRAUSS, 2001).

2.2.5 Tratamento Hepatite C

Os medicamentos utilizados no tratamento da Hepatite C crônica incluem alfainterferona alfa 2b, alfapeginterferona alfa 2a e alfa 2b, ribavirina, alfaepoetina, filgrastima, telaprevir e boceprevir (BRASIL, 2011b).

Para analisar a eficiência do tratamento é realizado o monitoramento da resposta virológica, sendo que, para isso é realizado exame quantitativo para detecção do RNA do VHC. Os critérios para avaliação do tratamento definem que para obtenção de uma resposta virológica sustentada (RVS) é necessário que o RNA do VHC esteja indetectável na 24ª semana de seguimento, após o término do tratamento (BRASIL, 2011b).

2.3 COINFECÇÃO DO HIV COM O VHC

A debilitação imunológica causada pelo HIV acaba conduzindo a evolução da infecção pelo VHC e ao rápido curso natural da infecção, reduzindo aproximadamente de 30 para 7 anos o comprometimento hepático com aparecimento de cirrose e carcinoma hepatocelular, que constituem importante causa de morte em pacientes infectados com HIV (MELLO; PIRES, 2004). O VHC, do mesmo modo, parece acelerar a progressão da infecção pelo HIV para aids e morte, dificultando a reconstituição do sistema imune e aumentando o risco de hepatotoxicidade (POCKROS, 2003).

Desta maneira, a coinfeção HIV/VHC ocasiona um pior prognóstico para ambas as infecções (MELLO; PIRES, 2004).

2.4 CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)

As células NK apresentam-se como grandes linfócitos com numerosos grânulos citoplasmáticos distintos dos linfócitos T e B e são derivadas de precursores da medula óssea com capacidade de realizar sua função de morte sem a necessidade de expansão clonal e diferenciação. Constituem cerca de 5 a 15% das células mononucleares do sangue e baço e são raras em outros órgãos linfóides (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Apresentam função crucial na resposta imune inata, especialmente contra infecções virais e células tumorais, devido a sua capacidade de lise celular sem sensibilização prévia e, pela produção de citocinas e quimiocinas que mediam a resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As células NK usam receptores codificados pelo DNA em sua configuração germinativa para diferenciar células infectadas por patógenos de células saudáveis. Esses receptores detectam a variabilidade de expressão das moléculas de HLA (ausência ou diminuição) na superfície celular, contribuindo para a regulação da

atividade das NK, sendo esse mecanismo conhecido como teoria do *missing self* (reconhecimento do próprio) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Um dos grupos de receptores que contribuem para a regulação da função das células NK através do reconhecimento de ligantes ao HLA de classe I nas células-alvo são os receptores *KIR* (receptores semelhantes às imunoglobulinas das células NK, do inglês *killer immunoglobulin-like receptors*) (ABBAS; LICHTMAN, 2005; QI et al., 2006).

2.5 RECEPTORES *KIR*

Os receptores *KIR* pertencem à superfamília das imunoglobulinas e são constituídos por uma porção extracelular, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática (KIKUCHI-MAKI et al., 2003). Os genes que codificam esses receptores estão inseridos em uma região conhecida como *LCR* (*leucocyte receptor complex*), localizada no cromossomo 19p13.4 (MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002), que é altamente polimórfica em humanos e, seu extensivo polimorfismo vem sendo associado a história natural da infecção pelo HIV (UHRBERG et al., 1997 ; QI et al., 2006).

A nomenclatura dos genes *KIR* é definida pelo subcomitê *The Human Genome Organization* (HUGO) e o *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) e, é baseada na estrutura das moléculas que eles codificam (CARRINGTON; NORMAN, 2003).

Na nomenclatura, posteriormente a expressão *KIR*, o primeiro dígito refere-se ao número de domínios extracelulares na molécula, seguido pela letra D que denota “domínio.” As moléculas podem ter dois ou três domínios, sendo, portanto, 2D ou 3D, respectivamente (Figura 9) (VILCHES; PARHAM, 2002; PISEGNA et al., 2004).

As caudas citoplasmáticas podem ser longas ou curtas, sendo designadas pela letra “L” (do inglês *long*), quando longas, pela letra “S” (do inglês *short*), quando curtas ou ainda pela letra “P”, se forem pseudogenes. O dígito final indica o número do gene

que codifica a proteína com essa estrutura. Desta forma, *KIR3DL1* e *KIR3DL2* codificam receptores contendo três domínios extracelulares e cauda citoplasmática longa (VILCHES; PARHAM, 2002).

Nos casos em que dois ou mais genes codificam estruturas moleculares e sequências semelhantes, eles deverão ser designados pelo mesmo número, seguido de uma letra final, por exemplo, *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B* (GOMEZ-LOZANO et al., 2002).

As porções transmembrana e citoplasmáticas das moléculas estão ligadas à atividade funcional dos receptores *KIR*, sendo que os de cauda longa são inibitórios por possuírem um ou dois epítomos denominados ITIM (motivo de inibição a base de tirosina do imunorreceptor do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) que liberam sinais inibitórios e ativam a proteína tirosina fosfatase (PTP) que suprime a atividade da proteína tirosina cinase (PTK) bloqueando as vias de sinalização dos receptores de ativação, suprimindo a atividade das células NK, tendo ausência de morte celular, já os de cauda curta não apresentam ITIM, porém possuem um aminoácido no domínio transmembrana que permite associação com a molécula DAP-12 que libera sinais ativatórios por meio de ITAM (motivo de ativação à base de tirosina do imunorreceptor do inglês *immunoreceptor tyrosinebased activating motifs*) (Figura 10) ativando a proteína tirosina cinase (PTK) desencadeando a destruição da célula alvo (VILCHES; PARHAM, 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O *KIR2DL4* é uma exceção, pois tem uma estrutura única com a combinação de um ITIM na cauda citoplasmática e um aminoácido no domínio transmembrana. Estudos recentes indicam que *KIR2DL4* se associa à proteína acessória Fc ϵ RI- γ que envia sinais estimulatórios à célula via ITAM, similarmente à DAP-12 (KIKUCHI-MAKI et al., 2005).

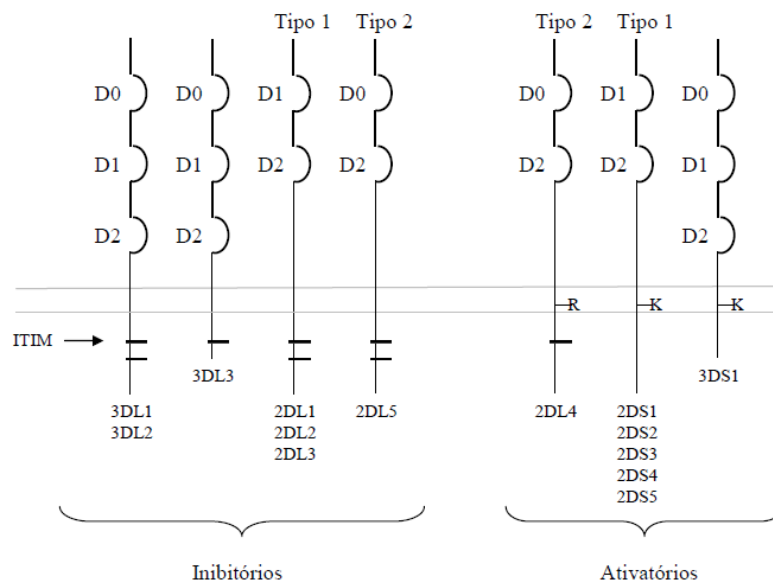


Figura 9: Organização molecular e nomenclatura dos genes *KIR* (Adaptado de MARAGON et al., 2008). Os genes *KIR* apresentam três tipos de domínios: D0, D1 e D2. Os receptores *KIR* com três domínios têm configuração D0-D1-D2, já as moléculas com dois domínios podem ter configuração D1-D2, chamadas de tipo 1 ou D0-D2, conhecidas como tipo 2 (PISEGNA et al., 2004).

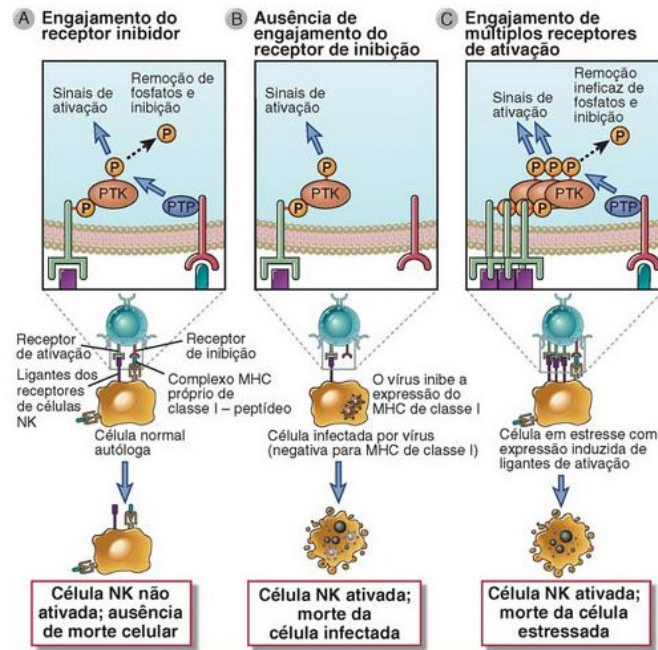


Figura 10: Receptores de ativação e inibição das células NK e suas respectivas funções. A) Receptores de ativação das células NK reconhecem seus ligantes nas células-alvo levando a ativação da proteína tirosina cinase (PTK), sendo que durante o reconhecimento de células normais, ou seja, com expressão normal de moléculas do HLA de classe I, ocorre a supressão da atividade da PTK pela ligação dos receptores de inibição ocorrendo a ativação da proteína tirosina fosfatase (PTP). B) Durante uma infecção viral ou outro tipo de estresse ocorre a inibição da expressão de MHC de classe I pelas células, situação que também pode induzir a expressão de outros ligantes de ativação, onde é desencadeada a resposta das células NK, como morte das células-alvo e secreção de citocinas, pois o receptor de inibição não é engajado e o de ativação age sem oposições. C) Células com estresse devido a transformação neoplásica ou devido a infecções podem super expressar ligantes ativadores, o que induz a uma maior fosforilação da tirosina do que os receptores de inibição podem impedir, ocasionando a morte da célula estressada (Adaptado de ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Em torno de 14 genes *KIR* e mais de 100 sequências desses genes foram relatadas, sendo classificadas em dois haplótipos gerais conhecidos como A e B (Figura 11), que estão distribuídos com semelhança em caucasóides das populações brasileira, inglesa e argentina (CONTRERAS et al., 2007). Em estudo realizado com 116 indivíduos caucasóides brasileiros doadores voluntários de medula óssea, foi encontrada uma proporção de 51 e 49% de haplótipos A e B, respectivamente (JOBIM; JOBIM, 2008).

No haplótipo A estão presentes os genes *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*,

KIR2DS4, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*, contendo apenas um gene ativador, o *KIR2DS4*, totalizando sete genes (MAXWEL et al., 2002). Já o haplótipo B apresenta inúmeras combinações de genes ativadores *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* e *KIR2DS4* e os genes inibidores *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* (CARRINGTON; NORMAN, 2003).

Todos os haplótipos *KIR* apresentam os genes *KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR3DP1* e *KIR2DL4*, os quais são denominados “genes de moldura” do haplótipo (do inglês, frameworks) (TROWSDALE et al., 2001).

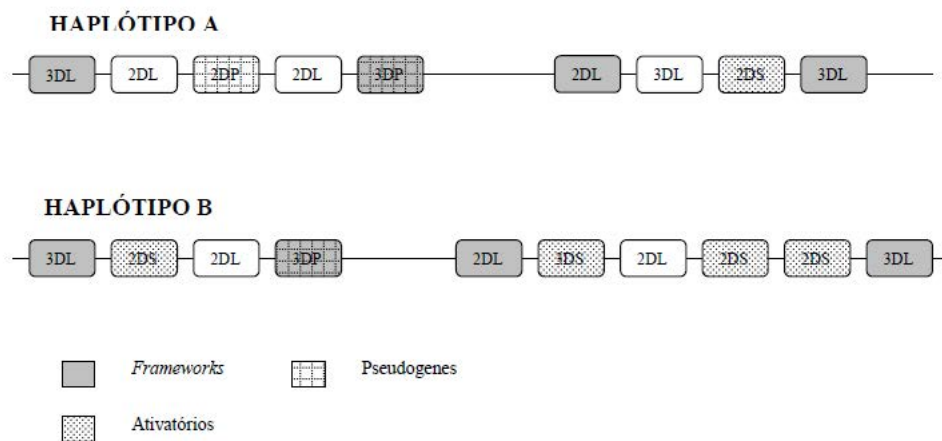


Figura 11: Sequência dos genes *KIR* nos haplótipos A e B (Adaptado de MARAGON et al., 2008).

2.6 LIGANTES DE *KIR*

O complexo HLA se localiza no cromossomo 6p21.3, uma região altamente polimórfica do genoma humano diferindo entre indivíduos e grupos populacionais, esse complexo é dividido em três regiões distintas onde estão presentes os genes do HLA responsáveis por codificar as proteínas de classe I, II ou III (FLORES-VILLANUEVA et al., 2003).

Dentre os diversos genes do sistema HLA estudados até o momento, as moléculas de HLA de classe I clássicas (A, B e C) são os principais ligantes de *KIR* e também as que apresentam maior relação com a evolução da infecção pelo HIV-1 segundo a literatura (KAUER; MEHRA, 2009; LICHTERFELD et al., 2006).

O maior repertório de ligantes *KIR* são de alelos que derivam do HLA-C, que se divide em dois grupos (C1 e C2) devido ao aminoácido presente na posição 80 da molécula. O grupo C1 inclui os alelos HLA-C*01, C*03, C*07 e C*08 que são ligantes de *KIR2DL2* e *KIR2DL3* e o grupo C2 inclui os alelos HLA-C*02, C*04, C*05 e C*06 que são ligantes de *KIR2DL1* e *KIR2DS1*. O *KIR2DS4* interage com HLA-C1, C2 e A11. O HLA-B do grupo Bw4, que inclui HLA-B*08, B*13, B*27, B*44, B*51, B*52, B*53, B*57 e B*58 é ligante de *KIR3DL1* e o HLA-A dos grupos HLA-A3 e HLA-A11 interagem com *KIR3DL2*. O *KIR2DL4* se liga ao HLA-G, uma molécula de HLA de classe I não clássica, com pouco polimorfismo (Tabela 1). Ligantes para *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DL5*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* e *KIR3DL3* permanecem indefinidos (MOESTA et al., 2010).

Tabela 1: Epítomos dos Antígenos Leucocitários Humanos que são reconhecido pelos receptores semelhantes às imunoglobulinas das células NK .

| KIR | HLA class I ligand | | | | | | |
|--------|--------------------|-----|-----|----|----|---|---------|
| | A3 | A11 | Bw4 | C1 | C2 | G | unknown |
| 3DL1 | | | ■ | | | | |
| 3DS1 | | | | | | | ■ |
| 3DL2 | ■ | ■ | | | | | |
| 3DL3 | | | | | | | ■ |
| 2DL1 | | | | | ■ | | |
| 2DL2/3 | | | | ■ | ■ | | |
| 2DS1 | | | | | ■ | | |
| 2DS2 | | | | | | | ■ |
| 2DS3 | | | | | ■ | | |
| 2DS4 | | ■ | | ■ | ■ | | |
| 2DS5 | | | | | | | ■ |
| 2DL4 | | | | | | ■ | |
| 2DL5 | | | | | | | ■ |

(Adaptado de PARHAM et al., 2012).

Estudos têm proposto uma associação de polimorfismos dos genes *KIR* e de seus ligantes em alelos do HLA classe I com a progressão da infecção pelo HIV (CARRINGTON; MARTIN; VAN BERGEN, 2008; QI et al., 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Polimorfismos em genes *KIR* vêm sendo associados com a progressão da infecção pelo HIV (QI et al., 2006; CARRINGTON; MARTIN; VAN BERGEN, 2008). Estudos demonstraram a associação de alguns destes genes a uma baixa carga viral, lento declínio de células T CD4+, proteção contra infecções oportunistas e a uma progressão mais lenta para aids, da mesma maneira como alguns polimorfismos de *KIR* foram associados a uma alta carga viral, rápido declínio de células T CD4+ e progressão rápida para aids (MARTIN et al., 2002; GAUDIERI, 2005; QI et al., 2006; MARTIN et al., 2007).

Até o momento, a maioria dos estudos que relataram associação de alguns polimorfismos dos genes *KIR* com a progressão da infecção pelo HIV, foram realizados apenas em indivíduos monoinfectados pelo HIV, sendo que, não há muitas informações sobre a relação destes polimorfismos, com a evolução da infecção pelo HIV em coinfectados pelo VHC, o que torna evidente a importância de um estudo neste aspecto.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Analisar a evolução da infecção pelo HIV em pacientes coinfectados HIV/VHC, baseada em parâmetros clínicos, laboratoriais e virológicos, correlacionando polimorfismos (do hospedeiro) de genes *KIR*.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar os subtipos do HIV-1 e genótipos do VHC;
- Detectar os polimorfismos e verificar a frequência de distribuição dos genes *KIR* entre os grupos de monoinfectados HIV-1, monoinfectados VHC e coinfectados HIV-1/VHC;
- Correlacionar os polimorfismos de genes *KIR* nos grupos de monoinfectados HIV-1 e de coinfectados (HIV/VHC) com a evolução da infecção pelo HIV-1;
- Analisar a correlação dos polimorfismos (do hospedeiro) de genes *KIR* com variáveis relacionadas à infecção pelo VHC nos grupos de monoinfectados VHC e coinfectados HIV/VHC.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Casuística

Foram incluídas no presente estudo 251 amostras (amostras de conveniência) coletadas durante o período de junho de 2013 até junho de 2014, as quais foram agrupadas em 3 grupos distintos com base na subtipagem (HIV) e genotipagem (VHC) viral, que encontram-se organizados da seguinte maneira:

Grupo 1 (G1): 100 amostras de pacientes mono infectados pelo HIV-1 subtipo B, selecionados aleatoriamente, convidados a participar do estudo por ocasião de sua coleta de rotina para o exame de carga viral plasmática no SAEI/DAM – Serviço de Ambulatórios Especializados em Infectologia “Domingos Alves Meira” e de amostras coletadas por ocasião do projeto *Viral Genetic Diversity Network* (VGDN).

Grupo 2 (G2): 100 amostras de pacientes mono infectados pelo VHC, de genótipo 1, com infecção crônica e RNA detectável por técnicas de Biologia Molecular, provenientes do Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu- FMB-UNESP, convidados a participar do estudo por ocasião de sua coleta de rotina para o exame de PCR quantitativo para acompanhamento da doença.

Grupo 3 (G3): 51 amostras de pacientes co infectados HIV/VHC (Subtipo B do HIV-1 e genótipo 1 do VHC, com infecção crônica e RNA detectável por técnicas de Biologia Molecular), provenientes do SAEI/DAM – Serviço de Ambulatório Especializado em Infectologia Domingos Alves Meira e do Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu- FMB-UNESP, de indivíduos convidados a participar do estudo por ocasião de sua coleta de rotina para o exame de carga viral plasmática e/ou por ocasião de sua coleta de rotina para o exame de PCR quantitativo para acompanhamento da doença e também de amostras coletadas por ocasião do projeto *Viral Genetic Diversity Network* (VGDN).

Foram selecionadas 90 amostras, sendo 30 de cada Grupo (G1=30, G2=30 e G3=30), para tipagem do HLA de classe I (A, B e C) com o intuito de:

- Analisar a presença e a frequência de ligantes de *KIR* entre os indivíduos monoinfectados HIV-1, monoinfectados VHC e coinfectados HIV/VHC;
- Correlacionar a presença dos genes *KIR* em combinação a seus ligantes (HLA) com a evolução da infecção pelo HIV-1 e também a doença ocasionada pelo VHC nos Grupos: G1 e G3; e G2 e G3, respectivamente.

Foram critérios de inclusão para todos os grupos, indivíduos maiores de 18 anos e não aparentados, sendo que, foram incluídos apenas os pacientes que concordaram em participar do estudo, após o devido esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram excluídos do estudo gestantes, pacientes que apresentaram qualquer outra coinfeção (Hepatite B, Tuberculose, etc) ou doença hepática de outras etiologias.

O presente estudo foi encaminhado para análise e aprovação do Comitê de ética em Pesquisa, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e obteve parecer favorável (n°349.761/2013 em anexo 1).

