

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu

ANA RACHEL OLIVEIRA LÉDA

**Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) em genes
codificadores de citocinas e suas correlações com
parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes
portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção
do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Botucatu, SP
Fevereiro de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Leda, Ana Rachel Oliveira.

Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) em genes codificadores de citocinas e suas correlações com parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes portadores do Vírus da imunodeficiência humana / Ana Rachel Oliveira Leda. – Botuca-tu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Assunto CAPES: 40101096

1. Vírus da imunodeficiência humana
2. HIV (Vírus)

Palavras-chave: Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α); *High resolution melting* (HRM, ou análise de dissociação em alta resolução); Interleucina-4 (IL-4); Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs); Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Dedicatória

Aos meus pais, Antônio e Conceição Léda, pelo amor incondicional e pelo incansável apoio que sempre me deram. Agradeço por terem acreditado e investido nos meus sonhos, junto comigo.

"Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar." (Bertrand Russell)

À minha querida irmã, Rosa Léda Swart, que mesmo longe fisicamente, sempre se faz presente durante minhas realizações e conquistas. Agradeço imensamente pela amizade e cumplicidade. E, aos meus lindos sobrinhos, Pedro e Tomas, por deixarem minha vida mais bonita, mais alegre e mais divertida!

"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família." (Leon Tolstói)

Ao meu namorado e melhor amigo, Luis Gustavo Woigt, pelo amor, carinho e companheirismo a mim dedicados. Obrigada por sempre estar ao meu lado e por acreditar veementemente no meu sucesso profissional.

"Duvides que as estrelas sejam fogo, duvides que o sol se mova, duvides que a verdade seja mentira, mas não duvides jamais de que te amo."
(William Shakespeare)

Agradecimentos Especiais

Ao meu inestimável orientador, Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, pela sua dedicação e empenho na execução deste trabalho e por sempre ter investido no meu crescimento científico. Tenho como exemplo sua competência e perseverança com as quais faz ciência.

“O professor medíocre expõe. O bom professor explica. O ótimo professor demonstra. O grande professor inspira.”
(William Arthur Ward)

Agradecimientos

À Janete, minha segunda mãe, pelo carinho e cuidado a mim dedicados por mais de duas décadas.

À Bianca (Vomet's), minha grande amiga desde os tempos de graduação, agradeço seu companheirismo, cumplicidade e, acima de tudo, sua amizade valiosa. Amo você!

Às amigas do Laboratório de Patologia Molecular: Carolina, Leila, Olívia e Suzane, pela troca de conhecimentos essencial para a execução deste trabalho. Em especial, à Ana Paula pela grande amizade e por estar sempre disposta a me ajudar, desde os tempos de iniciação científica.

Às preciosas amigas Alice (Desdém) e Natália (Disincãna), com quem aprendi muito e que sempre acreditaram no meu potencial e vibraram com as minhas conquistas. Sinto muito a falta de vocês!

Ao meu casal querido, Layla (Nóistudo) e Henrique (Kussujo) pelo carinho, conversas e por fazerem as idas à Limeira mais divertidas. Adoro vocês!

Aos amigos de longa data: Andréa, Cassia, Fernando, Isabella e Leonardo, que estiveram presentes nos momentos mais felizes da minha vida e que também me apoiaram nos momentos mais difíceis. Vocês são fundamentais na minha vida!

Aos técnicos do Laboratório de Imuno-histoquímica, Celene, Cristina, Fernando e Marcos, por me proporcionarem dias de trabalho alegres e divertidos!

Às amigas do TOXICAM, Ana Paula (E.Coli), Carla e Viviane, pelos momentos de descontração e pela inesquecível amizade.