5.2 Métodos

5.2.1 Processamento inicial das amostras

Foram coletados 5 mL de sangue total em tubo do tipo Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) contendo 1,5 mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de cada paciente incluído no estudo.

Após a separação da alíquota de sangue total, que foi utilizada para extração de DNA genômico, a amostra foi centrifugada a 1312xg, por 15 minutos para separação do plasma que foi utilizado para extração do RNA viral.

5.2.2 Subtipagem viral dos pacientes monoinfectados HIV-1 e coinfectados HIV/VHC

A quantificação do número de cópias de RNA viral do HIV-1 por mL de plasma, exame conhecido como quantificação da carga viral, foi realizada utilizando *Abbott Real Time HIV-1 (RealTime HIV-1; Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)*, segundo as especificações do fabricante.

Sendo assim, algumas amostras foram subtipadas diretamente do RNA viral extraído a partir do plasma (10 amostras de monoinfectados HIV-1 e 7 amostras de coinfectados HIV/VHC) e as demais subtipadas utilizando como amostra o DNA pró-viral (90 amostras de monoinfectados HIV e 44 amostras de coinfectados HIV/VHC), método bem estabelecido em laboratórios de subtipagem viral (DELWART et al., 1995; KABAMBA-MUKADI et al., 2010).

A extração do RNA viral a partir do plasma foi realizada utilizando o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)*, segundo especificações do fabricante. Em seguida, a realização da transcrição reversa foi realizada utilizando o *High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystem, CA, USA)*, segundo as especificações do fabricante.

A extração de DNA para subtipagem a partir do DNA pró-viral foi realizada utilizando-se o *kit Axyprep™ DNA Extraction Kit (Axygen Scientific, Union City, California)*, segundo as indicações do fabricante.

Amplificação da região de interesse do HIV-1 por Reação em Cadeia da Polimerase

Para a comprovação da presença do HIV-1 foi realizada amplificação por *Nested-PCR* da região genômica C2-V3 da gp120 do HIV-1 utilizando metodologia descrita por DELWART e colaboradores (DELWART et al., 1995), para maiores detalhes vide anexo 2.

A comprovação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% com 0,25ng/ul de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada a 90V, 4mA por 40 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização foi realizada sob luz ultravioleta (UV) e, foram consideradas amplificadas amostras que exibiam uma banda de aproximadamente 550 pares de base (pb). Foi utilizado como marcador de peso molecular o *Ladder 100 pb* (LGC Biotecnologia).

Sequenciamento automático e subtipagem da região C2-V3 do HIV

O produto amplificado foi purificado utilizando o kit *Invisorb® Fragment CleanUp* (Invitex, STRATEC Molecular, GmbH, Berlin, Germany), segundo as recomendações do fabricante e posteriormente sequenciado utilizando o kit *ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v.3.1.* (Applied Biosystems, CA, USA), segundo as especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas, no equipamento ABI 3500 (Applied Biosystems) em duplicata, sendo que em uma reação foi utilizado o *primer* ED31 e, na outra o ED33.

A qualidade das sequências obtidas foi analisada com o programa *Phred* (EWING et al., 1998a), adotando-se escore 20 para a validação da qualidade. Um *contig* das duas reações de sequenciamento realizadas (uma com cada *primer*) foi obtido utilizando o programa *BioEdit* (EWING et al., 1998b). A análise de subtipos foi realizada utilizando o *REGA HIV-1 Subtyping Tool*, versão 2.0 (BIOAFRICA, 2010).

Determinação da sequência do arco da alça V3

A sequência de nucleotídeos obtida dos grupos de mono infectados HIV-1 e co infectados HIV/VHC da região da alça V3, foi convertida em sequência de aminoácidos, no *frame* de leitura correto, utilizando o programa *BioEdit* (EWING et al., 1998b) e, a região referente ao arco da alça V3 foi analisada.

Para inferir sobre a capacidade de indução de sincício do vírus, a sequência de aminoácidos referente à região da alça V3 foi analisada pela ferramenta de bioinformática *Geno2pheno* disponível em: <http://coreceptor.geno2pheno.org/>.

5.2.3 Genotipagem viral dos pacientes mono infectados VHC e co infectados HIV/VHC

Carga viral

Para a quantificação do RNA viral foi utilizado *Abbott Real Time HCV (RealTime HCV; Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)*, segundo as especificações do fabricante. Foram incluídas no estudo apenas as amostras que apresentaram RNA viral detectável (≥ 500 UI/mL) para que fosse possível realizar posterior genotipagem do VHC.

Extração de RNA e Transcrição reversa

A extração do RNA viral a partir do plasma foi realizada utilizando o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)*, segundo especificações do fabricante. Em seguida, a transcrição reversa foi realizada utilizando o *High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystem, CA, USA)*, segundo as especificações do fabricante.

Amplificação da região de interesse do VHC por Reação em Cadeia da Polimerase

A comprovação da presença do VHC foi realizada através de uma amplificação da região genômica 5'UTR do genoma viral, utilizado como amostra o RNA viral extraído a partir do plasma. Para esta amplificação foi realizada uma *Nested-PCR*, utilizando metodologia descrita por GARSON e colaboradores (GARSON et al., 1990), para maiores detalhes vide anexo 3.

A comprovação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% com 0,25ng/ul de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada a 90V, 4mA por 40 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização foi realizada sob luz ultravioleta (UV) e, foram consideradas amplificadas amostras que exibiam uma banda de 214 pares de base (pb). Foi utilizado como marcador de peso molecular o *Ladder 100 pb (LGC Biotecnologia)*.

Sequenciamento automático e genotipagem do VHC

O produto amplificado foi purificado utilizando o kit *Invisorb® Fragment CleanUp* (Invitek, STRATEC Molecular, GmbH, Berlin, Germany), segundo as recomendações do fabricante e posteriormente sequenciado utilizando o kit *ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v.3.1.* (Applied Biosystems, CA, USA), segundo as especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas, no equipamento ABI 3500 (Applied Biosystems) em duplicata, sendo que em uma reação foi utilizado o *primer* PTC3 e, na outra o NCR4.

A qualidade das sequências obtidas foi analisada com o programa Phred (EWING et al., 1998a), adotando-se escore 20 para a validação da qualidade.

As sequências foram analisadas com o software *BioEdit* (HALL et al., 1999) com a finalidade de construir um *contig* das duas reações de sequenciamento realizadas, as quais foram genotipadas pelo algoritmo *HCV-Blast* disponível no banco de dados *The Los Alamos HCV Sequence* (<http://hcv.lanl.gov>) (KUIKEN et al., 2005).

5.2.4 Genotipagem dos genes *KIR*

Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico das 251 amostras foi realizada a partir de sangue total utilizando-se *Axyprep™ DNA Extraction Kit* (Axygen Scientific, Union City, California), segundo as instruções do fabricante.

Padronização da quantidade de DNA utilizado na PCR-SSP

O fabricante do kit *KIR Genotyping SSP Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), recomenda que seja utilizado aproximadamente 50ng/µl de DNA na amplificação por *PCR-SSP*, no entanto, após um primeiro teste utilizando esta concentração, foi observado que algumas bandas apareciam mais fracas no gel, o que dificultava a interpretação dos resultados (Figura 12), desta maneira, após a realização de um segundo teste ficou determinado que a concentração de DNA a ser utilizada na

amplificação seria de 100ng/μl.

Reação de PCR-SSP

Para genotipagem dos genes *KIR* foi utilizada a técnica de *PCR-SSP* para genotipagem de 14 genes: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1* e 2 pseudogenes: *KIR2DP1* e *KIR3P1*, através do kit *KIR Genotyping SSP Kit* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), segundo as especificações do fabricante (maiores detalhes em anexo 4).

A comprovação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% com 0,25ng/ul de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada a 90V, 4mA por 80 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada sob luz ultravioleta (UV) (Figura 13) e para análise e interpretação dos resultados foi utilizada uma *worksheet* (Figura 14) disponibilizada pelo fabricante do kit *KIR Genotyping SSP Kit* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). Foi utilizado como marcador de peso molecular o *Ladder de 10 kb* (*Biolabs*).

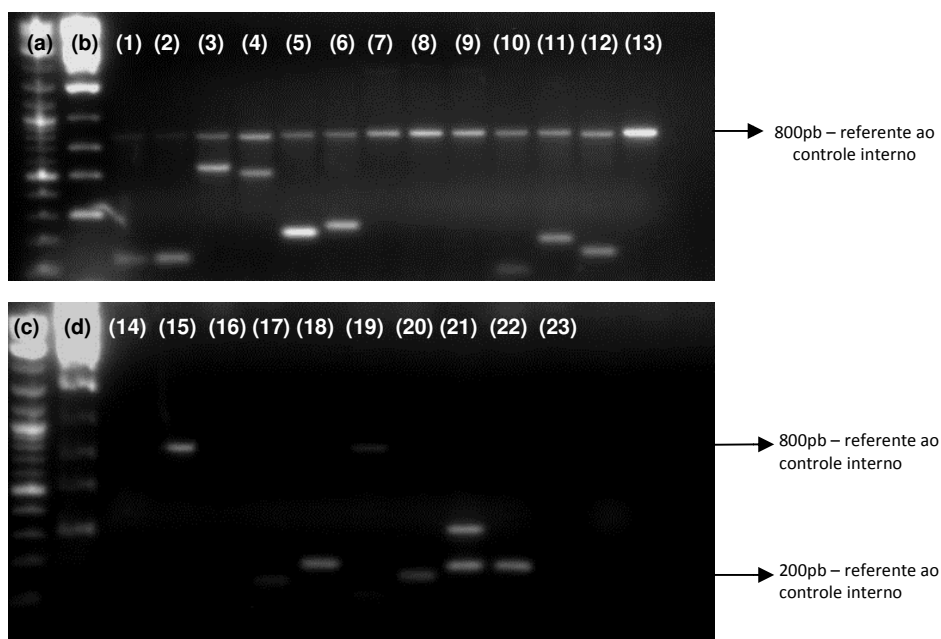


Figura 12: Eletrofosore em gel de agarose 2% do primeiro teste de PCR-SSP para genotipagem dos genes *KIR* utilizando 50ng/ μ l de DNA na reação, onde pode ser observado que as bandas ficaram fracas, sendo que, em alguns poços (14 e do 16 ao 20) nem a banda do controle interno apareceu adequadamente, o que dificultou a interpretação dos resultados. Legenda: (a) e (c) *Ladder* de 10 Kb (*Biolabs*), (b) e (d) *Ladder* de 1 Kb (*Axygen*), (1) ao (20) banda do controle interno de 800 pb mais bandas específicas para o alelo de *KIR* que o indivíduo apresentava, (21) ao (22) banda do controle interno de 200 pb mais bandas específicas para o alelo de *KIR* que o indivíduo apresentava.

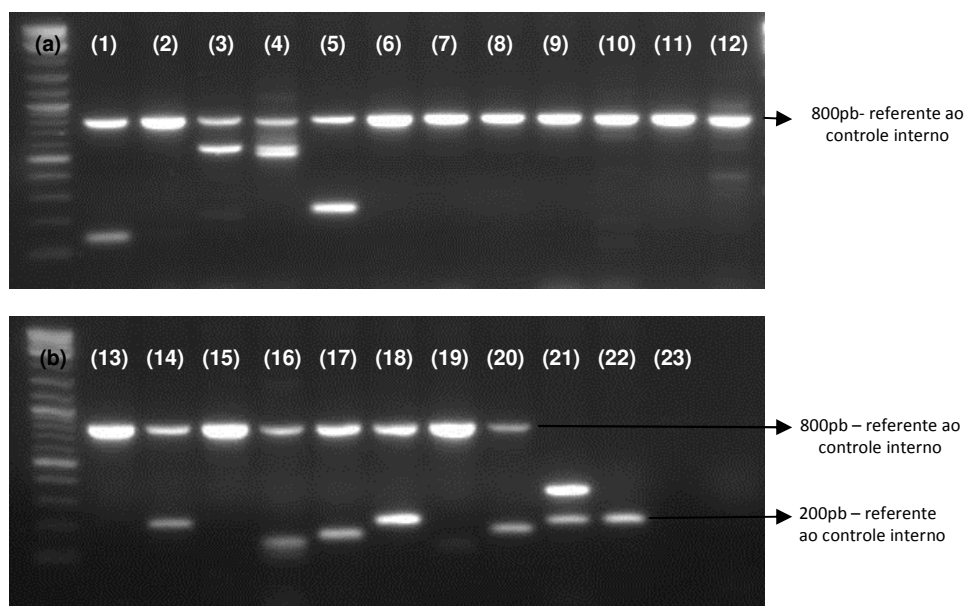


Figura 13: Eletrofosore em gel de agarose 2% referente à genotipagem dos genes *KIR* através de *PCR-SSP* da amostra de um indivíduo mono infectado HIV-1, sendo que, cada poço apresenta uma banda do controle interno da reação (800pb do poço 1 ao 20 e 200pb do 21 ao 22) mais a banda referente a um dos alelos de *KIR*, quando o indivíduo apresenta o referido alelo. Legenda: (a) e (b) *Ladder* de 10Kb (*Biolabs*), (1) banda de 140 pb, (2), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (15) e (19) banda de 800pb referente ao controle interno, (3) banda de 535 pb, (4) banda de 550 pb, (5) banda de 230 pb, (14) banda de 200 pb, (16) banda de 125 pb, (17) banda de 150 pb, (18) banda de 203 pb, (20) banda de 171 pb, (21) banda de 344 pb, (22) banda de 200pb referente ao controle e (23) controle negativo.

KIR Genotyping SSP Kit - WORKSHEET
Code no.: 54410D

Invitrogen Corporation
Tel: 1-800-955-6288
Fax: 1-800-351-2386
www.invitrogen.com

| | | |
|---------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Institution _____ | Purpose of Test _____ | Taq Lot# _____ |
| Sample I.D. _____ | DNA Extraction Method _____ | Lot# 004 Batch# _____ |
| Name _____ | DNA Conc. (ng/µl) _____ | Expiration Date _____ |
| Ethnic Origin _____ | Tested by _____ | Test Date _____ |
| Donor/Patient _____ | Reviewed by _____ | Review Date _____ |

Typing Result (Check genes present)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2DL1 | 2DL2 | 2DL3 | 2DL4 | 2DL5A | 2DL5B | 2DS1 | 2DS2 | 2DS3 | 2DS4*FUL | 2DS4*DEL | 2DS5 | 3DL1 | 3DL2 | 3DL3 | 3DS1 | 2DP1 | 3DP1*FUL | 3DP1*DEL | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

| Typing Result | Allele Specificity | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
|---|--------------------|-----|-----|----------|----------|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|---------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|----|-----|--------|
| 2DL1*001-025 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL2*0010101-010 | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL3*0010101-006/008N-003/011/013-017 | | | | 3 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL3*007/01201 | | | | 3 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL3*010 | | | | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL4*00101-017 | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL5A*0010101-01202 | | | | | | 6 | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL5B*002/0101-002/02/004-005/01/006/03-01303 | | | | | | 6 | 7 | 8 | 9 | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DL5B*003/006/02 | | | | | | 6 | 7 | 8 | 9 | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DS1*001-008 | | | | | | | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DS2*0010101-006 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | | | | |
| 2DS3*00101-004 | | | | | | | | | | 12 | | | | | | | | | | | | | |
| 2DS4*0010101-00104/01101-02/014-015 (FUL) | | | | | | | | | | | 13 | | | | | | | | | | | | |
| 2DS4*0030101-010/012-013 (DEL) | | | | | | | | | | | | 14 | | | | | | | | | | | |
| 2DS5*001-010 | | | | | | | | | | | | | 15 | | | | | | | | | | |
| 3DL1*0010101-072 | | | | | | | | | | | | | | 16 | | | | | | | | | |
| 3DL2*0010101-056 | | | | | | | | | | | | | | | 17 | | | | | | | | |
| 3DL3*00101-048 | | | | | | | | | | | | | | | | 18 | | | | | | | |
| 3DS1*010-058 | | | | | | | | | | | | | | | | | 19 | | | | | | |
| 3DP1*00101-010 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 20 | | | | | |
| 3DP1*00102/004/007/009/0101-00302 (FUL) (975bp) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 21 | | | 22 | |
| 3DP1*0030101-00304/02/005-006/008/010 (DEL) (344bp) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 21 | | 22 |
| Product Size (bp) | | 140 | 140 | 65/65/10 | 65/65/10 | 230 | 207 | 1763 | 1893 | 1761 | 1761 | 100 | 207 | 165/156 | 216 | 200 | 195 | 136/125/96 | 150 | 203 | 96 | 171 | 34/975 |
| Lane Number | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| Failed Controls | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| False Positive | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| False Negative | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 14: *Worksheet* utilizada na interpretação dos resultados obtidos através da *PCR-SSP* e revelados em gel de agarose 2%. Como citado anteriormente, cada poço da placa representa um alelo e, quando a banda referente a determinado poço aparece no gel significa que a pessoa tem aquele alelo, onde, através da planilha acima é possível saber a qual alelo a banda pertence, como por exemplo, se no poço 1 aparecer uma banda de 140 pb mais a banda de 800pb do controle, significa que o indivíduo apresenta o gene *KIR2DL1*.

5.2.5 Tipagem do HLA de classe I : A, B e C

Para a tipagem do HLA de classe I foram utilizados os kits comerciais *SeCore® A Locus Sequencing KIT (RUO) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)*; *SeCore® B Locus Sequencing Kit, Single Amplification System (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)* e *SeCore® CW Locus Sequencing Kit (RUO) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)*, segundo as especificações do fabricante (protocolo em anexo 5).

A comprovação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% com 0,25ng/ul de brometo de etídio, sendo a corrida eletroforética realizada a 90V, 4mA por 40 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM).

A visualização foi realizada sob luz ultravioleta (UV) e, foram consideradas amplificadas amostras que apresentavam uma banda de 990 e outra de 1100 pb para o HLA de classe I - A; 950 e 1400 pb para o HLA de classe I - B e 1370 e 1375 pb para o HLA de classe I - C (Figura 15).

O produto amplificado foi sequenciado conforme protocolo em anexo 5 e as sequências de todos os alelos foram analisadas através de um *software* (*uType 6.0*) disponibilizado pelo fabricante do kit (*Invitrogen*).

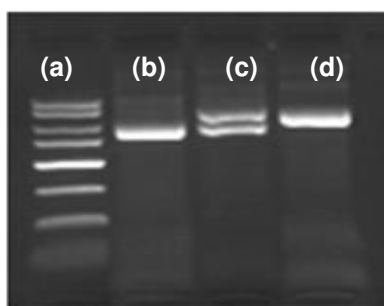


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 2% referente à Tipagem do HLA de classe I (A, B e C).
 Legenda: (a) *Ladder* de 1 Kb (*Axygen*); (b) bandas (sobrepostas) de 990 pb correspondente aos exons 4 e 5 do HLA-A e 1100 kb correspondente aos exons 1, 2 e 3; (c) duas bandas uma de 950 pb correspondente aos exons 4 e 5 do HLA-B e outra de 1400 pb correspondente aos exons 1, 2 e 3; (d) bandas (sobrepostas) de 1370 correspondente aos exons 4 e 5 do HLA-C e 1375 pb correspondentes aos exons 1, 2 e 3.

5.2.6 Análise de prontuários

Dados referentes à progressão da doença relacionados às infecções ocasionadas pelos vírus HIV e VHC, como, carga viral, contagem de linfócitos T CD4, tipo de tratamento, caso aids segundo critérios CDC, fibrose, resposta ao tratamento e dados demográficos, foram retirados dos prontuários médicos dos pacientes.

5.2.7 Análise dos Dados

Os dados demográficos como sexo e idade foram analisados de forma descritiva, utilizando porcentagem e valores como média, mediana e Intervalo interquartil (IQR), sendo representados em forma de gráficos e tabelas.

Os Grupos de monoinfectados HIV-1 e coinfectados HIV/VHC foram distribuídos com relação à presença da variante B' e também com relação à capacidade de indução de sincício, sendo que a correlação entre esses dois fenótipos (GWG – GPG e NSI - SI) foi realizada utilizando o teste qui-quadrado, sendo considerados valores de p inferiores a 0,05.

As variáveis relacionadas à progressão da infecção pelo HIV-1 (Contagem de CD4, carga viral, classificação CDC, tratamento) e pelo VHC (Grau de fibrose, resposta a tratamento e tratamento) foram analisadas de maneira descritiva utilizando porcentagem, média, mediana, intervalo interquartil (IQR) e representadas em forma de gráficos e tabelas.

A frequência de distribuição dos genes *KIR* e de alelos do HLA ligantes de *KIR* em cada um dos Grupos, 1, 2 e 3, foi analisada utilizando contagem direta a partir de uma tabela geral de dados montada no programa Microsoft Excel, sendo esta a frequência absoluta, sendo que, a frequência relativa foi calculada através de porcentagem.

A frequência gênica de *KIR* foi calculada utilizando o equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde os resultados foram confirmados através da fórmula de Bernstein.

Possíveis diferenças entre as frequências dos 16 genes *KIR* com relação ao grupo de pacientes coinfectados e os grupos controles G1 e G2, foram analisadas a partir do teste qui-quadrado, sendo considerados significativos os resultados de $p < 0,05$. Para averiguar diferenças entre a frequência dos ligantes de *KIR* e, de *KIR* associado aos seus ligantes foi utilizado o teste exato de Fischer ($p < 0,05$).

As correlações entre os polimorfismos dos genes *KIR* com as variáveis relacionadas à evolução da infecção pelo HIV-1 e também com relação à infecção pelo VHC, foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado, sendo considerados significativos os resultados de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Triagem das amostras: Confirmação da infecção pelo HIV e/ou VHC

Para selecionar as amostras que seriam incluídas no estudo, uma triagem utilizando técnicas de biologia molecular para confirmação das infecções pelo HIV-1 (Figura 16) e/ou VHC (Figura 17) foi realizada.

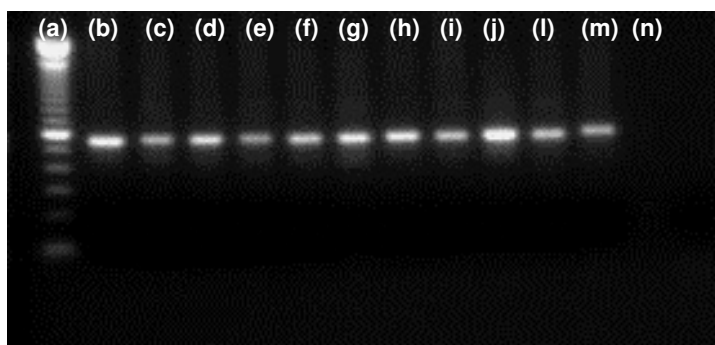


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 2% da reação de *Nested-PCR* para amplificação da região *env* do HIV-1: (a) *Ladder* de 100pb, (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h),(i), (j), (l) e (m) pacientes positivos, banda única de aproximadamente 550pb correspondente a região *env* do HIV-1 e (n) controle negativo da reação.

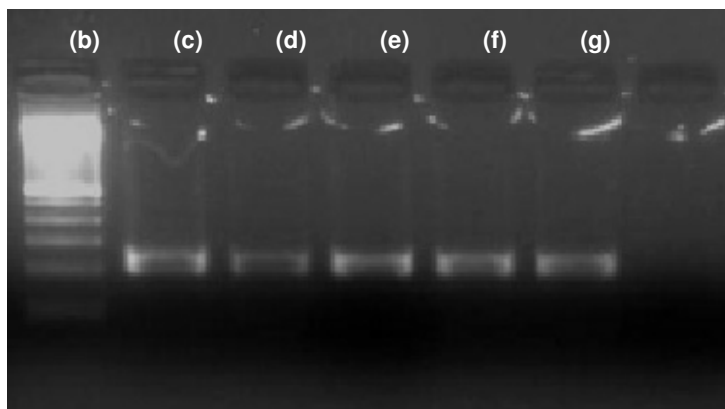


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2% da reação de *Nested-PCR* para amplificação da região genômica 5'UTR do VHC: (a) *Ladder* de 100pb (LGC Biotecnologia), (b), (c), (d), (e) e (f) pacientes positivos, banda de 214pb correspondente a região 5'UTR do VHC e (g) controle negativo.

Após essa primeira triagem, foi realizado o sequenciamento automático dos produtos amplificados para inferência dos subtipos virais no caso do HIV-1 e genótipos no caso do VHC.

Desta maneira, 251 amostras que se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo foram selecionadas e distribuídas em 3 grupos, Grupo 1 (G1): 100 indivíduos mono infectados HIV-1 subtipo B, Grupo 2 (G2): 100 indivíduos mono infectados pelo VHC genótipo 1 e Grupo 3 (G3): 51 indivíduos co infectados HIV/VHC, subtipo B e genótipo 1 respectivamente.

A seleção de indivíduos com infecção pelo subtipo B do HIV-1 foi realizada com intuito de se obter uma amostragem homogênea e, se deve a maior prevalência da infecção por este subtipo viral na maioria das regiões geográficas do Brasil, aproximadamente 80%. (QUEIROZ et al., 2007; GALVÃO-CASTRO et al., 1996).

Da mesma maneira, o genótipo 1 do VHC é o mais prevalente no Brasil (CAMPIOTTO et al., 2005; MARTINS et al., 2006; CORVINO et al., 2006) e, para uma amostragem homogênea, foram selecionadas apenas as amostras de indivíduos infectados por este genótipo.

Dos 100 indivíduos mono infectados pelo HIV-1, 60 (60%) pertenciam ao sexo masculino (Figura 18), sendo que a idade média deste grupo foi de 44 anos (Tabela

2). No grupo de monoinfectados pelo VHC, dos 100 indivíduos incluídos, 59 (59%) eram do sexo masculino (Figura 18) e a média de idade foi de 51 anos (Tabela 2). Entre os 51 indivíduos coinfectados, 36 (71%) eram do sexo masculino (Figura 18) e a idade média foi de 48 anos (Tabela 2).

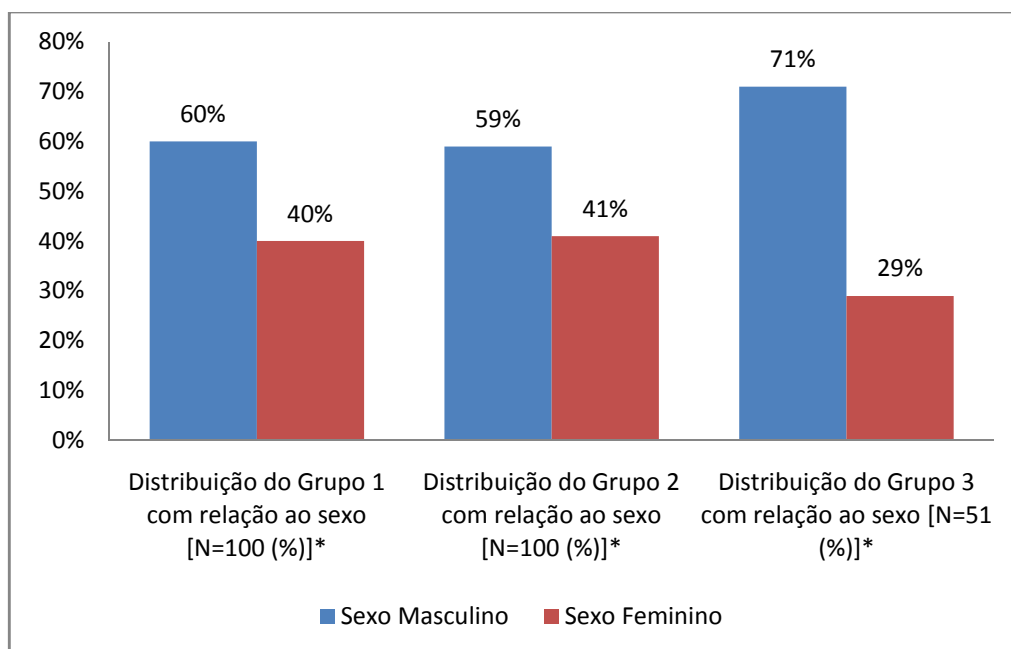


Figura 18: Distribuição dos indivíduos de cada grupo com relação ao sexo. * Distribuição do N total de cada grupo em porcentagem [N=(%)].

Como pode ser observado na Figura 18, houve uma maior proporção do sexo masculino entre os indivíduos do Grupo 1 (60%), dados esses corroborados pela literatura, onde os registros do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais apontam uma proporção de 65% do sexo masculino entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil (BRASIL, 2014a). Entre os indivíduos do Grupo 2, pode ser também observada uma prevalência do sexo masculino (59%), o que condiz com a prevalência de 60,1% relatada pela literatura (BRASIL, 2012). O Grupo 3 apresenta uma proporção de 71% de indivíduos do sexo masculino, sendo que a literatura também relata uma predominância do sexo masculino entre indivíduos com coinfeção HIV-1 e pelas hepatites B ou C (MATTHEWS-GREER et al., 2001; CARVALHO et al., 2006).

Tabela 2: Faixa etária dos indivíduos mono infectados HIV-1 (Grupo 1), mono infectados VHC (Grupo 2) e co infectados HIV/VHC (Grupo 3).

| Característica | Grupo 1 (N=100) | Grupo 2 (N=100) | Grupo 3 (N=51) |
|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| Idade, anos* | 44 (36-50) | 51 (43-58) | 48 (45-54) |

* Valores expressos em média/mediana (IQR, intervalo interquartil de 25% e 75%).

Com relação a Tabela 2, podemos observar que a maioria dos indivíduos do Grupo 1 tinham idade entre 36 a 50 anos, o que demonstra uma proporção maior de indivíduos mais velhos quando baseada na literatura, a qual retrata uma maior proporção de indivíduos com faixa etária entre 25 e 39 anos infectados pelo HIV-1 no Brasil (BRASIL, 2014a).

No Grupo 2, conforme Tabela 2, a faixa etária de infectados pelo VHC, apresentou-se maior entre os indivíduos com idade entre 43 a 58 anos, o que condiz com a literatura, a qual relata uma maior proporção de infectados entre os indivíduos com idade entre 55 a 59 anos (BRASIL, 2012).

Com relação ao Grupo 3, a Tabela 2 demonstra que a faixa etária dos co infectados HIV/VHC variou entre 45 a 54 anos, sendo que a literatura relata uma maior prevalência de co infecção entre os indivíduos com idade de 30 a 39 anos (CARVALHO et al., 2006).

As diferenças encontradas com relação à faixa etária dos grupos 1 e 3 podem ser explicadas por ter sido utilizada uma amostragem de conveniência, a qual representa a população atendida no SAEI/DAM na cidade de Botucatu –SP e também da região através da utilização de amostras do VGDN.

6.2 Subtipagem e inferência do fenótipo do arco da alça V3 do HIV

As amostras dos indivíduos infectados pelo HIV-1 foram previamente subtipadas por sequenciamento automático (Figura 19) para inclusão no estudo,

sendo que, com as sequências obtidas foi possível inferir e determinar o fenótipo da região do arco da alça V3 com relação a antigenicidade e citopatogenicidade do vírus, utilizando ferramentas de bioinformática.

A figura 19 ilustra parte de um cromatograma, que foi obtido através da subtipagem da região *env* do HIV-1.

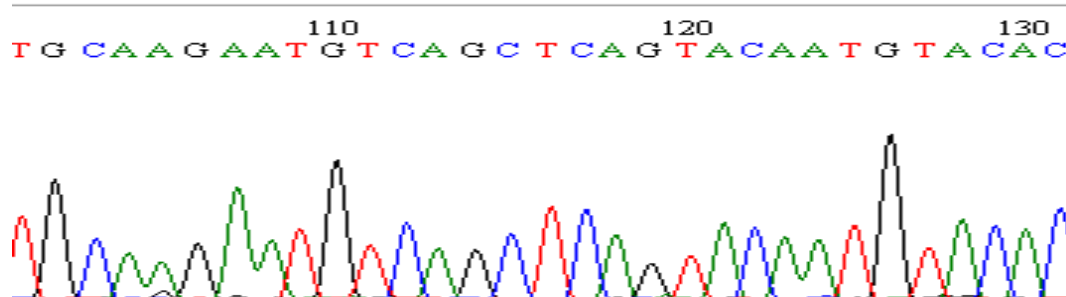


Figura 19: Parte de um cromatograma obtido do sequenciamento da região genômica *env* do HIV-1, evidenciando uma sequência de boa qualidade, com espaçamento regular e picos nítidos.

Desta maneira, foi realizada a distribuição dos indivíduos dos Grupos 1 e 3 com relação a antigenicidade, GPG (Subtipo B) e GWG (Variante B'), Tabela 3 e, também com relação a citopatogenicidade, fenótipo Indutor de Sincício (SI) e Não Indutor de Sincício (NSI), Tabela 4.

Tabela 3: Distribuição dos pacientes do Grupo 1 (N=100) e Grupo 3 (N=51) segundo o fenótipo do arco da alça V3 da gp 120 do HIV-1 (GPG ou GWG).

| Fenótipo do Arco da Alça V3 da gp 120 do HIV-1 (Antigenicidade) | Grupo 1 (N=100) | Grupo 3 (N=51) | <i>p-value</i> |
|---|--------------------|-------------------|----------------|
| GPG [N (%)] | 51 (51%) | 26 (51%) | |
| GWG [N (%)] | 21 (21%) | 12 (24%) | 0,7242* |
| OUTROS [N (%)] | 28 (28%) | 13 (25%) | |

*Teste qui-quadrado. Considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Como pode ser observado na Tabela 3, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados com relação ao fenótipo da alça V3, ou seja, a frequência da variante B' do HIV-1 na população de monoinfectados (HIV) e

coinfectados (HIV/VHC) é a mesma.

Tabela 4: Distribuição dos pacientes do Grupo 1 (N=100) e Grupo 3 (N=51) segundo o fenótipo do arco da alça V3 da gp 120 do HIV-1 (NSI ou SI).

| Fenótipo do Arco da Alça V3 da gp 120 do HIV-1 (Citopatogenicidade) | Grupo 1 (N=100) | Grupo 3 (N=51) | <i>p-value</i> |
|--|--------------------|-------------------|----------------|
| NSI [N (%)] | 55 (55%) | 34 (67%) | |
| SI [N (%)] | 45 (45%) | 17 (33%) | 0,2208* |

*Teste qui-quadrado. Considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Como pode ser observado na Tabela 4, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados com relação ao fenótipo da alça V3, ou seja, a frequência dos fenótipos NSI e SI do HIV-1 na população de mono infectados (HIV) e coinfectados (HIV/VHC) é a mesma.

Foi analisada a correlação entre a presença dos fenótipos GPG e GWG com a capacidade de Indução de Sincício nos Grupos 1 e 3, Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5: Distribuição do Grupo 1 com relação a Antigenicidade e Capacidade de Indução de Sincício.

| Antigenicidade | Citopatogenicidade | Grupo 1 (N=100) | <i>p-value</i> |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------|
| GPG [N (%)] | NSI [N (%)] | 27 (27%) | |
| GPG [N (%)] | SI [N (%)] | 24 (24%) | |
| GWG [N (%)] | NSI [N (%)] | 18 (18%) | 0,0021* |
| GWG [N (%)] | SI [N (%)] | 3 (3%) | |
| OUTROS [N (%)] | NSI [N (%)] | 10 (10%) | |
| OUTROS [N (%)] | SI [N (%)] | 18 (18%) | |

*Teste qui-quadrado. Considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Como pode ser observado na Tabela 5, houve uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com relação à presença da variante B' do HIV-1 e do fenótipo Não Indutor de Sincício entre os indivíduos do Grupo 1.

Tabela 6: Distribuição do Grupo 3 com relação a Antigenicidade e Capacidade de Indução de Sincício.

| Antigenicidade | Citopatogenicidade | Grupo 3 (N=51) | <i>p-value</i> |
|----------------|--------------------|-------------------|----------------|
| GPG [N (%)] | NSI [N (%)] | 17 (33%) | |
| GPG [N (%)] | SI [N (%)] | 9 (17%) | |
| GWG [N (%)] | NSI [N (%)] | 10 (20%) | 0,1423* |
| GWG [N (%)] | SI [N (%)] | 2 (4%) | |
| OUTROS [N (%)] | NSI [N (%)] | 7 (14%) | |
| OUTROS [N (%)] | SI [N (%)] | 6 (12%) | |

*Teste qui-quadrado. Considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Como pode ser observado na Tabela 6, não houve correlação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) com relação à presença da variante B' do HIV-1 e do fenótipo Não Indutor de Sincício entre os indivíduos do Grupo 3.

A correlação encontrada entre a variante B' e o fenótipo NSI ($p = 0,0021$) nos indivíduos do Grupo 1, demonstra que esses fenótipos podem estar associados, uma vez, que estudos conduzidos com isolados virais do Brasil, já demonstraram que indivíduos infectados pela variante B' apresentam um maior tempo entre a infecção e a progressão para aids, conduzindo então a um melhor prognóstico (SANTOROLOPES et al., 2000; CASSEB et al., 2002; CASSEB et al., 2004; BRITO et al., 2006), assim como os vírus NSI já foram relacionados a fase inicial da doença, assintomática e com melhor prognóstico (ROSS et al., 1992).

A correlação por este estudo encontrada já foi sugerida pelo estudo de Triglia e colaboradores (2007).

Contudo, os resultados obtidos com relação ao Grupo 3 demonstram que os fenótipos GWG e NSI não apresentam correlação em coinfectados HIV/VHC ($p=0,1423$), sugerindo que a presença do VHC pode estar influenciando essa associação.

6.3 Variáveis relacionadas à evolução da infecção ocasionada pelo HIV-1

Foram analisadas variáveis relacionadas à evolução da infecção pelo HIV-1 (Carga viral e critérios CDC) e também com relação à imunocompetência (Contagem CD4 célula/mm³) dos indivíduos.

Desta forma, os indivíduos foram categorizados segundo cada variável relacionada à infecção pelo HIV-1 e, essa categorização foi posteriormente utilizada para as análises de correlação entre a presença/ausência dos genes *KIR* e a evolução da infecção pelo HIV-1.

Com relação à carga viral os indivíduos foram classificados como apresentando carga viral indetectável (abaixo de 1.60 log), entre 1.60 log (40) e 3.0 log (1000), entre 3.0 log (1000) e 4.0 log (10000) e acima de 4.0 log (10000), nos Grupos 1 e 3, respectivamente, durante o tratamento (Tabela 7).

A distribuição da proporção de indivíduos com contagem de CD4 inferior a 250 células/mm³, entre 250 e 500 células/mm³ e acima de 500 células/mm³, nos Grupos 1 e 3, respectivamente, durante o tratamento encontram-se representadas na Tabela 7. Os parâmetros utilizados para esta distribuição foram baseados no ponto de vista imunológico, o qual considera que a contagem de célula T CD4+ abaixo de 250 células/mm³, já pode ser considerado como alto risco para infecções oportunistas .

Os indivíduos também foram classificados segundo os critérios CDC (Centro de Controle de Doenças e Prevenção), o qual pode ser bastante útil para caracterização do início da doença, sendo que, os indivíduos enquadrados nas categorias A3, B3, C1, C2 e C3 foram considerados como tendo aids, indivíduos A1 e

A2 como assintomáticos ou com infecção aguda pelo HIV-1 e indivíduos B1 e B2 como apresentando condições sintomáticas (BRASIL, 2007).

Desta forma o Grupo 1 apresentou 31% de indivíduos considerados como tendo aids, 49% como assintomáticos e 20% como apresentando alguma condição sintomática (Tabela 7). Dos indivíduos do Grupo 3, 68% apresentaram aids, 16% estavam assintomáticos e 16 % com condições sintomáticas (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos 100 indivíduos monoinfectados HIV-1 (Grupo 1) e coinfectados HIV/VHC (Grupo 3), com relação a Carga viral, contagem de células T CD4+ e classificação CDC.

| Características | Grupo 1 (N=100) | Grupo 3 (N=51) |
|---|--------------------|-------------------|
| Carga viral, valor de log célula/mL* (durante o tratamento) [N (%)] ** | | |
| Abaixo de 1.60 log (Indetectável) | 73 (73,0%) | 29 (57,0%) |
| Entre 1.60 log e 3.0 log | 17 (17,0%) | 15 (29,0%) |
| Entre 3.0 log e 4.0 log | 2 (2,0%) | 1 (2,0%) |
| Acima de 4.0 log | 6 (6,0%) | 4 (8,0%) |
| Sem informação | 2 (2,0%) | 2 (4,0%) |
| CD4+, contagem células/mm ³ (durante o tratamento)* [N (%)] ** | | |
| Inferior a 250 células/mm ³ | 11 (11,0%) | 10 (20,0%) |
| Entre 250 e 500 células/mm ³ | 30 (30,0%) | 14 (27,0%) |
| Acima de de 500 células/mm ³ | 51 (51,0%) | 23 (45,0%) |
| Sem informação | 8 (8,0%) | 4 (8,0%) |
| Classificação CDC [N (%)] ** | | |
| Caso AIDS | 31 (31%) | 35 (68%) |
| Assintomáticos | 49 (49%) | 8 (16%) |
| Condição sintomática | 20 (20%) | 8 (16%) |

** Distribuição do N total de cada grupo em porcentagem [N=(%)] .

A Terapia antirretroviral (TARV) tem como objetivo diminuir a morbidade e mortalidade das PVHA (Pessoas vivendo com HIV/AIDS) e manter a carga viral indetectável (BRASIL, 2013), sendo assim, conforme observado na Tabela 7, entre os

indivíduos do Grupo 1, 73 % mantiveram a carga viral indetectável após início do tratamento, sendo que, 57% dos indivíduos do Grupo 3 conseguiram o mesmo. Contudo, deve ser levado em conta que a população de coinfectados utilizou tratamento de 2ª linha, uma vez que são pacientes mais antigos (Tabela 8).