"Sem amigos ninguém escolheria viver, mesmo que tivesse todos os outros bens." (Aristóteles)

Ao Dr. Rafael Dezen Gaiolla, pela grande ajuda e ensinamentos em experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia, nas pessoas de Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva e Vânia do Amaral Soler, por conduzirem o Programa de maneira brilhante e pelos auxílios a mim concedidos.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, nas pessoas de Prof^a. Dr^a. Liciane Vaz de Arruda Silveira e Hélio Rubens de Carvalho Nunes e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla e Prof^a. Dr^a. Alexandrina Sartori, do Instituto de Biociências de Botucatu, por terem contribuído para a melhoria deste trabalho durante o Exame Geral de Qualificação.

Aos colaboradores deste trabalho: Dr. Alexandre Naime Barbosa, Dr^a. Carolyne Chaves, Prof. Dr. Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida, Prof^a. Dr^a. Lenice do Rosário de Souza e Prof. Dr. Domingos Alves Meira, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível. Assim como as enfermeiras do Hospital Dia HIV/Aids, Carina Alves de Oliveira e Luciene Ferreira Daltin, responsáveis pela coleta das amostras de sangue dos pacientes avaliados neste estudo.

Ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, pela oportunidade oferecida em ministrar aulas para os cursos de graduação em Medicina e Biomedicina.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo e aos voluntários que doaram amostras de sangue utilizadas para testes, minha eterna gratidão.

Às agências de fomento: CAPES, pela bolsa de Mestrado; e FAPESP (AP 2006/03643-6) pelo auxílio parcial para realização deste trabalho.

Índice

**Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) em genes
codificadores de citocinas e suas correlações com parâmetros
clínicos e laboratoriais de pacientes portadores do
Vírus da Imunodeficiência Humana**

Índice

1	RESUMO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida.....	19
2.2	Vírus da imunodeficiência humana	22
2.3	Citocinas e modulação da resposta imunitária.....	27
2.4	Polimorfismos gênicos, citocinas e infecção pelo HIV	30
2.5	Referências bibliográficas	36
3	MANUSCRITO.....	49
3.1	Abstract.....	50
3.2	Introduction	51
3.3	Subjects and Methods.....	53
3.3.1	<i>Patients</i>	53
3.3.2	<i>DNA extraction</i>	53
3.3.3	<i>SNPs genotyping by High Resolution Melting analysis</i>	54
3.3.4	<i>Statistical analysis</i>	56
3.4	Results	57
3.4.1	<i>Casuistic description</i>	57
3.4.2	<i>IL-4 SNPs</i>	58
3.4.3	<i>TNF-α SNPs</i>	61

3.5	Discussion.....	63
3.6	Acknowledgements.....	68
3.7	Conflict of interest	68
3.8	References.....	69
4	ANEXOS.....	76
4.1	Dados gerais dos pacientes portadores do HIV incluídos no estudo.	76
4.2	Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB – UNESP, Botucatu.....	82

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABLE 1 – qPCR conditions and cycling pattern used to amplify SNPs/pIL-4 at positions -589 and -1098, and SNPs/pTNF- α at positions -238 and -862.....	55
TABLE 2 – Oligonucleotide sequences used to detect SNPs/pIL-4 at positions -589 and -1098 and SNPs/pTNF- α at positions -238 e -862 using qPCR-HRM.....	55
TABLE 3 – Association between the SNP/pIL-4 -589 genotypes and the estimated time of HIV infection for the evaluated patients.....	60
FIGURA 1 – qPCR-HRM-based genotyping of the SNP -589 and -1098 in the IL-4 gene promoter (SNP/pIL-4 -589 and SNP/pIL-4 -1098, respectively), and SNP -238 and -862 in the TNF- α gene promoter (SNP/pTNF- α -238 and SNP/pTNF- α -862, respectively). A) Amplification plot; B) Conventional melting analysis; C) High Resolution Melting Analysis (HRM). For SNP/pTNF- α -238 and SNP/pTNF- α -862, the homozygous genotypes AA were not found by qPCR-HRM either among reference or test samples.....	58
FIGURE 2 – Association between SNP/pIL-4 -589 and T CD ₄ ⁺ and T CD ₈ ⁺ cells counts among HIV-infected patients. Data were not available for 8 patients (n=149). Error bars represent standard deviation. *p=0.0156 (LS Means).....	59
FIGURE 3 – SNP/pIL-4 -1098 and T CD ₄ ⁺ and T CD ₈ ⁺ cells count among HIV-infected patients. Data was not available for 8 patients (n=149). Error bars represent standard deviation. *p=0.0053 (LS Means).....	61
FIGURE 4 – Association between SNP/pTNF- α -238 and response to anti-retroviral therapy for the HIV-infected patients evaluated. *p=0.0205 (Fisher's exact test).....	62