Conforme pode ser observado na Tabela 7, 51 % dos indivíduos do Grupo 1 apresentaram contagem de CD4 acima de 500 células/mm³ durante o tratamento, o que é esperado, tendo em vista que o início da TARV é acompanhado por elevação da contagem de linfócitos T CD4+ e recuperação imune (BRASIL, 2013), sendo que 30% estavam com a contagem entre 250 e 500 células/mm³ e 11% apresentaram imunossupressão.

A Tabela 7 demonstra que entre os indivíduos do Grupo 3, 45% tinham contagem de CD4 acima de 500 células/mm³ durante o tratamento, o que significa que eles apresentaram recuperação imune, sendo que em 27% a contagem estava entre 250 e 500 células/mm³ e 20% apresentaram contagem abaixo de 250 células/mm³, os quais demonstraram imunossupressão.

6.4 Terapia antirretroviral (TARV)

Com relação ao tratamento antirretroviral, os indivíduos mono infectados HIV-1, utilizaram como tratamento 3 tipos de terapêutica diferentes, onde 62% utilizaram as classes de Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo (ITRN) associados a Inibidores da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN), 26% ITRN com Inibidores de protease (IP) e, 1% ITRN associados a ITRNN mais IP, sendo que, os dados referentes ao tratamento inicial de 11% dos indivíduos deste grupo não estavam disponíveis no prontuário (Tabela 8).

Atualmente a terapêutica utilizada pelo Grupo de mono infectados HIV-1, os divide em 5 grupos, sendo que 43% utilizam ITRN associados a ITRNN, 47% ITRN mais IP, 6% ITRN associados a IP mais Inibidores de Integrase (II), 2% ITRN associados a ITRNN mais IP e II e, 1% ITRN associados a IP, II e Inibidores de Fusão (IF), os dados de 1% dos indivíduos deste grupo com relação a terapêutica não estavam disponíveis nos prontuários (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição dos indivíduos do Grupo 1 (N=100) segundo a TARV utilizada e tratamento atual.

| Terapia antirretroviral (TARV) | Grupo 1 (N= 100) |
|--------------------------------|---------------------|
| Tratamento utilizado | |
| ITRN + ITRNN | 62 (62,0%) |
| ITRN + IP | 26 (26,0%) |
| ITRN + ITRNN + IP | 01 (1,0%) |
| Sem informação | 11 (11,0%) |
| Tratamento atual | |
| ITRN+ITRNN | 43 (43,0%) |
| ITRN+IP | 47 (47,0%) |
| ITRN+IP+II | 06 (6,0%) |
| ITRN+ITRNN+IP+II | 02 (2,0%) |
| ITRN+IP+II+IF | 01 (1,0%) |
| Sem informação | 01 (1,0%) |

Os indivíduos coinfectados (Grupo 3) utilizaram como tratamento 2 tipos de terapêuticas diferentes, sendo que 51 % já utilizaram ITRN associados a ITRNN, 29% ITRN associados a IP e 20% não apresentavam dados com relação a TARV anteriores no prontuário (Tabela 9).

Atualmente, 20% dos indivíduos do Grupo 3 utilizam ITRN associados a ITRNN, 57% utilizam ITRN associados a IP, 4% ITRN associados a IP e II, 2% ITRN associados a IP e Maraviroque (MQV) e 17% não apresentavam os dados com relação a terapêutica atual no prontuário (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição dos indivíduos do Grupo 3 (N=51) segunda a TARV utilizada e tratamento atual.

| Terapia antirretroviral (TARV) | Grupo 3 (N= 51) |
|--------------------------------|--------------------|
| Tratamento inicial | |
| ITRN + ITRNN | 26 (51,0%) |
| ITRN + IP | 15 (29,0%) |
| Sem informação | 10 (20,0%) |
| Tratamento atual | |
| ITRN+ITRNN | 10 (20,0%) |
| ITRN+IP | 29 (57,0%) |
| ITRN+IP+II | 02 (4,0%) |
| ITRN+IP+MQV | 01 (2,0%) |
| Sem informação | 09 (17,0%) |

Foi realizada distribuição dos indivíduos dos Grupos 1 e 3 segundo a TARV para posteriormente inferir se o tratamento estaria influenciando nas associações encontradas com relação aos polimorfismos de genes *KIR* e a evolução da infecção pelo HIV-1.

6.5 Variáveis relacionadas à infecção ocasionada pelo VHC

Os indivíduos dos Grupos 2 e 3 foram categorizados segundo variáveis relacionadas a evolução da infecção pelo VHC, como o grau de Fibrose e a resposta ao tratamento. Essa categorização foi realizada para posteriormente ser utilizada nas análises de correlação entre a presença/ausência dos genes *KIR* e a evolução da infecção pelo VHC.

Desta maneira, os indivíduos do Grupo 2 foram classificados com relação ao grau de fibrose, sendo que, 4% apresentaram grau 1, 23% grau 2, 20% grau 3 e 34 % grau 4, contudo, 19% não apresentavam dados com relação a biópsia no prontuário médico (Tabela 10).

Já no Grupo 3, 4% apresentaram grau 1 de fibrose, 33% grau 2, 10% grau 3 e 6% grau 4, sendo que em 47% dos indivíduos não foi realizada biópsia ou não havia dados no prontuário (Tabela 10). Uma observação importante a se fazer é que a biópsia só é realizada nos indivíduos coinfectados com indicação de tratamento.

Os Grupos 2 e 3 foram classificados também segundo a resposta ao tratamento para Hepatite C, como Não Respondedores (NR), quando não apresentaram uma queda de pelo menos 2-log do RNA do VHC na semana 12 de tratamento, Naive (N), quando não tratados e, como apresentando Resposta Viroológica Sustentada (RVS), quando apresentaram RNA do VHC indetectável na 24^a semana de seguimento após o termino do tratamento, conforme demonstra Tabela 10.

Tabela 10: Distribuição dos indivíduos dos Grupos 2 e 3 segundo variáveis relacionadas a evolução da infecção pelo VHC.

| Características | Grupo 2 (N=100) | Grupo 3 (N=51) |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------|
| Grau de fibrose [N (%)] ** | | |
| F0 | 0 (0%) | 0 (0%) |
| F1 | 04 (4,0%) | 02 (4,0%) |
| F2 | 23 (23,0%) | 17 (33,0%) |
| F3 | 20 (20,0%) | 05 (10,0%) |
| F4 | 34 (34,0%) | 03 (6,0%) |
| Sem informação | 19 (19,0%) | 24 (47,0%) |
| Resposta ao tratamento [N (%)] ** | | |
| RVS | 32 (32%) | 08 (16%) |
| NAIVE | 0 (0%) | 15 (29%) |
| NR | 49 (49%) | 13 (26%) |
| Sem informação | 19 (19%) | 15 (29%) |

Os graus de fibrose são um dos fatores utilizados para avaliar a progressão da doença ocasionada pelo VHC, sendo que, segundo a classificação de METAVIR (BEDOSSA; POYNARD, 1996), o grau considerado como F0 refere-se a ausência de fibrose, F1 a fibrose portal sem septo, F2 a fibrose portal com vários septos, F3 a

vários septos sem cirrose e F4 a presença de cirrose. Desta maneira, como pode ser observado na Tabela 10, a maioria dos indivíduos do Grupo 2 (34%) apresentaram cirrose hepática e do Grupo 3 (33%) fibrose portal com vários septos. No entanto, é importante ressaltar que foi utilizada uma amostragem de conveniência para o presente estudo, e que isso pode estar associado aos graus de fibrose encontrados nos indivíduos dos grupos 2 e 3.

Como pode ser observado na Tabela 10, a maioria dos indivíduos do Grupo 2, ou seja, 49% eram Não Respondedores e com relação ao Grupo 3, a grande maioria (29%) era Naive ou (29%) não obtinha informações a respeito da resposta ao tratamento no prontuário médico.

6.6 Terapêutica anti-VHC

Com relação ao tratamento para Hepatite C, os indivíduos dos Grupos 2 e 3 foram classificados em 7 terapêuticas diferentes, Pegasys mais Ribavirina; PegIntron mais Ribavirina; Pegasys mais Ribavirina e Boceprevir (BOC); PegIntron mais Ribavirina e BOC; Pegasys mais Ribavirina e Telaprevir; PegIntron mais Ribavirina e Telaprevir; apenas PegIntron e como não tratados ou Naive, conforme mostra Tabela 11.

Tabela 11: Distribuição dos Grupos 2 e 3, segundo a terapêutica utilizada no tratamento da Hepatite C.

| Terepêutica anti -VHC | Grupo 2 (N=100) | Grupo 3 (N=51) |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------|
| Pegasys+Ribavirina (N%) | 20 (20%) | 0 |
| PegIntron+Ribavirina (N%) | 11 (11%) | 21 (41%) |
| Pegasys+Ribavirina+BOC (N%) | 9 (9%) | 0 |
| PegIntron+Ribavirina+BOC (N%) | 10 (10%) | 0 |
| Pegasys+Ribavirina+Telaprevir (N%) | 19 (19%) | 0 |
| PegIntron+Ribavirina+Telaprevir (N%) | 10 (10%) | 0 |
| PegIntron (N%) | 2 (2%) | 0 |
| Naive (N%) | 0 | 15 (29,5%) |
| Sem informação (N%) | 19 (19%) | 15 (29,5%) |

Como pode ser observado na Tabela 11, a maioria dos indivíduos do Grupo 2 , 20% tratavam com Pegasys mais Ribavirina, seguido por 19% tratando com Pegasys mais Ribavirina e Telaprevir, com relação ao Grupo 3, 41% tratavam com PegIntron mais Ribavirina.

Foi realizada distribuição dos indivíduos dos Grupos 2 e 3 segundo o tratamento para Hepatite C para posteriormente inferir se o tratamento estaria influenciando nas associações encontradas com relação aos polimorfismos de genes *KIR* e a evolução da infecção pelo VHC.

6.7 Frequência dos genes *KIR* entre os grupos de monoinfectados HIV-1, monoinfectados VHC e coinfectados HIV-1/VHC

A frequência da presença/ausência de cada um dos 16 genes *KIR* para todas as amostras dos 3 Grupos (G1: Monoinfectados HIV-1, G2: Monoinfectados VHC e G3: Coinfectados HIV/VHC) foi calculada, sendo a frequência absoluta obtida por contagem direta, frequência relativa através de porcentagem e a frequência gênica utilizando o equilíbrio de Hardy-Weinberg, confirmado pelo cálculo de Bernstein (Tabela 12).

Possíveis diferenças entre as frequências dos 16 genes *KIR* entre o grupo de pacientes coinfectados e os grupos controles G1 e G2, foram analisadas a partir do teste qui-quadrado, sendo considerados significativos os resultados de $p < 0,05$ (Tabela 13).

Tabela 12: Distribuição da frequência absoluta, relativa e gênica dos genes *KIR*, nos Grupos 1, 2 e 3.

| | | Repertório de genes <i>KIR</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|--------------------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|
| | | <i>KIR2DL1</i> | <i>KIR2DL2</i> | <i>KIR2DL3</i> | <i>KIR2DL4**</i> | <i>KIR2DL5</i> | <i>KIR2DS1</i> | <i>KIR2DS2</i> | <i>KIR2DS3</i> | <i>KIR2DS4</i> | <i>KIR2DS5</i> | <i>KIR3DL1</i> | <i>KIR3DL2**</i> | <i>KIR3DL3**</i> | <i>KIR3DS1</i> | <i>KIR2DP1</i> | <i>KIR3DP1**</i> |
| GRUPO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | freq abs* | 99 | 48 | 93 | 100 | 54 | 39 | 46 | 28 | 90 | 39 | 92 | 100 | 100 | 39 | 99 | 100 |
| (N=100) | freq rel* | 0,99 | 0,48 | 0,93 | 1,00 | 0,54 | 0,39 | 0,46 | 0,28 | 0,90 | 0,39 | 0,92 | 1,00 | 1,00 | 0,39 | 0,99 | 1,00 |
| | freq gen* | 0,90 | 0,28 | 0,74 | 1,00 | 0,32 | 0,22 | 0,27 | 0,15 | 0,68 | 0,22 | 0,72 | 1,00 | 1,00 | 0,22 | 0,90 | 1,00 |
| GRUPO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | freq abs | 95 | 61 | 95 | 100 | 54 | 43 | 59 | 35 | 93 | 36 | 95 | 100 | 100 | 35 | 93 | 100 |
| (N=100) | freq rel | 0,95 | 0,61 | 0,95 | 1,00 | 0,54 | 0,43 | 0,59 | 0,35 | 0,93 | 0,36 | 0,95 | 1,00 | 1,00 | 0,35 | 0,93 | 1,00 |
| | freq gen | 0,78 | 0,38 | 0,78 | 1,00 | 0,32 | 0,25 | 0,36 | 0,19 | 0,74 | 0,20 | 0,78 | 1,00 | 1,00 | 0,19 | 0,74 | 1,00 |
| GRUPO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | freq abs | 51 | 33 | 47 | 51 | 31 | 24 | 33 | 19 | 50 | 22 | 51 | 51 | 51 | 21 | 51 | 51 |
| (N=51) | freq rel | 1,00 | 0,65 | 0,92 | 1,00 | 0,61 | 0,47 | 0,65 | 0,37 | 0,98 | 0,43 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,41 | 1,00 | 1,00 |
| | freq gen | 1,00 | 0,41 | 0,72 | 1,00 | 0,38 | 0,27 | 0,41 | 0,21 | 0,86 | 0,25 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,23 | 1,00 | 1,00 |

*freq abs = Frequência absoluta; * freq rel = Frequência relativa (%); *freq gen = Frequência gênica. **Genes de moldura.

Conforme já estabelecido na literatura os genes *KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2* são considerados genes de “moldura”, pois estão presentes em todos os indivíduos, resultados corroborados pelo presente estudo (Tabela 12).

Quando desconsiderados os genes de “moldura”, os genes que apresentaram maior frequência nos 3 Grupos foram *KIR2DL1* (G1:99%; G2:95% e G3:100%), *KIR2DL3* (G1:93%; G2:95% e G3:92%), *KIR2DS4* (G1:90%; G2:93% e G3:98%), *KIR3DL1* (G1:92%, G2:95% e G3:100%) e *KIR2DP1* (G1:99%; G2:93% e G3:100%), dados corroborados pela literatura, a qual, demonstra a alta frequência desses genes em estudos realizados na população brasileira (PIOVEZAN, 2007; FRANCESCHI et al., 2008), já o gene com menor frequência foi *KIR2DS3* (G1:28%; G2:35% e G3:37%).

A frequência de *KIR2DS3* é variável entre as populações, sendo observada a frequência de 20 a 40% em europeus e eurodescendentes, de 24 a 34 % em africanos, 8 a 18% em asiáticos, 3% em Kaingang do Brasil e de 30% na população de Curitiba no Brasil (AUGUSTO, 2006; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2006; PIOVEZAN, 2007).

Tabela 13: Frequência de cada gene *KIR* dos pacientes coinfectados (n=51) Grupo 3 e população controle Grupo 1 monoinfectados HIV-1 e Grupo 2 monoinfectados VHC.

| Repertório de genes <i>KIR</i> | Controle Grupo 1 (n=100) N% | Controle Grupo 2 (n=100) N% | Coinfectados Grupo 3 (n=51) N% | p-value* |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------|
| 2DL1 | 99 (99.0) | 95 (95.0) | 51 (100.0) | 0,8410 |
| 2DL2 | 48 (48.0) | 61 (61.0) | 33 (65.0) | 0,3661 |
| 2DL3 | 93 (93.0) | 95 (95.0) | 47 (92.0) | 1,0000 |
| 2DL4 | 100 (100.0) | 100 (100.0) | 51 (100.0) | 1,0796 |
| 2DL5 | 54 (54.0) | 54 (54.0) | 31 (61.0) | 1,1051 |
| 2DS1 | 39 (39.0) | 43 (43.0) | 24 (47.0) | 0,7645 |
| 2DS2 | 46 (46.0) | 59 (59.0) | 33 (65.0) | 0,3604 |
| 2DS3 | 28 (28.0) | 35 (35.0) | 19 (37.0) | 0,6070 |
| 2DS4 | 90 (90.0) | 93 (93.0) | 50 (98.0) | 0,9182 |
| 2DS5 | 39 (39.0) | 36 (36.0) | 22 (43.0) | 0,8748 |
| 3DL1 | 92 (92.0) | 95 (95.0) | 51 (100.0) | 0,9191 |
| 3DL2 | 100 (100.0) | 100 (100.0) | 51 (100.0) | 1,0800 |
| 3DL3 | 100 (100.0) | 100 (100.0) | 51 (100.0) | 1,0796 |
| 3DS1 | 39 (39.0) | 35 (35.0) | 21 (41.0) | 0,7510 |
| 2DP1 | 99 (99.0) | 93 (93.0) | 51 (100.0) | 0,7629 |
| 3DP1 | 100 (100.0) | 100 (100.0) | 51 (100.0) | 1,0796 |

*considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Como pode ser observado na Tabela 13, não houve diferença estatisticamente significativa com relação a frequência dos genes *KIR* entre os 3 Grupos.

6.8 Análise da correlação dos polimorfismos (do hospedeiro) de genes *KIR* com a evolução da infecção pelo HIV-1

Para analisar a correlação dos polimorfismos dos genes *KIR* encontrados nos indivíduos dos Grupos 1 e 3 com a evolução da infecção pelo HIV-1 foi utilizado o teste qui-quadrado, sendo considerados significativos os resultados com valores de $p < 0,05$.

Como citado anteriormente os indivíduos dos Grupos 1 e 3 foram categorizados segundo:

- Carga viral (Abaixo de 1.60 log; entre 1.60 log e 3.0 log; entre 3.0 log e 4.0 log e acima de 4.0 log);
- Contagem de CD4+ (Inferior a 250 células/mm³, entre 250 e 500 células/mm³ e acima de 500 células/mm³);
- Classificação CDC (Caso aids; assintomáticos; condição sintomática);
- Antigenicidade (GPG ou GWG);
- Citopatogenicidade (NSI e SI).

A categorização acima foi utilizada para correlacionar os polimorfismos de genes *KIR* com a evolução da infecção pelo HIV-1.

Com relação ao Grupo 3 (coinfectados HIV/VHC), não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a presença ou ausência de genes *KIR* com as variáveis relacionadas a evolução da infecção pelo HIV-1.

Já no Grupo 1 (monoinfectados HIV-1), foi observado que *KIR2DS4 FUL*, variante funcional do gene, não apresenta relação com o fenótipo indutor de sincício do HIV-1 ($p = 0,0298$). No entanto, estudos demonstraram que o gene *KIR2DS4 FUL* está associado a uma carga viral elevada, baixa contagem de T CD4+ e progressão da doença (MERINO et al., 2014). Os vírus com fenótipo indutor de sincício são capazes de formar células gigantes multinucleadas, que podem produzir grandes quantidades de vírus estando associado à fase crônica da doença com um pior prognóstico e imunodepressão pronunciada, caracterizando progressão da infecção (JORDAN et al., 1991).

A literatura retrata que a presença do gene *KIR2DL3* está associado ao maior risco de aquisição de Tuberculose e a diminuição de células CD4 que caracteriza condição indicativa de aids (MARUTHAMUTHU et al., 2014), contudo, foi observada associação ($p = 0,0145$) deste gene com a fase aguda e também a condições sintomáticas da infecção pelo HIV-1, ou seja, a fase mais inicial da infecção e ausência de aids.

A presença de *KIR2DS4 DEL*, variante não funcional do gene, não apresentou associação com o desenvolvimento de aids ($p=0,305$), já o estudo de Chavan e colaboradores (2014) demonstrou que este gene está associado a níveis elevados da carga viral.

Foi observada associação da presença do gene *KIR2DS5* com níveis de CD4 abaixo de 250 células/mm³ ($p=0,0401$), ao contrário do demonstrado pelo estudo de Tiemessen e colaboradores (2011), em que é sugerida a relação deste gene com níveis elevados de CD4 e a baixa carga viral.

6.9 Análise da correlação dos polimorfismos (do hospedeiro) de genes *KIR* com variáveis relacionadas à infecção pelo VHC

A presença ou ausência dos genes *KIR* foi correlacionada a variáveis relacionadas à infecção pelo VHC, utilizando para essa correlação o teste qui-quadrado, sendo considerados como significativos os resultados em que $p<0,05$.

Como citado anteriormente os indivíduos dos Grupos 2 e 3 foram categorizados segundo:

- Grau de fibrose (F0; F1; F2; F3; F4);
- Resposta ao tratamento (RVS x NR).

A categorização acima foi utilizada para correlacionar os polimorfismos de genes *KIR* com a evolução da infecção pelo VHC.

Com relação ao Grupo 3, foi encontrada associação entre a presença de *KIR2DL2* e *KIR2DS2* com os graus de fibrose 3 e 4 ($p=0,0315$), que corresponde a presença de vários septos sem cirrose e a presença de cirrose, respectivamente, este resultado é corroborado pelo estudo realizado por Bandeira e colaboradores em monoinfectados VHC, o qual relatou associação entre o estadiamento da fibrose e *KIR2DS2* (2001). O estudo de Vidal-Castineira e colaboradores (2014) demonstrou que *KIR2DL2* é mais frequente em indivíduos não respondedores com relação ao tratamento para Hepatite C. A literatura também retrata que os genes *KIR2DL2* e

KIR2DS2 apresentam associação com a Hepatite C crônica (VASCONCELOS et al., 2012).

A presença de *KIR2DL5* foi associada à fibrose 3 ($p=0,0090$), resultado corroborado pela literatura que retrata associação deste gene a Hepatite C crônica (FABRICIO-SILVA et al., 2012).

Até o momento, não estão disponíveis na literatura estudos em coinfectados que relatem a associação entre os genes *KIR2DL2*, *KIR2DS2* e *KIR2DL5* e a doença ocasionada pelo VHC, desta forma, as comparações foram realizadas com estudos em monoinfectados VHC da literatura e Grupo 2 do presente estudo.

Nas análises realizadas com os indivíduos do Grupo 2, *KIR2DS2* e *KIR2DL2* apresentaram associação com o estadiamento da fibrose ($p=0,0086$ e $p=0,0139$, respectivamente), da mesma forma que no Grupo 3, no entanto, a associação foi com os graus 2 e 3, onde o grau 2 corresponde a fibrose portal com vários septos.

A presença de *KIR3DS1* foi associada à fibrose 3 ($p=0,0414$) nos indivíduos monoinfectados pelo VHC, no entanto esse gene já foi associado a depuração viral em coinfectados HIV/VHC (RIVERO-JUAREZ et al., 2013).

A presença dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DL2* foi associada à Resposta Virológica Sustentada (RVS) nos indivíduos do Grupo 2 ($p=0,0141$ e $p=0,0224$, respectivamente). Estudo de ASKAR e colaboradores (ASKAR et al., 2009) também demonstrou associação de *KIR2DS2* e *KIR2DL2* com a RVS.

Foi realizado teste de regressão logística para avaliar se a terapêutica utilizada pelos indivíduos poderia estar influenciando os resultados encontrados, sendo que, não foi observado alterações dos níveis de significância quando relacionamos o tratamento.

6.10 Frequência absoluta e relativa dos ligantes de *KIR*

Para analisar a frequência dos ligantes de *KIR*, 90 amostras, sendo 30 do grupo de monoinfectados HIV-1, 30 do Grupo de monoinfectados VHC e 30 do Grupo de coinfectados, foram selecionadas aleatoriamente e tipadas com relação ao HLA de classe I: A, B e C, utilizando técnicas de biologia molecular, sendo que, os resultados da tipagem completa dos indivíduos de cada Grupo encontra-se em anexo 6.

A frequência da presença/ausência de cada um dos 5 ligantes de *KIR* (HLA de classe I: A3, A11, Bw, C1 e C2) para as amostras de cada um dos 3 Grupos, foi calculada, sendo a frequência absoluta obtida por contagem direta e a frequência relativa através do cálculo de porcentagem (Tabela 14).

Possíveis diferenças entre as frequências dos ligantes de *KIR* entre o grupo de pacientes coinfectados e os grupos controles G1 e G2, foram analisadas a partir do teste exato de fisher, sendo considerados significativos os resultados de $p < 0,05$ (Tabela 14).

Tabela 14: Frequência absoluta e relativa de cada ligante de *KIR* dos pacientes coinfectados (n=30) Grupo 3 e população controle Grupo 1 monoinfectados HIV-1 e Grupo 2 monoinfectados VHC.

| Ligantes de <i>KIR</i> (HLA classe I) | GRUPO 1 (N=30) N% | GRUPO 2 (N=30) N% | GRUPO 3 (N=30) N% | <i>p-value</i> |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| A3/A3 | 01 (0,03) | 01 (0,03) | 01 (0,03) | 1,6667 |
| A3/X* | 04 (0,13) | 04 (0,13) | 04 (0,13) | 1,3807 |
| A11/A11 | 00 (0,00) | 00 (0,00) | 00 (0,00) | // |
| A11/X* | 02 (0,06) | 03 (0,10) | 03 (0,10) | 1,0000 |
| BW/BW | 02 (0,06) | 02 (0,06) | 02 (0,06) | 1,5143 |
| BW/X* | 16 (0,53) | 14 (0,47) | 18 (0,60) | 0,8097 |
| C1/C1 | 04 (0,13) | 05 (0,16) | 06 (0,20) | 1,0000 |
| C1/X* | 23 (0,76) | 10 (0,33) | 14 (0,47) | 0,1881 |
| C2/C2 | 05 (0,16) | 08 (0,26) | 04 (0,13) | 0,6731 |
| C2/X* | 15 (0,50) | 19 (0,63) | 20 (0,67) | 0,6470 |

*X : presença de heterozigose dos ligantes de *KIR* com alelos não ligantes.

Como pode ser observado na Tabela 14, não houve diferença estatisticamente significativa com relação à frequência dos ligantes de KIR entre o grupo de coinfectados e os grupos controle 1 e 2.

6.11 Frequência de *KIR* e seus ligantes

Foi analisada a frequência de *KIR* e seus ligantes entre os indivíduos do Grupo 1 (N=30), Grupo 2 (N=30) e Grupo 3 (N=30), utilizando contagem absoluta e relativa.

O teste estatístico exato de Fisher foi utilizado para averiguar possíveis diferenças entre as frequências dos ligantes de *KIR* entre o Grupo 3 e os Grupos controles G1 e G2, sendo considerados significativos os resultados de $p < 0,05$ (Tabela 15).

Tabela 15: Frequência de *KIR* e seus ligantes.

| Repertório <i>KIR</i> e ligantes | GRUPO 1 | GRUPO 2 | GRUPO 3 | <i>p-value</i> |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| | (N=30) N% | (N=30) N% | (N=30) N% | |
| KIR3DL2 - A3/A11 | 07 (0,23) | 08 (0,27) | 08 (0,27) | 1,0000 |
| KIR3DL1 – BW | 18 (0,60) | 16 (0,53) | 20 (0,67) | 0,8198 |
| KIR2DL2 - C1/C1 | 01 (0,03) | 03 (0,10) | 04 (0,13) | 0,5758 |
| KIR2DL2 - C1/X* | 16 (0,53) | 09 (0,30) | 12 (0,40) | 0,3931 |
| KIR2DL3 - C1/C1 | 04 (0,13) | 05 (0,17) | 04 (0,13) | 1,0000 |
| KIR2DL3 -C1/X* | 23 (0,77) | 10 (0,33) | 14 (0,47) | 0,1881 |
| KIR2DL1 - C2/C2 | 05 (0,17) | 07 (0,23) | 04 (0,13) | 1,0000 |
| KIR2DL1 - C2/X* | 15 (0,50) | 19 (0,63) | 20 (0,67) | 0,6470 |
| KIR2DS1 - C2/C2 | 04 (0,13) | 03 (0,10) | 02 (0,07) | 1,0000 |
| KIR2DS1 - C2/X* | 08 (0,27) | 09 (0,30) | 14 (0,47) | 1,0000 |

*X : presença de heterozigose dos ligantes de KIR com alelos não ligantes

Como pode ser observado na Tabela 15 nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) foi encontrada com relação à frequência de *KIR* e seus ligantes entre os 3 Grupos.

6.12 Análise da correlação dos polimorfismos (do hospedeiro) de genes *KIR* associados a seus ligantes com variáveis relacionadas à infecção pelo HIV-1 e pelo VHC

As categorizações realizadas com relação às variáveis relacionadas à infecção pelo HIV-1 e pelo VHC citadas nos itens 6.8 e 6.9, foram utilizadas com relação aos 30 indivíduos de cada grupo (G1, G2 e G3) para serem correlacionadas à presença ou ausência de genes *KIR* associados aos seus ligantes.

Para isso foi utilizado o teste exato de Fisher sendo considerados significativos valores de p menores que 0,05, sendo que, não foram encontradas correlações estatisticamente significativas.

7 CONCLUSÃO

A correlação encontrada entre a variante B' e o fenótipo NSI nos indivíduos monoinfectados pelo HIV-1, sugere que esses fenótipos podem estar associados, tendo em vista que ambos estão relacionados a um melhor prognóstico da infecção pelo HIV-1. Esta associação já foi sugerida pelo trabalho de Triglia e colaboradores (2007). Contudo, os resultados obtidos com relação ao grupo de coinfectados HIV/VHC, demonstram que os fenótipos GWG e NSI não apresentam correlação na presença da coinfeção, sugerindo que o VHC pode de alguma maneira influenciar esta associação. Novos estudos devem ser conduzidos na tentativa de elucidar prováveis mecanismos deste processo.

A inexistência de correlação dos polimorfismos dos genes *KIR* com a progressão da infecção pelo HIV-1 em coinfectados sugere que nesta condição, a presença do HIV-1 pode estar influenciando muito mais a progressão da doença pelo VHC do que o desenvolvimento de aids propriamente dito, embasado nas correlações encontradas entre os genes *KIR* e a doença ocasionada pelo VHC nos indivíduos deste grupo.

Os resultados obtidos com relação aos genes *KIR*, *2DL2*, *2DS2* e *2DL5*, sugerem em caráter inédito a correlação destes polimorfismos com a evolução da infecção pelo VHC em indivíduos coinfectados, uma vez que, tais associações ainda não foram relatadas pela literatura, tendo em vista que estudos a respeito de polimorfismos genéticos em genes *KIR* e a relação dos mesmos com a progressão da doença são limitados nestes indivíduos.

Os genes *KIR2DL2* e *KIR2DS2* foram associados ao grau de fibrose 3, tanto no grupo de coinfectados HIV/VHC como no de monoinfectados VHC, o que sugere associação destes genes com a cronificação da doença ocasionada pelo VHC, dados corroborados pela literatura (VASCONCELOS et al., 2012). *KIR2DL2* e *KIR2DS2* foram associados a RVS nos indivíduos do Grupo 2, resultados condizentes com os encontrados pelo estudo de Askar e colaboradores (2009). Já *KIR3DS1* foi associado a fibrose 3, no entanto no estudo de Rivero-Juarez e colaboradores (2013) foi correlacionado a depuração viral.

As correlações encontradas com relação à progressão da infecção pelo HIV-1 em mono infectados (HIV), que se apresentaram discordantes das associações relatadas pela literatura, com relação aos genes *KIR2DS4 FULL*, *KIR2DS4 DEL*, *KIR2DL3* e *KIR2DS5*, sugerem que seria interessante a realização de uma análise dos níveis de expressão dos receptores *KIR* na população de estudo, uma vez que, este fator influencia de maneira abrangente a atividade das células *Natural Killer*. Da mesma maneira, outra análise importante a se realizar é a tipagem do HLA de classe I, ligantes de *KIR*, de todos os indivíduos incluídos no estudo, uma vez que, a presença ou ausência dos ligantes influencia o nível de ativação e inibição das células NK, podendo assim, talvez, os resultados destas análises justificarem as associações encontradas.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALTER, M. J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. **Clin. Liver Dis.**, v. 1, n. 3, p. 559-568, 1997.

ALTER, G. et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. **J. Exp. Med.**, v. 404, p. 3027–3036, 2007.

ALTER, G. et al. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. **Nature**, v. 476, p. 96–100, 2011.

ALVARIZ, F.G. Hepatite C Crônica: aspectos clínicos e evolutivos. **Mod. Hepatol.**, v. 30, n. esp., p. 20-32, 2004.

AN, P.; WINKLER, C.A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genet.**, v. 26, n.3, p. 119-131, 2010.

ASKAR, M. et al. Lack of Killer Immunoglobulin-Like Receptor 2DS2 (KIR2DS2) and KIR2DL2 Is Associated with Poor Responses to Therapy of Recurrent Hepatitis C Virus in Liver Transplant Recipients. **L. TRANSPL.**, v. 15, p. 1557-1563, 2009.

AUGUSTO, D.G. **Genes KIR no Brasil: caracterização de três populações**. Monografia de conclusão de curso, - Setor de Ciências Biológicas, UFPR, 2006.

BACCHETTI, P; MOSS, A.R. Incubation period of AIDS in San Francisco. **Nature.**, v.338, n.6212, p.251-253, 1989.

BANDEIRA, C. L. et al. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E ESTADIAMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E SEUS LIGANTES HLA-C EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA. **Semin. de IC. da UFPA, Belém**, v. 22, n.1, 2011.

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

BARTENSCHLAGER R; LOHMANN V.; PENIN F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nat Rev Microbiol.**, v. 11, n. 7, p. 482-496, 2013.

BEDOSSA P.; POYNARD T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatol.**, v. 24, n. 2, p. 289-293, 1996.

BIOAFRICA. **REGA HIV-1 Subtyping Tool**. REGA HIV-1 & 2 Automated Subtyping Tool (version 2.0). Disponível em: <<http://www.bioafrica.net/>>. Acesso: 10 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico AIDS/DST**. 2007. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Boletim2007_internet090108.pdf> . Acesso em: 10 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico HIV/AIDS**. 2011a. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/boletim_epidemiologico_2011> . Acesso em: 10 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para Hepatite viral C e coinfeções**. 2011b. Brasília, 2011. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/49960/web_suplemento_2_protocolo_hepatite_c_pdf_98045.pdf. Acesso em: 10 de nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico Hepatites Virais**. 2012. Brasília. 2012. Disponível em: <
http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/51820/boletim_epidemiol_gico_hepatites_virais_2012_ve_12026.pdf> . Acesso em: 10 de nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. 2013. Brasília, 2013. Disponível: <
http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo_13_3_2014_pdf_28003.pdf> . Acesso em: 10 de nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico HIV/AIDS**. 2014. Brasília, 2014a. Disponível em:
http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56677/boletim_2014_1_pdf_60254.pdf. Acesso em: 12 nov. 2014.

BRASIL. **Consenso sobre Hepatite C crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia**. 2014b. Brasília. Disponível em: <
<http://sbhepatologia.org.br/pdf/consenso-sobre-hepatite-cronica.pdf>> . Acesso em: 12 dez. 2014.

BRITO, A. et al. Women with Human Immunodeficiency Virus type 1 Brazilian variant, subtype B (B -GWGR motif), have a lower risk for progression to AIDS and death compared with subtype B (B-GPGR motif). **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1476-1481, 2006.

BRITO, A. M. et al. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.32, n.2, p.159-168, 2011.

CAFFREY, M. et al. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. **EMBO J.**, v. 17, n. 16, p. 4572-4584, 1998.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 1, p. 41-49, 2005.

CANN, A. J. et al. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. **J. Virol.**, v. 66, n. 1, p. 305-309, 1992.

CARRINGTON M.; NORMAN P. **The KIR gene cluster [online]**. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf> .Acesso em: 20 jun. 2014.

CARRINGTON, M.; MARTIN, M. P.; VAN BERGEN, J. KIR-HLA intercourse in HIV disease. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 620–627, 2008.

CARVALHO, F.H.P. et al. Prevalência do anti-HCV em pacientes soropositivos para o HIV. **Rev. P/ Med.**, v. 20, n. 3, p. 11-13, 2006.

CASSEB, J. et al. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? **Int. J. Infect. Dis.**, v. 6, n. 3, p. 164-169, 2002.

CHAN, D.C. et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 263-273, 1997.

CHAVAN, R.V. et al. Variations in KIR Genes: A Study in HIV-1 Serodiscordant Couples. **BioMed R. Int.**, p. 1-11, 2014.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-62, 1989.

CLAPHAM, P.R.; WEISS, R.A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**, v. 388, n. 6639, p. 230-231, 1997.

CONNOR, R.I.; HO, D. D. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. In: DEVITA, V.T. et al. (Eds.). **AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1992. p.13-85.

CONTRERAS, G. et al. Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. **Tissue Antig.**, v.69, n. Suppl 1, p.125-9, 2007.

COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3146-3151, 2001.

CORVINO, M.S. et al. Coinfecção HIV/VHC em pacientes de Botucatu e região. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.10, n.4, p.537-543, 2007.

DALGLEISH, A.G. et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 763-767, 1984.

DE FRANCESCO, R. et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. **Antiviral Res.**, v. 58, n.1, p. 1-16, 2003.

DELFINO, L. et al. Sequence-Based Typing for HLA-C Medium Size PCR Protocol. Chapter 9-A. In: Tilanus MGJ, Hansen JH, Hurley CK (eds). **IHWG Technical Manual. Genomic Analysis of the Human MHC: DNA-Based Typing for HLA Alleles and Linked Polymorphisms 2000: Publication of the 13th International Histocompatibility Working Group**. Fred Hutchinson Cancer Research Center: Seattle, WA, ISBN:0-945278-02-0.

DELWART, E.L. et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR Methods Appl.**, v. 4, n. 5, p. 202-216, 1995.

DIETERICH, D.T.; PUROW, J.M.; RAJAPAKSA, R. Activity of combination therapy with interferon alfa-2b plus ribavirin in chronic hepatitis C patients co-infected with HIV. **Semin.Liver Dis.**, v. 1, p. 87-94, 1999.

DODIG, M.; TAVILL, A.S. Hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfections. **J. Clin. Gastroenterol**, v. 33, n. 5, p. 367-374, 2001.

EWERTON, P. D. et al. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. **Immunogenetics**, v. 59, p. 625-630, 2007.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v.8, p.175-185, 1998a.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v.8, p.186-194, 1998b.

FABRICIO-SILVA, G. et al. 1021-LB: *KIR2DL2* AND *KIR3DS1* AND IL28B ASSOCIATION WITH HCV RESOLUTION. **Human Immunol.**, v. 74, p. 496, 2013.

FAUCI, A. S. et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Ann Intern Med.**, v. 124, n. 7, p. 654-63, 1996.

FLORES-VILLANUEVA, P.O. et al. Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development. **J. Immunol.**, v. 170, p.1925-1929, 2003.

FOLEY, B.; KORBER, B. Global variation in the HIV-1 V3 region. In: MYERS, G. et al. **Human retroviruses and AIDS**. Los Alamos: National Laboratory, 1995, p.77–108.

FRANCESCHI, D. S. A. et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. **Tissue Antigens**. 2008.

FREED, E.O.; MARTIN, M.A. HIVs and Their Replication. In: KNIPE DM, HOWLEY P. M. (Eds.). **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott, p.1601-1655, 2001.

GALLO, R.C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500–503, 1984.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 335-338, 1996.

GARSON, J.A. et al. Enhanced detection by P C R o f hepatitis C virus R N A. **Lancet**, v. 336, p. 878-879, 1990.

GAUDIERI, S. et al. Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. **Genes Immun.**, v. 6, p. 683–690, 2005.

GOMEZ-LOZANO, N. et al. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. **Immunogenetics**, v. 54, n. 5, p. 314-319, 2002.

GOTTWEIN, J.M.; BUKH, J. Cutting the gordian knot—development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. **Adv. Virus Res.**, v. 71, p. 51-133, 2008.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, ME. KIR Gene in Ethnic and Mestizo Populations from Mexico. **Hum. Immunol.**, v. 67, p. 85-93, 2006.