PRINCIPAIS SIGLAS UTILIZADAS

+ssRNA: *positive sense single-strand RNA* – RNA fita simples de polaridade positiva

Aids: *Acquired Immunodeficiency Syndrome* - síndrome de imunodeficiência adquirida

BCSF-1: *B-Cell Stimulatory Factor-1* - fator estimulador de linfócitos B-1

CCR2: receptor de quimiocina da família CC - 2

CCR2-V64I: substituição de uma valina por uma isoleucina no códon 64 do gene codificador de CCR2

CCR5: receptor de quimiocina da família CC - 5

CCR5-Δ32: deleção de 32 pares de bases no gene codificador de CCR5

CD₄: *Cluster of Differentiation* - 4 – grupamento de diferenciação - 4

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA, EUA

CXCR4: receptor de quimiocina da família CXC - 4

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* – ácido desoxirribonucleico

dsDNA: *Double-Strand DNA* – DNA de fita dupla

EBV: *Epstein-Barr Virus* – vírus de Epstein-Barr

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* – ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA: Estados Unidos da América

GRID: *Gay-Related Immune Deficiency* – deficiência imunitária relacionada a homossexuais

HAART: *Highly Active Anti-Retroviral Therapy* – terapia antirretroviral potente combinada

HBV: *Hepatitis B Virus* – vírus da hepatite B

HCV: *Hepatitis C Virus* – vírus da hepatite C

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* – vírus da imunodeficiência humana

HPV: *Human Papillomavirus* – vírus do papiloma humano

HRM: *High Resolution Melting* – dissociação em alta resolução

IFN-γ: interferon-gama

IgE: imunoglobulina E

IL-1, -2, -4, -5, -6, -10, -12, -13: interleucina-1, -2, -4, -5, -6, -10, -12, -13

KSHV/HHV-8: *Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus/Human Herpesvirus type 8* – herpesvírus humano associado ao sarcoma de Kaposi/herpesvírus humano tipo 8

LNH: linfomas não-Hodgkin

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa-B* – fator de transcrição *kappa-B*

NSI: *Non-Syncytia-Inducing* – não indutor de sincício

ONU: Organização das Nações Unidas

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells* – células mononucleares de sangue periférico

PCR: *Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase

qPCR: PCR em tempo real

RNA: *Ribonucleic acid* – ácido ribonucléico

SDF-1: *Stromal Cell-Derived Factor-1* – fator derivado de células estromais-1

SI: *Syncytia-inducing* – indutor de sincício

SK: sarcoma de Kaposi

SNPs: *Single nucleotide polymorphisms* – polimorfismos de nucleotídeo simples

TGF- β : *Transforming Growth Factor-Beta* – fator de transformação do crescimento-beta

T_H: *T Helper cells* – linfócitos T auxiliares

TNF- α : *Tumor Necrosis factor-alpha* – fator de necrose tumoral-alfa

UDIs: Usuários de Drogas Intravenosas

UNAIDS: *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* – Programa de monitoramento da aids da ONU