GOUDSMIT, J. et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 4478-4482, 1988.

HALL, T.A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v.41, p. 95-98, 1999.

HALLAL, R. et al. O acesso universal ao tratamento antirretroviral no Brasil. **R Tempus Actas Saúde Col.**, v. 4, n.2, p. 53-65, 2010.

HALLIDAY, J.; KLENERMAN, J. Barnes E. Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. **Exp. Rev. Vac.**, v. 10, n. 5, p. 659-672, 2011.

HU, Y. et al., An improved reverse dot hybridization for simple and rapid detection of adefovir dipivoxil-resistant hepatitis B virus. **Genetics and Molecular Research.**, v.1, n.11, p.53-60, 2012.

LEMP, G. F. et al. "Projections of AIDS morbidity and mortality in San Francisco", **JAMA**, v. 263, p.1497-1501, 1990.

LICHTERFELD, M. et al. T cell receptor cross-recognition of an HIV-1 CD8+ T cell epitope presented by closely related alleles from the HLA-A3 superfamily. **Int. Immunol.**, v.18, n.7, p.1179-1188, 2006.

JOBIM, M., JOBIM, L. F. J. Natural killer cells and immune surveillance Células natural killer e vigilância imunológica. **J. Pediatria.**, v.84, n.04, p.58-67, 2008.

JORDAN, C.A. et al. Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. **J Virol**, v.65, n.2, p.736-742, 1991.

KATZ, R.A.; SKALKA, A.M. The retroviral enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 133-173, 1994.

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

KENEALY, W.R. et al. Antibodies from human immunodeficiency virus-infected individuals bind to a short amino acid sequence that elicits neutralizing antibodies in animals. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 5, p. 173-182, 1989.

KIKUCHI-MAKI, A. et al. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK

cells through association with the Fc receptor gamma protein. **J. Immunol.**, v.174, p. 3859-3863, 2005.

KLIMAS, N. et al. Overview of HIV. **Psychomatic Med.**, v.70, n.5, p.523-530, 2008.

KNAPP, S. et al. Consistent Beneficial Effects of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor 2DL3 and Group 1 Human Leukocyte Antigen-C Following Exposure to Hepatitis C Virus. **Hepatology**, v. 51, n. 4, 2010.

KOHLSTAEDT, L.A. et al. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1783-1790, 1992.

KUIKEN, C. et al. The Los Alamos hepatitis C sequence data base. **Bioinformatics**, v. 21, n. 3, p. 379-384, 2005.

LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 1, p. 41-52, 2001.

LEVY, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. **AIDS Lond. Eng.**, v. 23, n. 2, p. 147-60, 2009.

LITWAK, T. **Mecanismo de interação entre a membrana viral e celular (modificado de Mechanism of action of maraviroc)**. In: Medscape. 2009. Disponível em: < http://translate.google.com.br/translate?hl=pt-BR&ie=UTF8&u=http://www.medscape.com/viewarticle/705842_3 >. Acesso em: 20 dez. 2014.

MALE, D. et al. **Immunology**. 7.ed. St Louis: Mosby, 2006. Cap.1, p. 19-28.

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

MARAGON, A. V. et al. Receptores KIR de células natural killer. **Cienc. Cuid. Saúde**, v.7, n.Suplem. 1,p.153-160, 2008.

MARTIN, M.P. et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nat. Genet.**, v.31, p.429–434, 2002.

MARTIN, M. P. et al. Cutting Edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **J. Immunol.**, v. 171, p. 2192–1295, 2003.

MARTIN, M. P. et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. **Nat. Genet.**, v. 39, p.733–740, 2007.

MARUTHAMUTHU, S. et al. Homozygous KIR2DL3 confers susceptibility to tuberculosis infection in HIV seropositive individuals. **BMC Infectious Diseases** v.14, n.Suppl 3, p.67, 2014.

MASSOLINI, V. M. **Fenótipo do arco da alça V3 da gp120 do HIV-1 e progressão da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em pacientes coinfectados com o Vírus da Hepatite C (VHC)**. 2011. 58f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Paulista, Bauru, 2011.

MATTHEWS-GREER, J. M. et al. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without Human immunodeficiency virus. **Clin. Diagn. Immunol.**, v. 8, n. 4, p. 690-694, 2001.

MELLO, C.E.B.; PIRES, M.M.A. A coinfeção pelos vírus da Hepatite C (HCV) e da Imunodeficiência Humana (HIV) – Aspectos clínicos e terapêuticos. **Mod. Hepatol.**, v.30, n. esp., 2004.

MERINO, A. M. et al. KIR2DS4 Promotes HIV-1 Pathogenesis: New Evidence from Analyses of Immunogenetic Data and Natural Killer Cell Function. **PLoS ONE**, v. 9 , n. 6, p. e99353, 2014.

MIDDLETON, D.; CURRAN, M.; MAXWELL, L. Natural killer cells and their receptors. **Transpl. Immunol.**, v.10, n. 2-3, p. 147-164, 2002.

MIRANDA, A. S. et al. Maraviroque: uma inovação terapêutica para o tratamento da AIDS. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, n.2, p.130-139, 2010.

MOESTA, A. K. et al. Humans differ from other hominids in lacking an activating NK cell receptor that recognizes the C1 epitope of MHC class I. **J. Immunol.**, v. 185, p. 4233–4237, 2010.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n.6, p. 453-63, 2007.

MORGADO, M.G. et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 569-576, 1994.

MURPHY, D.G. et al. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatology**, v. 46, p. 623A, 2007.

NAGANAWA, S. et al. A characteristic change of consensus core motif in the V3 region of HIV type 1 clade B, but not in clade E, in Thailand. **AIDS Res. and Hum. Retroviruses**, v. 13, n. 3, p.271-273, 1997.

NAINAN, O.V. et al. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. **Gastroenterol.**, v. 131, n. 2, p. 478-484, 2006.

NIAID - National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Scientists find HIV-blocking protein in monkeys. **In: THE BODY: the complete HIV/AIDS resources.** New York, 2004. Disponível em: <<http://www.thebody.com/content/art6722.html>>. Acesso em: 2 dez. 2013.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A. S. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 327-335, 1993.

PARHAM, P. et al. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 367, p. 800–811, 2012.

PEDERSEN, C. et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. **BMJ.**, v. 299, n.6692, p. 154–157, 1989.

PERA, C. L. et al. HLA-A typing: comparison between serology, the ampMcation refractory mutation system with polymerase chain reaction and sequencing. **Tissue Antigens**, v.50, p. 372-379, 1997.

PERA, C.; PARODI, A.M.; FERRARA, G.B. Sequence-Based Typing for HLA-A Long & Medium Size PCR Protocol. Chapter 7-B. In: Tilanus MGJ, Hansen JH, Hurley CK (eds). **IHWG Technical Manual. Genomic Analysis of the Human MHC: DNA-Based Typing for HLA Alleles and Linked Polymorphisms 2000: Publication of the 13th International Histocompatibility Working Group**. Fred Hutchinson Cancer Research Center: Seattle, WA, ISBN:0-945278-02-0.

PERKINS, J.A. **Estrutura do HCV (modificado)**. 2001. Disponível em: <<http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, p.5–19, 2004.

PETZL-ERLER, M. A. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciênc. Cult.**, v. 51, p. 199-210, 1999.

PIOVEZAN, B. Z. **DIVERSIDADE KIR EM DUAS POPULAÇÕES AMERÍNDIAS DO MATO GROSSO DO SUL**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PISEGNA, S. et al. p38 MAPK activation controls the TLR3- mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. **Blood.**, v. 104, n. 13, p. 4157-4164, 2004.

PLANTIER, J.C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat. Med.**, v. 15, n. 8, p. 871-872, 2009.

POCKROS, P.J. **HCV in setting of HIV Co-infection. Med Writers' Circle.** Disponível em: <<http://www.hcvadvocate.org/hcsp/articles/Pockros-3.html>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

POMMIER Y. et al. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. **Nature**, v. 4, p. 236–248, 2005.

POZZI, S.; FERRARA, G.B.; PARODI, A.M. Sequence-Based Typing for HLA-B: Medium Size PCR Protocol. Chapter 8-B. In: Tilanus MGJ, Hansen JH, Hurley CK (eds). **IHWG Technical Manual. Genomic Analysis of the Human MHC: DNA-Based Typing for HLA Alleles and Linked Polymorphisms 2000: Publication of the 13th International Histocompatibility Working Group.** Fred Hutchinson Cancer Research Center: Seattle, WA, ISBN:0-945278-02-0.

QI, Y. et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. **PLoS Pathog.** , v. 2, n. 8, p. e.79, 2006.

QUEIROZ, A.T.L. et al. Re-mapping the molecular features of the human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell lymphotropic virus type 1 Brazilian sequences using a bioinformatics unit established in Salvador, Bahia, Brazil, to give support to the viral epidemiology studies. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 102, n. 2, p.133-139, 2007.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**, Ed. Elsevier. 7^a edição, 2012.

REQUEJO, H.I.Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Rev. Saúde Pública.**, v. 40, n. 2, p.331-345, 2006.

RIVERO-JUAREZ, A. et al. Natural Killer KIR3DS1 Is Closely Associated with HCV Viral Clearance and Sustained Virological Response in HIV/HCV Patients. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61992, 2013.

ROCKEY DC, FRIEDMAN SL. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In **T.D.Boyer.**, v. 55, p. 87-109, 2006.

ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O.; WIGG, M.D. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002. p.144.

ROOS, M.T. et al. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type-1 infection. **J Infect Dis**, v.165, n.3, p.427-432, 1992.

ROSEN, H.R.; GRETCH, D.R. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Mol. Med. Today**, v. 5, n. 9, p. 393-399, 1999.

RUBBERT, A.; BEHRENS G.; OSTROWSKI, M. Patogénese da Infecção pelo VIH-1. **In: HIV Medicine**. Lisboa: **Ed. Portuguesa**, 2006. **Disponível em:** <http://hivmedicine.aidsportugal.com/html/03_Pathophys.html>. Acesso em : 20 dez. 2014.

SANTORO-LOPES, G. et al. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: Is B different from B-Br? **Aids Res. Hum.Retroviruses**, v. 16, n. 10, p. 953-958, 2000.

SANTOS, A.F. et al. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. **J Acquir Immune DeficSyndr.**, v. 45, n. 3, p.328-333, 2007.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a united system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, p. 962-973, 2005.

STANFIELD, R. et al. Dual conformations for the HIV-1 gp120 V3 loop in complexes with different neutralizing fabs. **Structure**, v. 7, n. 2, p. 131-142, 1999.

STARCICH, B.R. et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. **Cell**, v. 45, n. 5, p. 637-648, 1986.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 69-82, 2001.

TANG, H.; GRISE, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clin. Sci.**, v. 117, n. 2, p. 49-65, Jul 2009.

TAVEIRA, N. **Epidemiologia molecular da infecção pelo HIV em Portugal**. Lisboa, 2000. Disponível em: <http://www.aidscongress.net/Modules/WebC_AidsCongress/CommunicationHTML.aspx?Mid=30&CommID=15>. Acesso em: 15 jan. 2013.

TIEMESSEN, C.T. et al. Natural Killer Cell Responses to HIV-1 Peptides are Associated With More Activating *KIR* Genes and *HLA-C* Genes of the *C1* Allotype. **Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 57, n. 3, p. 181–189, 2011.

THOMSON, M.M. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. **Lancet**, v. 2, p. 461-471, 2002.

TRIGLIA, D.G. **Caracterização Molecular do Arco da Alça V3 da gp120 do HIV-1**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. **Immunity**, v. 15, p. 363-374, 2001.

UHRBERG, M. et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity**, v.7, p. 753–763, 1997.

UNAIDS. **Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2014**. Disponível em: <<http://www.unaids.org.br/>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

VARMUS, H.; BROWN, P. Retroviruses. In: BERG, D.E.; HOWE, M.M. (Eds.). **Mobile DNA**. Washington: American Society for Microbiology, 1989, p.53-108.

VASCONCELOS, J. M. et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms with chronic hepatitis C and responses to therapy in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 22-27, 2013.

VIDAL-CASTINEIRA, J. R. et al. Diversity of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Genotypes and KIR2DL2/3 Variants in HCV Treatment Outcome. **PLoS ONE**, v. 9, n.6, p. e99426, 2014.

VILCHES, C.; PARHAM P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20 , p. 217-251, 2002.


WIGDAHL, B.; GUYTON, R.A.; SARIN, P.S. Human immunodeficiency virus infection of the developing human nervous system. **Viol.**, v.159, n.2, p.440-445, 1987.

WILLIAM, A. O'BRIEN, M.D. Antiretroviral Drug Resistance and Implications for Clinical Management of HIV Infection. In: **Medscape HIV/AIDS**. Medscape Education, 2008. Disponível em: <http://www.google.com.br/imgres?q=V3+loop&hl=pt-BR&gbv=2&biw=1024&bih=653&tbnid=5DJurk17UYiXbM:&imgrefurl=http://www.medscape.org/viewarticle/570830&docid=CyU7_2oVAFNbnM&w=459&h=392&ei=Vs50TqjzloyWtwedo-G_DA&zoom=1>. Acesso em 27 nov. 2014.

WYATT, R. et al. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. **Nature**, v. 393, p. 705-711, 1998.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP

| | | |
|--|--|--|
| FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP | |  |
| PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP | | |
| DADOS DO PROJETO DE PESQUISA | | |
| Título da Pesquisa: Avaliação de polimorfismos genéticos na progressão da infecção de pacientes mono infectados e co infectados com os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus da Hepatite C (VHC) | | |
| Pesquisador: Viviam Milanez Massolini | | |
| Área Temática: | | |
| Versão: 3 | | |
| CAAE: 13116713.0.0000.5411 | | |
| Instituição Proponente: Departamento de Clínica Médica | | |
| Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO | | |
| DADOS DO PARECER | | |
| Número do Parecer: 349.761 | | |
| Data da Relatoria: 05/08/2013 | | |
| Apresentação do Projeto: Ver pareceres anteriores. | | |
| Objetivo da Pesquisa: Ver pareceres anteriores. | | |
| Avaliação dos Riscos e Benefícios: Ver pareceres anteriores. | | |
| Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Ver pareceres anteriores. | | |
| Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Ver pareceres anteriores. | | |
| Recomendações: | | |
| Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Os autores do projeto aceitaram plenamente as sugestões do parecer anterior. | | |
| Situação do Parecer: Aprovado | | |
| Endereço: Chácara Butignoli, s/n | | |
| Bairro: Rubião Junior | | |
| UF: SP | | |
| Município: BOTUCATU | | |
| CEP: 18.618-970 | | |
| Telefone: (14)3880-1608 | | |
| E-mail: capellup@fmb.unesp.br | | |

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 349.761

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO em reunião do CEP de 05/08/2013, sem necessidade de envio à CONEP.

BOTUCATU, 05 de Agosto de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.518-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Anexo 2 – Protocolo

Amplificação da região de interesse do HIV-1 por Reação em Cadeia da Polimerase

Para a comprovação da presença do HIV-1 foi realizada amplificação por *Nested-PCR* da região genômica C2-V3 da gp120 do HIV-1 utilizando uma mistura de reação contendo 1X tampão Tris-HCl; 2,5mM de MgCl₂; 0,4mM de dNTPs; 0,2μM de cada *primer* (Tabela 1) e 2,5U da enzima *Easy Taq DNA Polimerase* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), em um volume final de reação 50μL. Na primeira reação de PCR foram utilizados os *primers* ED5 e ED12 e aproximadamente 100-150ng do cDNA ou DNA e na *Nested-PCR* foram utilizados os *primers* ED31 e ED33 e 5μL do produto amplificado na primeira reação. As condições de ciclagem consistiram em uma desnaturação inicial à 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; com uma extensão final de 7 minutos à 72°C. A tabela 1 mostra as sequências dos *primers* e a fase de amplificação em que cada *primer* foi utilizado (Primeira PCR ou *Nested-PCR*).

Tabela 1 : Sequência de *primers* utilizados na amplificação da região genômica C2-V3 da gp120 do HIV-1.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' → 3') | Reação | Posição* | Referência |
|---------------|---|--------------------|-----------|-----------------------|
| ED5 | ATG GGA TCA AAG CCT AAA GCC ATG TG | 1 ^o PCR | 6556-6581 | DELWART et al. , 1995 |
| ED12 | AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG | 1 ^o PCR | 7822-7792 | DELWART et al. , 1995 |
| ED31 | AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG | <i>Nested-PCR</i> | 6816-6844 | DELWART et al. , 1995 |
| ED33 | TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C | <i>Nested-PCR</i> | 7359-7380 | DELWART et al. , 1995 |

*Posição do *primer* na sequência referência HXB2 do HIV (n^o de acesso no *GenBank*: K03455).

Anexo 3 - Protocolo

Amplificação da região de interesse do VHC por Reação em Cadeia da Polimerase

Para a comprovação da presença do VHC e da coinfeção foi realizada amplificação por *Nested-PCR* da região genômica 5'UTR do genoma viral, utilizando uma mistura de reação contendo 1X Buffer (LGC Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂ (LGC Biotecnologia), 0,4mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,2pmol de cada *primer*, 1,5U de *Easy Taq DNA polimerase* (LGC Biotecnologia – 5U/μL) num volume total de reação de 50μL. Na primeira reação foram utilizados 100ng de cDNA e na segunda reação (*Nested-PCR*) 5μL do produto amplificado na primeira *PCR*. As condições de ciclagem foram 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 55 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos. A Tabela 1 mostra as sequências dos *primers* e a fase de amplificação em que cada *primer* foi utilizado (Primeira *PCR* ou *Nested-PCR*).

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados para amplificação da região 5'UTR do genoma do VHC.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' → 3') | Reação | Posição* | Referência |
|---------------|--|-------------------|----------|-----------------------------|
| PTC1 | CGT TAG TAT GAG TGT CGT GC | 1ªPCR | 81-100 | Garson <i>et al.</i> , 1990 |
| NCR2 | ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT | 1ªPCR | 323-351 | Garson <i>et al.</i> , 1990 |
| PTC3 | AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG | <i>Nested-PCR</i> | 99-118 | Garson <i>et al.</i> , 1990 |
| NCR4 | CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT | <i>Nested-PCR</i> | 288-313 | Garson <i>et al.</i> , 1990 |

* Posição de acordo com a sequência VHC-1 (nº de acesso no *GenBank*: M62321).

Anexo 4 - Protocolo

Reação de PCR-SSP

O kit *KIR Genotyping SSP Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)*, disponibiliza uma placa com 24 poços, sendo que, em cada poço até o vigésimo segundo contém 1 par de *primers* específicos para a amplificação de um determinado alelo do gene KIR e 1 par de *primers* para controle interno da reação (validação dos resultados), o qual amplifica uma região conservada de um gene específico que o kit, presente em todas as amostras, sendo que até o poço de número 20 o fragmento amplificado para controle interno apresenta 800pb e dos poços 21 e 22, 200pb. O poço de número 23 é utilizado para controle negativo da reação.

O kit *KIR Genotyping SSP Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)*, também disponibiliza um tampão de *PCR* pré-aliquotado (composto provavelmente por *Buffer*, dNTPs e $MgCl_2$), o qual precisa ser ressuscitado com 152 μ l de água ultrapura e 1,8 μ l de Taq DNA polimerase, sendo que, a polimerase utilizada para esta reação foi a *Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies, CA, USA)*.

Para controle negativo da reação, 10 μ l da mistura devem ser adicionados ao poço de número 23 da placa.

Posteriormente 31 μ l da amostra de DNA precisa ser adicionado a mistura e deste mix devem ser realizadas alíquotas de 10 μ l em cada poço.

A placa deve ser lacrada e a reação de amplificação realizada. As condições de ciclagem são 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 63°C por 20 segundos e 72°C por 90 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

Anexo 5 - Protocolo

Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento HLA

Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de sangue total utilizando-se *Axyprep™ DNA Extraction Kit* (Axygen Scientific, Union City, California), segundo as instruções do fabricante.

Padronização da quantidade de DNA utilizado no sequenciamento

Testes foram realizados e foi determinado que a concentração ideal de DNA utilizada no sequenciamento seria de 15 a 30 ng/ul.

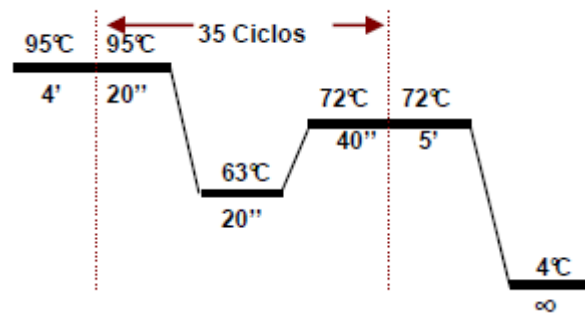
Sequenciamento dos loci A, B e C.

1. Preparação de reações de amplificação de classe I (A, B e C):

- 1.1. Retirar as amostras já extraídas e quantificadas do refrigerador e aguardar descongelamento.
- 1.2. Acrescentar 5 µl de cada DNA de amostra em cada tubo de amplificação.
- 1.3. Repetir o mesmo procedimento para os primers de amplificação Secore sequenciamento HLA.
- 1.4. Calcular os volumes de Primer e Taq que serão utilizados para as amostras que serão amplificadas. Nomear um tubo de 1,5 ml para cada locus. Tabela com alguns exemplos de quantidades:

| Classe I | n = Número de amostras | | | |
|---|------------------------|--------|--------|--------|
| | n = 5 | n = 10 | n = 15 | n = 25 |
| Amp Mix [(n reações) x 19.8µl] | 99µl | 198µl | 297µl | 495µl |
| FastStart™ Taq [(n reações) x 0.2µl] | 1.0µl | 2.0µl | 3.0µl | 5.0µl |

- 1.5. Pipetar a quantidade de primer necessária para cada locus.
- 1.6. Retirar a taq do freezer e pipetar em cada tubo de cada locus. Retornar a taq ao freezer.
- 1.7. Acrescentar 20 µl da mistura principal a cada tubo.
- 1.8. Cobrir os tubos e agitar brevemente. Centrifugar brevemente.
- 1.9. Colocar os tubos no termociclador. Executar a PCR de acordo com o programa abaixo:



Obs: O tempo total de PCR é de aproximadamente 1,5 horas.

Obs: Os produtos de PCR podem ser armazenados a 4 °C por 24 horas ou a -20 °C por uma semana.

2. **Eletroforese em gel de agarose:** Confirmar a presença de produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose (1.5 –2.0%).

2.1. Carregar o gel de agarose com 5µl de produto de PCR das amostras amplificadas.

2.2. Produtos esperados para cada amplificação de locus específico:

| | Tamanho do produto |
|---------|--------------------|
| Locus A | 1100 e 990 bp |
| Locus B | 1400 e 950 bp |
| Locus C | 1375 e 1370 bp |

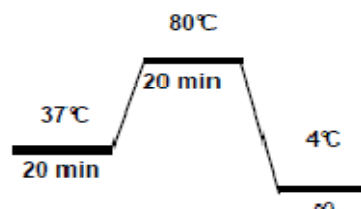
3. **Purificação de produtos de PCR (ExoSAP-IT™):** O tratamento dos produtos de PCR com ExoSAP-IT™ degradará os primers não incorporados e hidrolizará os dNTPs restantes.

3.1. Acrescentar 4 µl de ExoSAP-IT™ aos tubos de amplificação.

3.2. Agitar muito bem as misturas de reação.

3.3. Centrifugar brevemente para puxar o conteúdo para o fundo dos tubos ou reservatórios.

3.4. Colocar os tubos ou a placa num termociclador e executar o seguinte perfil:



Observação: Os amplicons tratados com ExoSap-IT™ podem ser armazenados a -20°C durante até uma semana.

4. Reação de sequenciamento:

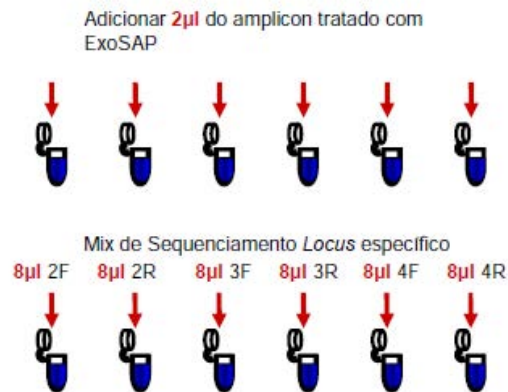
4.1. Deve-se utilizar uma placa específica para a reação de sequenciamento. Esta placa irá ser utilizada até o final da reação e colocada no analisador genético 3500.

4.2. O desenho da placa deve obedecer o número de injeções que será realizado. Por exemplo, no caso da realização de 4 amostras, deve-se seguir o seguinte desenho:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | S1F | S1R | | | | | | | | | | |
| B | S2F | S2R | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | ▼ | ▼ | ▼ | ▼ | | | | | | | | |

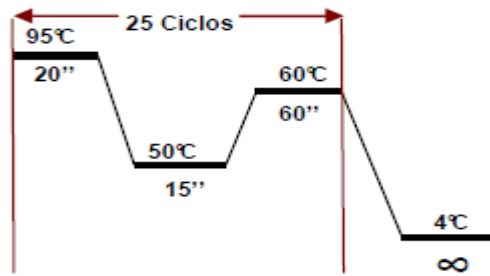
4.3. Adiciona-se em cada poço, 2ul do amplicon da amostra. Para HLA-A, B e C, são necessários 6 poços para cada locus.

4.4. Adicionar 8ul de cada primer de sequenciamento, sendo os primers: 2F, 2R, 3F, 3R, 4F e 4R:



4.5. Cobrir os tubos ou a placa, agitar brevemente para misturar e centrifugar os tubos ou placa.

4.6. Programa para reação de sequenciamento:



Observação: É muito importante verificar se o primer de sequenciamento apropriado e o amplicon tratado são colocados no tubo correto. A precipitação com etanol deve ser realizada em até 24 horas.

5. Precipitação em etanol:

- 5.1. Depois do sequenciamento, deve-se realizar a precipitação em etanol para retirar as impurezas, sais, dNTPs, ddNTPs e primers não incorporados. Acrescentar 2 µl de tampão PPT a cada poço da placa com sequencias.
- 5.2. Centrifugar brevemente para garantir que todo o tampão ppt seja levado para o fundo do tubo.
- 5.3. Acrescentar 40 µl de etanol a 100% a cada mistura.
- 5.4. Cobrir a placa e agitar fortemente por 1 minuto.

Observação: Certificar-se de que o conteúdo de todos os tubos está muito bem misturado.

- 5.5. Centrifugar a placa durante 30 minutos a 2000g.
- 5.6. Retirar a tampa, cobrir com uma toalha de papel e inverter. Centrifugar até 1 minutos a 500g na posição invertida para retirada do sobrenadante.
- 5.7. Acrescentar 100 µl de etanol a 70% ao pellet de DNA. **NÃO** agitar a placa.
- 5.8. Centrifugar a placa durante 5 minutos a 2.000g.
- 5.9. Retirar a tampa, cobrir com uma toalha de papel e inverter. Centrifugar até 1 minutos a 500g na posição invertida para retirada do sobrenadante.

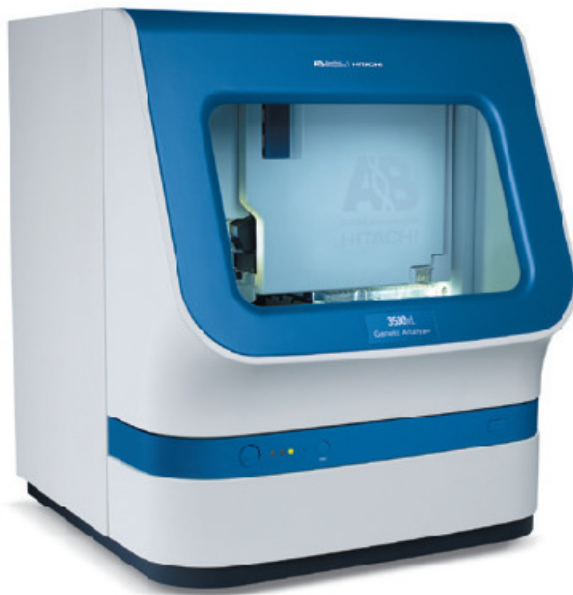
6. Eletroforese capilar:

- 6.1. Acrescentar 15 µl de formamida Hi-Di™ em cada tubo da placa.
- 6.2. Desnaturar as amostras a 95°C durante 2 minutos num termociclador.
- 6.3. Colocar a placa no equipamento de eletroforese capilar (3500).

6.3 Analisador Genético 3500

1. Após adicionar formamida, colocar a septa nas placas desnaturadas que serão analisadas.
2. Colocamos no analisador genético 3500 (clique no botão frontal "Tray" para inserir as placas).
3. Criar placa: na tela Dashboard, clique em "Create New Plate", nomeie a placa e clique em next.
4. Importar arquivo txt previamente criado no uType, ligue com o protocolo de corrida "Secure", file name convention "HLA" e result group "HLA".
5. Clique em Start Run.

A corrida terá duração variável, dependendo de quantas placas foram colocadas e quantos poços serão analisados.



Analisador Genético 3500

Anexo 6 – Resultados Tipagem HLA de classe I : A, B e C

Grupo 1

| AMOSTRA GRUPO_1 | HLA_A_alelo1 | HLA_A_alelo2 | HLA_B_alelo1 | HLA_B_alelo2 | HLA_C_alelo1 | HLA_C_alelo2 |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | A*02:01 | A*29:02 | B*44:02 | B*45:01 | C*05:01 | C*06:02 |
| 2 | A*02:01 | A*33:01 | B*44:02 | B*53:01 | C*04:01 | C*05:01 |
| 3 | A*32:01 | A*68:02 | B*15:10 | B*27:05 | C*01:02 | C*03:04 |
| 4 | A*24:02 | A*31:01 | B*35:20 | B*41:01 | C*04:01 | C*17:01 |
| 5 | A*02:01 | A*03:01 | B*27:05 | B*45:01 | C*04:01 | C*05:01 |
| 6 | A*02:01 | A*24:02 | B*18:01 | B*35:01 | C*04:01 | C*07:01 |
| 7 | A*26:01 | A*68:01 | B*40:02 | B*40:02 | C*02:02 | C*03:04 |
| 8 | A*02:01 | A*30:01 | B*35:03 | B*42:02 | C*08:02 | C*15:02 |
| 9 | A*02:01 | A*03:01 | B*07:07 | B*18:14 | C*03:07 | C*08:02 |
| 10 | A*26:01 | A*32:01 | B*15:01 | B*55:01 | C*03:03 | C*03:03 |
| 11 | A*02:01 | A*11:01 | B*50:01 | B*53:04 | C*07:01 | C*12:03 |
| 12 | A*02:01 | A*24:02 | B*39:06 | B*51:01 | C*04:01 | C*07:02 |
| 13 | A*02:01 | A*24:02 | NT** | NT** | C*05:01 | C*15:07 |
| 14 | A*02:01 | A*02:01 | B*45:01 | B*51:01 | C*14:02 | C*16:01 |
| 15 | A*30:01 | A*32:01 | B*13:02 | B*49:01 | C*06:02 | C*07:01 |
| 16 | A*02:01 | A*24:02 | B*40:01 | B*51:01 | C*03:04 | C*14:02 |
| 17 | A*02:01 | A*24:02 | B*40:01 | B*41:02 | C*03:04 | C*17:01 |
| 18 | A*02:01 | A*25:01 | B*35:03 | B*44:02 | C*04:01 | C*05:01 |
| 19 | A*02:01 | A*03:01 | B*07:02 | B*14:02 | C*07:02 | C*08:02 |
| 20 | A*02:20 | A*31:02 | B*40:01 | B*44:02 | C*03:04 | C*05:01 |
| 21 | A*30:32 | A*68:01 | B*15:03 | B*42:01 | C*04:01 | C*17:01 |
| 22 | A*01:01 | A*24:02 | B*07:05 | B*81:01 | C*15:05 | C*18:01 |
| 23 | A*33:03 | A*68:01 | B*38:01 | B*51:01 | C*12:03 | C*15:02 |
| 24 | A*02:01 | A*34:02 | B*08:01 | B*40:02 | C*07:01 | C*15:02 |
| 25 | A*02:01 | A*24:02 | NT** | NT** | C*02:02 | C*07:01 |
| 26 | A*02:01 | A*32:01 | B*14:02 | B*15:01 | C*01:02 | C*15:05 |
| 27 | A*02:01 | A*11:01 | B*50:01 | B*53:04 | C*07:01 | C*12:03 |
| 28 | A*30:01 | A*32:01 | B*44:02 | B*57:03 | C*05:01 | C*18:01 |
| 29 | A*03:01 | A*29:02 | B*38:01 | B*44:03 | C*12:03 | C*16:01 |
| 30 | A*03:01 | A*03:01 | B*35:01 | B*35:01 | C*04:01 | C*04:01 |

N amostras não tipadas.**

Grupo 2

| AMOSTRA | GRUPO_2 | HLA_A_alelo1 | HLA_A_alelo2 | HLA_B_alelo1 | HLA_B_alelo2 | HLA_C_alelo1 | HLA_C_alelo2 |
|---------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | | A*30:02 | A*68:01 | B*53:01 | B*58:02 | C*04:01 | C*06:02 |
| 2 | | A*02:01 | A*03:01 | B*18:01 | B*38:01 | C*05:01 | C*12:03 |
| 3 | | A*02:01 | A*24:02 | NT** | NT** | NT** | NT** |
| 4 | | A*01:01 | A*01:01 | NT** | NT** | C*06:02 | C*16:01 |
| 5 | | A*01:01 | A*68:01 | NT** | NT** | C*04:01 | C*06:02 |
| 6 | | A*02:01 | A*03:01 | NT** | NT** | NT** | NT** |
| 7 | | A*31:01 | A*33:01 | NT** | NT** | C*06:02 | C*06:02 |
| 8 | | NT** | NT** | B*07:02 | B*58:02 | NT** | NT** |
| 9 | | A*11:01 | A*26:01 | B*14:01 | B*53:01 | C*04:01 | C*08:02 |
| 10 | | A*02:36 | A*23:04 | NT** | NT** | NT** | NT** |
| 11 | | NT** | NT** | B*35:01 | B*53:01 | C*04:01 | C*06:02 |
| 12 | | A*23:01 | A*24:02 | B*40:03 | B*53:01 | NT** | NT** |
| 13 | | NT** | NT** | B*08:01 | B*14:02 | C*07:01 | C*08:12 |
| 14 | | NT** | NT** | B*08:01 | B*37:01 | NT** | NT** |
| 15 | | A*02:01 | A*24:02 | B*39:02 | B*50:02 | C*03:01 | C*06:02 |
| 16 | | NT** | NT** | B*08:01 | B*15:10 | C*03:04 | C*07:01 |
| 17 | | A*01:01 | A*02:01 | B*07:05 | B*35:01 | C*04:01 | C*15:05 |
| 18 | | A*02:01 | A*03:01 | B*07:02 | B*51:01 | C*02:02 | C*07:02 |
| 19 | | A*02:05 | A*11:01 | B*35:01 | B*57:03 | C*06:02 | C*07:01 |
| 20 | | A*11:01 | A*23:01 | B*40:01 | B*49:01 | C*03:04 | C*07:01 |
| 21 | | A*02:01 | A*30:04 | B*15:03 | B*51:01 | C*02:10 | C*15:02 |
| 22 | | A*02:01 | A*26:01 | B*15:03 | B*51:01 | C*02:10 | C*15:02 |
| 23 | | A*02:01 | A*23:01 | B*35:02 | B*50:01 | C*04:01 | C*06:02 |
| 24 | | A*02:01 | A*24:02 | B*44:05 | B*51:01 | C*02:02 | C*02:02 |
| 25 | | A*02:01 | A*33:03 | B*15:03 | B*51:01 | C*02:02 | C*02:02 |
| 26 | | A*23:01 | A*30:02 | B*37:01 | B*81:01 | C*02:10 | C*18:01 |
| 27 | | A*02:01 | A*23:01 | B*35:02 | B*50:02 | C*04:01 | C*04:01 |
| 28 | | A*02:01 | A*31:01 | B*15:01 | B*39:13 | C*04:01 | C*07:02 |
| 29 | | A*03:01 | A*03:01 | B*07:02 | B*14:02 | C*07:02 | C*08:02 |
| 30 | | A*02:01 | A*26:01 | B*35:01 | B*49:01 | C*03:04 | C*07:01 |

N amostras não tipadas.**

Grupo 3

| AMOSTRA | GRUPO_3 | HLA_A_alelo1 | HLA_A_alelo2 | HLA_B_alelo1 | HLA_B_alelo2 | HLA_C_alelo1 | HLA_C_alelo2 |
|---------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | | A*02:01 | A*23:01 | B*44:18 | B*50:01 | C*06:02 | C*07:01 |
| 2 | | A*02:05 | A*74:01 | B*15:03 | B*50:02 | C*02:10 | C*06:02 |
| 3 | | A*02:01 | A*11:01 | B*35:01 | B*51:01 | C*04:01 | C*15:02 |
| 4 | | A*03:01 | A*03:01 | B*07:05 | B*35:01 | C*04:01 | C*15:01 |
| 5 | | A*02:01 | A*30:01 | NT** | NT** | C*01:02 | C*06:02 |
| 6 | | A*29:02 | A*34:02 | B*44:03 | B*58:02 | C*06:02 | C*16:01 |
| 7 | | A*02:01 | A*36:01 | B*44:02 | B*53:01 | C*04:01 | C*05:01 |
| 8 | | A*03:01 | A*30:02 | B*15:03 | B*45:01 | C*02:10 | C*06:02 |
| 9 | | A*02:01 | A*68:01 | B*44:02 | B*53:01 | C*04:01 | C*05:01 |
| 10 | | A*02:01 | A*68:01 | B*15:10 | B*44:03 | C*03:04 | C*16:01 |
| 11 | | A*29:02 | A*32:01 | B*14:01 | B*58:01 | C*07:01 | C*08:02 |
| 12 | | A*02:01 | A*23:01 | NT** | NT** | C*06:02 | C*15:05 |
| 13 | | A*02:01 | A*23:01 | NT** | NT** | C*02:10 | C*07:01 |
| 14 | | A*01:01 | A*26:01 | B*08:01 | B*40:01 | C*03:04 | C*07:01 |
| 15 | | A*23:01 | A*33:01 | B*35:01 | B*45:01 | C*04:01 | C*16:01 |
| 16 | | A*03:02 | A*30:01 | B*35:01 | B*38:01 | C*04:01 | C*12:03 |
| 17 | | A*23:01 | A*80:01 | B*18:01 | B*53:01 | C*04:01 | C*15:05 |
| 18 | | A*02:04 | A*31:01 | B*40:02 | B*51:01 | C*03:04 | C*15:02 |
| 19 | | A*02:01 | A*11:01 | NT** | NT** | C*04:01 | C*17:01 |
| 20 | | A*24:02 | A*31:01 | B*07:02 | B*40:02 | C*07:02 | C*07:02 |
| 21 | | A*02:01 | A*68:01 | B*15:16 | B*44:02 | C*05:01 | C*14:02 |
| 22 | | A*01:01 | A*74:01 | B*14:02 | B*18:01 | C*07:01 | C*08:12 |
| 23 | | A*11:01 | A*29:02 | B*08:01 | B*15:01 | C*01:17 | C*07:40 |
| 24 | | A*02:01 | A*02:01 | B*39:09 | B*44:03 | C*07:25 | C*16:02 |
| 25 | | A*30:01 | A*66:03 | B*15:31 | B*35:01 | C*04:01 | C*04:27 |
| 26 | | A*02:01 | A*30:02 | B*15:01 | B*57:03 | C*04:01 | C*18:01 |
| 27 | | A*24:02 | A*74:01 | B*15:03 | B*39:06 | C*02:01 | C*07:02 |
| 28 | | A*02:01 | A*03:02 | B*18:01 | B*51:01 | C*12:03 | C*14:02 |
| 29 | | A*23:01 | A*29:01 | B*14:02 | B*44:03 | C*07:01 | C*08:02 |
| 30 | | A*02:01 | A*68:01 | B*40:01 | B*51:01 | C*03:04 | C*15:02 |

N amostras não tipadas.**

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO LABORATÓRIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR (POP)**

**HEMOCENTRO DE BOTUCATU
Hospital das Clínicas – FMB – UNESP**

**AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO PARA TIPAGEM DO
HLA DE CLASSE I (A,B,C)**

**BOTUCATU
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
**FACULDADE DE MEDICINA- HOSPITAL DAS CLÍNICAS –
 HEMOCENTRO BOTUCATU**
 DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU – SP – CEP: 18. 618-000
 TELEFONE: (14) 3811-6041 – FAX: (14) 3811-6041 – ramal 205
 Home Page: <http://www.hemocentro.fmb.unesp.br>
 e-mail: hemocentro@fmb.unesp.com.br

Título: Metodologia *in house* para tipagem do HLA de classe I

Setor: Laboratório de Biologia Molecular Pesquisa

Procedimento Operacional Padrão n° ____

Considerações:

Metodologias para tipagem do HLA incluem *PCR-SSP*, *PCR-SSO* e sequenciamento de DNA, sendo que, todas essas metodologias apresentam vantagens e desvantagens embora o sequenciamento seja considerado padrão ouro (THOMSON et al., 2002; HU et al., 2012).