Resumo

1 Resumo

A história natural de infecção pelo HIV e a progressão para a aids podem variar entre diferentes indivíduos, possivelmente devido a fatores genéticos, entre eles os polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs). SNPs localizados em regiões promotoras de genes que codificam citocinas podem afetar a síntese e a regulação dessas moléculas, resultando em alterações nas respostas imunitárias. O presente estudo buscou avaliar as frequências e os possíveis efeitos de SNPs nas posições -589 e -1098 da região promotora do gene da IL-4 e SNPs nas posições -238 e -862 da região promotora do gene do TNF- α em pacientes portadores do HIV. Amostras de DNA de 157 pacientes foram obtidas através de células mononucleares de sangue periférico e a genotipagem dos SNPs foi realizada pela técnica de *High Resolution Melting* (HRM). Foi observado que pacientes portadores de *TT* em SNP/pIL-4 -589 apresentaram contagem de linfócitos T CD₈⁺ menor em relação aos portadores de *CC* ($p=0.0104$). Além disso, portadores de *TT* em SNP/pIL-4 -1098 apresentaram contagem de linfócitos T CD₈⁺ maior em comparação aos portadores de *GT* ($p=0.0053$). Em relação a SNP/pTNF- α -238, as proporções de pacientes portadores de *GG* e *GA* diferiu entre os pacientes sem HAART e pacientes com HAART e sem falha terapêutica ($p=0.0205$). Assim, os resultados obtidos no presente estudo fortalecem a hipótese de que SNPs em genes de citocinas podem alterar a história natural da infecção pelo HIV e o curso clínico da doença, principalmente devido a alterações no balanço da produção de citocinas pro- e antiinflamatórias.

Revisão da Literatura

2 Revisão da Literatura

2.1 Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

Os primeiros casos da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome – Aids*) foram relatados em 1981 nos Estados Unidos da América (EUA), em homens homossexuais de Los Angeles que desenvolveram pneumonia causada pelo fungo *Pneumocystis jirovecii*¹. Em poucos meses, novos casos foram relatados em outras cidades dos EUA² e entre haitianos residentes desse país³. Durante os primeiros anos da pandemia de aids, a doença era predominantemente encontrada em homossexuais masculinos e usuários de drogas intravenosas (UDIs) que compartilhavam seringas e agulhas contaminadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency virus – HIV*). Em pouco tempo outros grupos populacionais sob maior risco de contágio pelo HIV foram descritos, incluindo haitianos, africanos, indivíduos que receberam hemoderivados contaminados pelo HIV e indivíduos presos. Em 1982, o termo Deficiência Imunitária Relacionada a Homossexuais (*Gay-Related Immune Deficiency - GRID*), empregado para discriminar indivíduos infectados pelo HIV que desenvolveram imunocomprometimento, caiu em desuso e foi substituído pelo termo aids⁴.

Atualmente, a infecção pelo HIV e a aids estão entre as principais causas de morte no mundo e a principal no continente africano. Estima-se que 25 milhões de pessoas morreram direta ou indiretamente em decorrência da infecção pelo vírus desde o início da pandemia. Segundo dados do Programa de Monitoramento da Aids (UNAIDS) da Organização das Nações Unidas (ONU), a

epidemia de aids vem se tornando estável na maioria das regiões do mundo. No entanto, no Leste Europeu e na Ásia Central a prevalência de infecção pelo HIV continua aumentando devido ao grande número de novas infecções a cada ano. Cerca de 33,4 milhões de pessoas eram portadores do HIV em 2008, dentre as quais aproximadamente 67% viviam na África. Durante esse ano foram registradas 2,7 milhões de novas infecções pelo HIV, a maioria em jovens, entre 15 e 24 anos de idade. Apesar da notável queda na mortalidade relacionada ao HIV/Aids nos últimos dez anos (em decorrência do maior acesso ao tratamento antirretroviral), 2,0 milhões de mortes ocorreram em 2008, sendo cerca de 75% apenas no continente africano. As mulheres correspondem à metade dos casos de infecção pelo HIV em todo o mundo, com exceção na África Sub-Saariana, onde representam 60% dos infectados. Adicionalmente, foi relatado que 430 mil crianças com menos de 15 anos foram infectadas pelo vírus em 2008, e estima-se que 2,1 milhões de crianças viviam infectadas pelo HIV, 90% das quais no continente africano ^{5, 6}.

O primeiro caso de aids no Brasil também foi relatado no início da década de 1980. As maiores taxas de infecção pelo HIV são observadas em áreas densamente povoadas, notadamente as regiões metropolitanas de São Paulo e do Rio de Janeiro ⁷. Segundo dados do “Boletim Epidemiológico – Aids”, mais de 500 mil casos da doença foram registrados desde o início da década de 1980, sendo que cerca de 200 mil pessoas morreram em virtude da infecção pelo HIV no mesmo período. Aproximadamente 67% dessas mortes ocorreram apenas na região Sudeste do país ⁸. Em 2008, cerca de 34 mil novos casos de aids e 11 mil mortes causadas direta ou indiretamente pela infecção viral foram notificados ao

governo federal ⁹. Historicamente, o pico no número de novos casos de infecção pelo HIV no país ocorreu entre 1996 e 1997. Em seguida, observou-se uma diminuição na incidência da doença em virtude de medidas estabelecidas pelo Ministério da Saúde, incluindo campanhas para o uso de preservativos masculinos e femininos durante as relações sexuais, programa de controle da infecção vertical e maior rigor na triagem de doadores de sangue e de leite. Outra medida efetiva na diminuição de novos casos de infecção pelo HIV foi a implementação do acesso universal e gratuito à terapia antirretroviral para os portadores do vírus ⁷, sendo o Brasil pioneiro em adotar essa política ⁵.

O HIV pode ser transmitido por diferentes fluídos e secreções orgânicas contaminadas, notadamente sangue, sêmen e leite materno. A infecção pode ocorrer durante o ato sexual desprotegido (por meio da mucosa oral, retal ou vaginal), na vida intra-uterina, durante o parto ou na amamentação, ou por inoculação intravascular (e.g., nos casos de transfusão de sangue ou hemoderivados e compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas por UDIs) ¹⁰. Embora os primeiros casos de infecção fossem relatados predominantemente na população de homossexuais masculinos, atualmente a população heterossexual é a mais frequentemente atingida, com especial destaque para mulheres jovens ⁵, que apresentam risco superior ao de homens de serem contaminadas pelo vírus ¹¹. Em regiões que apresentam taxas alarmantes de novos casos de infecção pelo HIV (e.g. África Subsaariana, Sudoeste Asiático e Caribe) pode-se considerar que há uma epidemia horizontal em adultos, na qual o vírus é transmitido via contato sexual ou pelo

compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas; e uma epidemia vertical, na qual mulheres grávidas infectadas transmitem o HIV para os seus filhos ⁴.

A progressão da doença no indivíduo infectado pelo HIV depende de diferentes fatores, incluindo grau de virulência do vírus, constituição genética e resposta imunitária do hospedeiro. Em média, o período entre a infecção primária pelo HIV e o desenvolvimento da aids é de 8 a 10 anos. No entanto, uma pequena parcela dos pacientes infectados não progride para a aids durante um longo período. Esses indivíduos são assintomáticos na ausência de tratamento antirretroviral e apresentam contagem de linfócitos T CD₄⁺ normal e carga viral do HIV baixa ou indetectável. Essa resistência ao desenvolvimento da aids já foi documentada em homens homossexuais, mulheres, UDIs e crianças. Outro tipo de resistência natural se manifesta em indivíduos que não são infectados, a despeito de serem repetidamente expostos ao HIV. Tal resistência já foi relatada em profissionais do sexo, indivíduos que realizam práticas sexuais desprotegidas com parceiros soropositivos, crianças de mães infectadas pelo HIV durante ou previamente à gestação, profissionais da saúde expostos acidentalmente ao vírus, UDIs que compartilharam agulhas e seringas contaminadas e hemofílicos expostos a sangue contaminado ^{12, 13}.