Para obtenção do protocolo para tipagem do HLA-A foi utilizada metodologia descrita por Pera e colaboradores (2000). Para o HLA-B foi utilizado o protocolo descrito por Pozzi e colaboradores (2000) e para o HLA-C a metodologia descrita por Delfino e colaboradores (2000). Todos os protocolos precisaram passar por adaptações e modificações, com relação à temperatura de anelamento dos *primers*, quantidade de cloreto de magnésio, ciclagem, concentração de DNA e pelo acréscimo de uma etapa constituída por uma NESTED-PCR precedente ao sequenciamento.

Desta maneira, a metodologia é composta por:

- PCR específica para locus de alelos conhecidos do HLA;
- Nested-PCR utilizando os *primers* do sequenciamento com intuito de realizar uma pré-seleção do fragmento a ser sequenciado, para obter maior especificidade e qualidade das sequências;
- Sequenciamento do produto amplificado na Nested-PCR;
- Análise das sequências através de ferramenta de bioinformática disponível via internet (Biblioteca *IMGT/HLA*. Disponível em: < <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>>) para identificação dos alelos.

Procedimento:

- 🚰 Coletar 5 mL de sangue total em tubo do tipo Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes,

USA) contendo 1,5 mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de cada paciente.

-Extração de DNA de sangue periférico:

- ✚ Para tipagem do HLA é importante que se obtenha uma amostra de qualidade, para isso podem ser utilizados kits comerciais para extração do DNA genômico.

-Observações:

- ✓ **TODO O PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DEVE SER REALIZADO NA SALA DE PRE-AMPLIFICAÇÃO**
- ✓ **TODOS OS TUBOS DEVEM SER ABERTOS UTILIZANDO GAZE OU PAPEL ABSORVENTE**
- ✓ **CUIDADO AO ABRIR E FECHAR CADA TUBO PARA QUE AS AMOSTRAS NÃO EXTRAVASEM.**

-Quantificação das amostras:

- ✚ As amostras devem ser quantificadas em Nanodrop e o ideal é que a leitura esteja entre 30 a 50 ng/ul.
- ✚ As amostras devem ser concentradas a 250 ng em 30 ul.

-Reação de PCR para o HLA-A

✚ A reação de *PCR* baseia-se em uma amplificação específica para locus de alelos conhecidos do HLA-A que se estende desde o intron 1 até o exon 5, utilizando dois *primers*, sendo um *primer forward* (AINTRON1F) localizado no intron 1 e um *primer reverse* (AEX5MODR) localizado no exon 5, gerando ao final da amplificação um fragmento de aproximadamente 2,0 Kb. As sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados na reação de PCR.

| Primer | Sequência (5' → 3') | Localização | Posição* | Referência |
|---------------|---------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| AINTRON1F | CCT CTG (C/T)GG GGA GAA GCA A | INTRON 1 | 83-101 | Pera et al., 2000 |
| AEX5MODR | ACC AGC AA(G/T) GAT GCC CAC GAT | EXON 5 | 1974-1993 | Pera et al., 2000 |

* Posição de acordo com a sequência do MHC de classe I, HLA-A, exons 1-8 (nº de acesso no *GenBank*: HG970873.1).

✚ A reação é realizada utilizando uma mistura contendo 1X Buffer (Life Technologies, CA, USA), 1,2 mM de MgCl₂ (Life Technologies, CA, USA), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,1

pmol de cada *primer*, 1,5U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies, CA, USA) num volume total de reação de 50 μ L. Devem ser utilizados 250 ng de DNA. As condições de ciclagem são 98°C por 20 segundos, 8 ciclos de 98°C por 5 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos, 32 ciclos de 98°C por 5 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

✚ A comprovação da amplificação deve ser realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% com 0,25ng/ul de brometo de etídio. A corrida eletroforética realizada a 100V, 4mA por 50 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização é realizada sob luz ultravioleta (UV) e, são consideradas amplificadas amostras que exibem uma banda de aproximadamente 2,0 kilobases (Kb).

✚ Para a amplificação de fragmentos específicos correspondentes aos exons 2 e 3 a partir do produto de aproximadamente 2,0 Kb amplificado na primeira *PCR*, é necessária a realização de uma *Nested-PCR*.

-O protocolo da *Nested* é constituído por:

✚ Duas misturas (*mix*), uma para cada par de *primers*, contendo 1X Buffer (Life Technologies, CA, USA), 1,2 mM de MgCl₂ (Life Technologies, CA, USA), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,1 pmol de cada *primer*, 2,5U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies, CA, USA) num volume total de reação de 50 μ L cada, sendo os *primers* A5.9 2F e B3.6 2R utilizados no *mix* 1 para amplificação da região referente ao exon 2 e os *primers* A5.10 3F e A3.4 3R utilizados no *mix* 2 para amplificar a região referente ao exon 3. 0,5 μ l do produto amplificado na primeira *PCR* deve ser adicionado à reação. As condições de ciclagem são 95°C por 10 minutos, 25 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

A Tabela 2 apresenta as sequências dos *primers* utilizados na reação de NESTED-PCR e sequenciamento para os exons 2 e 3.

Tabela 2: Sequência de *primers* utilizados na NESTED-PCR e no sequenciamento.

| Primer | Sequência (5' □ 3') | Localização | Posição* | Referência |
|---------------|--------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| A5.9 2F | TCG GGC (A/G)GG TCT CAG CC | INTRON 1 | 154-170 | Pera et al., 2000 |
| B3.6 2R | CAC TCA CCG GCC TCG CTC TGG | INTRON 2 | 442-462 | Pera et al., 2000 |
| A5.10 3F | GGG CTC GGG GGA C(C/T)G GG | INTRON 2 | 658-674 | Pera et al., 2000 |
| A3.4 3R | GAG GCG CCC CGT GGC | INTRON 3 | 982-996 | Pera et al., 2000 |

* Posição de acordo com a sequência do MHC de classe I, HLA-A, exons 1-8 (nº de acesso no *GenBank*: HG970873.1).

✚ A comprovação da amplificação deve ser realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% com 0,25ng/ul de brometo de etídio. A corrida eletroforética realizada a 90V, 4mA por 50 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização realizada sob luz ultravioleta (UV) e, são consideradas amplificadas amostras que exibem uma banda de aproximadamente 308 pb para o exon 2 e de aproximadamente 338 pb para o exon 3.

✚ Os produtos obtidos na reação de Nested-PCR devem ser purificados. Para obter uma amostra íntegra e pura o ideal é que sejam utilizados kits comerciais, como por exemplo, o kit *Invisorb® Fragment CleanUp (Invitek, STRATEC Molecular, GmbH, Berlin, Germany)*, no entanto, protocolos *in house* para tal procedimento também podem ser utilizados, contudo, deve-se tomar muito cuidado com a qualidade do produto a ser sequenciado.

✚ Posteriormente a purificação o produto deve ser sequenciado utilizando para isto o kit *ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v.3.1. (Applied Biosystems, CA, USA)*, segundo as especificações do fabricante. As amostras são sequenciadas, no equipamento ABI 3500 (*Applied Biosystems*) em duplicata, utilizando os *primers* descritos na Tabela 2.

✚ A qualidade das sequências obtidas deve ser analisada com o programa *Phred* (EWING et al., 1998a), adotando-se escore 20 para a validação da qualidade.

✚ As sequências devem ser analisadas com o software *BioEdit* (HALL et al., 1999) com a finalidade de construir um *contig* das duas reações de sequenciamento realizadas.

Análise das sequências através de ferramenta de bioinformática

✚ As sequências obtidas podem ser tipadas através da ferramenta de bioinformática *HLA/Blast*

disponível no banco de dados *IMGT/HLA* (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/blast.html>), no entanto, o ideal é que seja utilizado um *software* para tal análise, devido às dificuldades em distinguir heterozigose e também devido a distinta frequência de alelos regionais.

O resultado da tipagem através do banco de dados *IMGT/HLA* aparece da seguinte maneira:

WU-BLAST

Protein Nucleotide Web services Help & Documentation

Tools > Sequence Similarity Searching > WU-BLAST

Results for job wublast-l20140526-155423-0420-22550200-pg

Summary Table Tool Output Visual Output Submission Details

Selection:

Apply to selection:

Annotations:

Alignments:

Entries: Download in format

Tools:

| Align. | DB:ID | Source | Length | Score | Identities % | Positives % | E() |
|-------------------------------------|-------|------------------|--------------------|-------|--------------|-------------|---------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1 | IMGTHLA:HLA06819 | A*31:53 619 bp | 619 | 1401 | 99.0 | 99.0 6.9E-119 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2 | IMGTHLA:HLA02651 | A*31:14N 1099 bp | 1099 | 1392 | 98.0 | 98.0 9.8E-119 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3 | IMGTHLA:HLA00097 | A*31:01:02 1098 bp | 1098 | 1392 | 98.0 | 98.0 9.8E-119 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4 | IMGTHLA:HLA05799 | A*31:46 1098 bp | 1098 | 1392 | 98.0 | 98.0 9.8E-119 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 5 | IMGTHLA:HLA07338 | A*31:56 1012 bp | 1012 | 1392 | 98.0 | 98.0 1.1E-118 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 6 | IMGTHLA:HLA10453 | A*31:81 1012 bp | 1012 | 1392 | 98.0 | 98.0 1.1E-118 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 7 | IMGTHLA:HLA03116 | A*31:20 874 bp | 874 | 1383 | 98.0 | 98.0 1.9E-118 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 8 | IMGTHLA:HLA07811 | A*31:01:13 822 bp | 822 | 1392 | 98.0 | 98.0 2.4E-118 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 9 | IMGTHLA:HLA03417 | A*31:23 822 bp | 822 | 1392 | 98.0 | 98.0 2.4E-118 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 10 | IMGTHLA:HLA06122 | A*31:48 822 bp | 822 | 1392 | 98.0 | 98.0 2.4E-118 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 11 | IMGTHLA:HLA07100 | A*31:55 822 bp | 822 | 1392 | 98.0 | 98.0 2.4E-118 |

No caso da figura acima o resultado é interpretado como o indivíduo apresentando o alelo do HLA A*31:53, e para saber se ele é homozigoto para este alelo ou heterozigoto é necessário a utilização de um *software*, geralmente comercial.

-Procedimento para o sequenciamento do exon 4 do HLA-A

✚ Para a tipagem do HLA-A, em alguns casos, não é suficiente o sequenciamento dos exons 2 e 3 para se chegar a uma conclusão a respeito dos alelos que a pessoa possui, quando isso acontece, é necessário que seja realizado o sequenciamento do exon 4.

✚ Para amplificação da região necessária para tipagem do exon 4 é utilizado o mesmo procedimento que para os exons 2 e 3, onde a partir do fragmento de 2 kb é realizada uma Nested-PCR. O protocolo utilizado é o mesmo que o da Nested para os exons 2 e 3, no entanto, são utilizados os *primers* descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência de *primers* utilizados na *Nested-PCR* e sequenciamento do exon 4.

| Primer | Sequência (5' → 3') | Localização | Posição* | Referência |
|---------------|---------------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| A5.11 4F | ATG ACA GAT (G/T)C(C/T) AAA TGC CT | INTRON 3 | 1529-1548 | Pera et al., 2000 |
| A3.8 4R | GAC ACC CCC (A/T)TC TCC CTC | INTRON 4 | 1854-1871 | Pera et al., 2000 |

* Posição de acordo com a sequência do MHC de classe I, HLA-A, exons 1-8 (nº de acesso no *GenBank*: HG970873.1).

✚ O produto obtido deve ser purificado e posteriormente sequenciado conforme descrito anteriormente, utilizado para isso os primers descritos na Tabela 3.

✚ As sequências obtidas devem ser analisadas com o *software BioEdit* (HALL et al., 1999) com a finalidade de construir uma sequência consenso.

✚ E a amostra pode ser tipada utilizando a ferramenta *HLA/Blast* disponível no banco de dados *IMGT/HLA* (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/blast.html>), utilizando as sequências obtidas do sequenciamento dos exons 2, 3 e 4. Contudo, como dito anteriormente é necessário a utilização de um *software* para confirmação dos resultados.

-Reação de PCR para o HLA-B

A tipagem do HLA-B consiste no sequenciamento dos exons 2 e 3, pois os polimorfismos alélicos deste gene são encontrados nestes dois exons.

✚ A reação de *PCR* para a amplificação da região do intron 1 ao intron 3 do HLA de classe I: B, deve ser realizada utilizando uma mistura de reação contendo 1X Buffer (Life Technologies, CA, USA), 0,75 mM de MgCl₂ (Life Technologies, CA, USA), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,1 pmol de cada *primer*, 1,5U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies, CA, USA) num volume total de reação de 50µL. Devem ser utilizados 400 ng de DNA. As condições de ciclagem são 98°C por 20 segundos, 30 ciclos de 98°C por 5 segundos, 69°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

Os primers encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Sequência de *primers* utilizados na reação de PCR.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' → 3') | Localização | Posição* | Referência |
|---------------|-----------------------------------|-------------|-----------|--------------------|
| Bx1° | GGG AGG AGC GAG GGG ACC (G/C)CA G | INTRON 1 | 108-129 | Pozzi et al., 2000 |
| BINT3° | GGA GGC CAT CCC CGG CGA CCT AT | INTRON 3 | 1028-1050 | Pozzi et al., 2000 |

* Posição de acordo com a sequência do MHC de classe I, HLA-B (nº de acesso no *GenBank*: JN696112.1).

-Protocolo para a reação de Nested-PCR

✚ Duas misturas (*mix*), uma para cada par de *primers*, contendo 1X Buffer (Life Technologies, CA, USA), 0,75 mM de MgCl₂ (Life Technologies, CA, USA), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,1 pmol de cada *primer*, 2,5U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies, CA, USA) num volume total de reação de 50µL cada, sendo os *primers* BEX2F e BEX2R utilizados no *mix* 1 para amplificação da região referente ao exon 2 e os *primers* BEX3F e 18CIN3 utilizados no *mix* 2 para amplificar a região referente ao exon 3. 1,0 µl do produto amplificado na primeira *PCR* deve ser adicionado à reação. As condições de ciclagem são 95°C por 10 minutos, 25 ciclos de 95°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

A Tabela 5 apresenta as sequências dos *primers* utilizados na NESTED-PCR e no sequenciamento do HLA-B.

Tabela 5: Sequência de *primers* utilizados na *Nested-PCR* e sequenciamento do HLA-B.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' → 3') | Localização | Posição* | Referência |
|---------------|---------------------------------|-------------|----------|--------------------|
| BEX2F | GGG CGC AGG ACC (T/C)G(A/G) GGA | INTRON 1 | 134-151 | Pozzi et al., 2000 |
| BEX2R | GGT CAC TCA CCG (G/T)CC TCG | INTRON 2 | 464-481 | Pozzi et al., 2000 |
| BEX3F | GGG GCC AGG GTC TCA CA | INTRON 2 | 709-726 | Pozzi et al., 2000 |
| 18CIN3 | CCC ACT GCC CCT GGT ACC | INTRON 3 | 992-1009 | Pozzi et al., 2000 |

* Posição de acordo com a sequência do MHC de classe I, HLA-B (nº de acesso no *GenBank*: JN696112.1).

✚ Os produtos obtidos devem ser purificados e sequenciados conforme procedimento descrito para o HLA-A, sendo, no entanto, utilizados os *primers* descritos na Tabela 5.

As seqüências obtidas devem ser analisadas com o software *BioEdit* (HALL et al., 1999) com a finalidade de construir uma seqüência consenso e, as mesmas, podem ser tipadas utilizando a ferramenta de bioinformática *HLA/Blast* disponível no banco de dados *IMGT/HLA* (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/blast.html>), no entanto, como citado anteriormente, os resultados devem ser confirmados através da utilização de um *software*.

-Reação de PCR para o HLA-C

A tipagem do HLA-C envolve uma amplificação específica para locus de alelos referentes à região do exon 1 ao intron 3 e posterior sequenciamento das regiões referentes aos exons 2 e 3 deste gene.

A reação de *PCR* para a amplificação da região do intron 1 ao intron 3 do HLA de classe I: C, deve ser realizada utilizando uma mistura de reação contendo 1X Buffer (Life Technologies, CA, USA), 0,75 mM de MgCl₂ (Life Technologies, CA, USA), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,1 pmol de cada *primer*, 1,5U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies, CA, USA) num volume total de reação de 50µL. Devem ser utilizados 400 ng de DNA. As condições de ciclagem são 98°C por 20 segundos, 8 ciclos de 98°C por 5 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, 32 ciclos de 98°C por 5 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

A Tabela 6 apresenta os *primers* utilizados na reação de PCR para o HLA-C.

Tabela 6: Sequência de *primers* utilizados na reação de PCR.

| <i>Primer</i> | Seqüência (5' → 3') | Localização | Posição* | Referência |
|---------------|---------------------------------|-------------|-----------|--------------------|
| DMEX1 | CTC (C/A)TC CTG CTG CTC TCG GGA | INTRON 1 | 307-327 | Cereb et al., 1996 |
| DMEX3 | TGG GAG GCC AT(C/G) CCG GGA GAT | INTRON 3 | 1317-1337 | Cereb et al., 1996 |

* Posição de acordo com a seqüência do MHC de classe I, HLA-C (nº de acesso no *GenBank*: KJ562278.1).

-Protocolo para a reação de Nested-PCR

Duas misturas (*mix*), uma para cada par de *primers*, contendo 1X Buffer (Life Technologies, CA, USA), 0,75 mM de MgCl₂ (Life Technologies, CA, USA), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,1 pmol de cada *primer*, 2,5U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Life Technologies, CA, USA) num volume total de reação de 50µL cada, sendo os *primers* DLFEX2 e DLREX2 utilizados no *mix* 1 para

amplificação da região referente ao exon 2 e os *primers* DLFEX3 e DLREX3 utilizados no *mix 2* para amplificar a região referente ao exon 3. 1,0 µl do produto amplificado na primeira *PCR* deve ser adicionado à reação. As condições de ciclagem são 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 70°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

A Tabela 7 apresenta os *primers* utilizados na NESTED-PCR e no sequenciamento do HLA-C.

Tabela 7: Sequência de *primers* utilizados na *Nested-PCR* e sequenciamento do HLA-C.

| Primer | Sequência (5' → 3') | Localização | Posição* | Referência |
|---------------|----------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| DLFEX2 | GAG GGT CGG GCG GGT CTC AG | INTRON 1 | 320-339 | Cereb et al., 1996 |
| DLREX2 | GGG CCG TCC GTG GGG GAT G | INTRON 2 | 706-724 | Cereb et al., 1996 |
| DLFEX3 | GTT TAG GCC AAA ATC CCC GC | INTRON 2 | 918-937 | Cereb et al., 1996 |
| DLREX3 | CTC CCA CTG CCC CTG GTA CC | INTRON 3 | 1313-1332 | Cereb et al., 1996 |

* Posição de acordo com a sequência do MHC de classe I, HLA-C (nº de acesso no *GenBank*: KJ562278.1).

✚ Os produtos amplificados devem ser purificados e sequenciados conforme procedimento descrito para o HLA-A, sendo, no entanto, utilizados os *primers* descritos na Tabela 7.

✚ As sequências obtidas devem ser analisadas com o software *BioEdit* (HALL et al., 1999) com a finalidade de construir uma sequência consenso e, as mesmas, podem ser tipadas utilizando a ferramenta de bioinformática *HLA/Blast* disponível no banco de dados *IMGT/HLA* (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/bblast.html>), no entanto, como citado anteriormente, os resultados devem ser confirmados através da utilização de um *software*.

Observação: Diante dos resultados obtidos após a padronização desta metodologia, foi possível concluir que o sequenciamento das regiões referentes aos exons 2 e 3 e, quando necessário do exon 4, podem ser utilizados para realizar a tipagem do HLA-A, assim como o sequenciamento dos exons 2 e 3 para tipagem dos HLAs B e C. No entanto, ainda é necessária a validação desta metodologia *in house*. Para isso, pretende-se realizar tipagem do HLA (A, B e C) pelo método *in house* de amostras com resultado já conhecido, assegurando desta maneira, a eficiência do método.