2.2 Vírus da imunodeficiência humana

O HIV é um retrovírus da subfamília *Lentivirinae* originalmente identificado por pesquisadores na França ¹⁴ e nos EUA ¹⁵, liderados pelos cientistas Luc Montagnier e Robert Gallo, respectivamente. Até o momento, dois tipos de HIV foram descritos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é o responsável pela maioria dos casos

de aids no mundo e está subdividido em três grupos principais: M, N e O ¹⁶. A infecção pelo HIV-2 é mais rara e ocasiona doença equivalente à do HIV-1, embora de progressão mais lenta. É encontrado predominantemente na região oeste da África e é considerado menos eficiente na transmissão, em relação ao HIV-1. Adicionalmente, a infecção pelo HIV-2 raramente é associada à transmissão vertical ¹⁷.

O HIV exibe tropismo por diferentes tipos celulares, notadamente linfócitos T auxiliares, monócitos, macrófagos e células dendríticas. A infecção de linfócitos T ativados pelo HIV permite replicação rápida e eficiente do vírus, culminando em efeitos citopáticos. Os macrófagos são considerados importantes reservatórios da infecção e as células dendríticas são responsáveis por transportar o HIV das regiões de mucosa aos linfonodos ^{18, 19}.

O vírus se utiliza de moléculas expressas na superfície das células-alvo para iniciar sua infecção, notadamente o receptor CD₄ e co-receptores para quimiocinas, como as moléculas CCR5 e CXCR4. A ligação da glicoproteína viral gp120 ao domínio extracelular da molécula CD₄ gera alterações conformacionais na proteína viral gp41, permitindo a fusão do envelope viral com a membrana celular. Essa fusão permite que o material genético do HIV entre no citoplasma e ocorra seu processamento para formação do pró-vírus. Mais de 95% das novas infecções pelo HIV são ocasionadas por linhagens com afinidade por CCR5, expresso em macrófagos. Por esse motivo essas linhagens são denominadas M-trópicas, ou R5 ¹⁰.

Uma menor parcela apresenta afinidade por CXCR4, expresso em linfócitos T. Por isso são linhagens denominadas T-trópicas, ou X4, que usualmente aparecem mais tarde no curso da doença ¹⁰. Essas linhagens, também denominadas de indutoras de sincício (*Syncytia-inducing* - SI), estão associadas a uma alta taxa de replicação viral, rápida depleção de linfócitos T CD₄⁺ e progressão mais rápida para aids. As linhagens M-trópicas, ou não indutoras de sincício (*Non-syncytia-inducing* - NSI), por outro lado, se replicam de maneira mais lenta, são mais facilmente transmitidas e não estão associadas a progressão rápida da doença. Assim, as linhagens T-trópicas são mais frequentemente encontradas em pacientes sintomáticos para aids, enquanto que as linhagens M-trópicas predominam em pacientes recém infectados pelo HIV ou que apresentam infecção aguda ²⁰. Uma mudança no padrão de infecção pelo HIV de linhagens NSI para linhagens SI é vista em aproximadamente 50% dos pacientes infectados ²¹.

O genoma do HIV-1 é constituído de duas fitas simples de RNA linear com polaridade positiva (+ssRNA) que são envoltas pelo capsídeo e, mais externamente, pelo envelope viral, constituído por uma bicamada lipídica derivada da membrana da célula hospedeira. O genoma do HIV é composto de três regiões codificadoras comuns aos retrovírus: *gag* (codifica proteínas do capsídeo), *pol* (codifica enzimas virais - integrase, protease e transcriptase reversa) e *env* (codifica glicoproteínas do envelope viral). Genes adicionais presentes no genoma do HIV incluem: *tat* e *rev*, reguladores da expressão dos genes virais; *nef* e *vpu*, que interagem com genes da célula hospedeira; *vif* e *vpr*, que codificam proteínas acessórias relacionadas à infectividade e ao ciclo celular, respectivamente ²².

No citoplasma da célula infectada, o genoma viral sofre transcrição reversa, dando origem ao DNA pró-viral ou pró-vírus. Por meio da atividade da integrase, o pró-vírus é integrado ao genoma da célula hospedeira, onde usufrui da maquinaria de transcrição celular para expressão do material genético viral. O RNA do HIV incorporado ao genoma da célula originará o RNA genômico, que será incluído nas novas partículas virais; e o RNA mensageiro, empregado na síntese das proteínas virais¹⁰. Assim, a atividade do pró-vírus e, conseqüentemente, a produção de novas partículas virais, são influenciadas pelo metabolismo e ativação da célula hospedeira. Digno de nota, o HIV se integra preferencialmente em genes celulares ativos¹⁸.

A transcriptase reversa retroviral apresenta baixa fidelidade na incorporação de nucleotídeos, ocasionando erros na síntese do DNA pró-viral do HIV. Desse modo, variantes mutadas do vírus são frequentemente geradas no organismo do hospedeiro. Apesar de algumas mutações gerarem partículas virais inviáveis, outras podem colaborar para a disseminação retroviral, escape da resposta imunitária do hospedeiro e emergência de variantes do HIV resistentes às drogas da terapia antirretroviral²⁰.

A primeira exposição de um organismo sadio ao HIV causa intensa ativação imunitária, caracterizada por ativação de linfócitos B, elevada produção de imunoglobulinas e algumas citocinas, ativação de linfócitos T_{H1} e estimulação de respostas citotóxicas mediadas por linfócitos T e células matadoras naturais (*Natural Killers*)¹⁰. Durante essa fase inicial da doença, o indivíduo apresenta sintomas não específicos, característicos da síndrome de infecção retroviral aguda, e apresentam elevada viremia e baixa contagem de linfócitos T CD₄⁺²⁰.

Embora os fenômenos imunológicos mencionados possibilitem uma diminuição significativa da viremia do paciente recém-infectado, o organismo não é capaz de eliminar completamente o vírus. Isso decorre de diferentes fatores, incluindo infecção de células-reservatório (menos suscetíveis aos efeitos citopáticos do vírus) e surgimento de variantes do HIV que conseguem modular e subverter a resposta imunitária²³. O HIV sofre então redistribuição nos tecidos linfóides do hospedeiro, nos quais se replica ativamente, destruindo as células infectadas (notadamente o linfócito T CD₄⁺) e ocasionando distúrbios sistêmicos da resposta imunitária durante um período variável, usualmente mais de uma década. Na fase assintomática da doença há um relativo equilíbrio entre a produção de novas partículas virais e a depleção dos linfócitos T CD₄⁺. Entretanto, essa resposta se deteriora progressiva e inexoravelmente, favorecendo o HIV. Em seus estágios mais tardios, o imunocomprometimento e a desregulação imunitária desencadeada pela morte dos linfócitos T CD₄⁺ culminam na aids propriamente dita^{10, 20}.

Na aids, o colapso do sistema imunitário possibilita um aumento na susceptibilidade a infecções oportunistas (e.g., infecção por *Pneumocystis jirovecii*, infecção por coccídios intestinais, etc.)²⁰ e risco aumentado para o desenvolvimento de algumas neoplasias malignas, notadamente o carcinoma de colo uterino, linfomas não-Hodgkin (LNH) e o sarcoma de Kaposi (SK), principalmente. É importante notar que parcela significativa dos cânceres que se desenvolvem em pacientes portadores do HIV tem a participação de vírus oncogênicos em sua etiopatogenia, notadamente o vírus do papiloma humano (*Human Papillomavirus* – HPV), o vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* - EBV)

e o herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus* - KSHV), também denominado herpesvírus humano tipo 8 (*Human Herpesvirus type 8* – HHV-8) ^{24, 25}.

Em certa medida, a predisposição do portador do HIV ao desenvolvimento de novas infecções e determinadas neoplasias malignas está relacionada a fatores constitutivos. Nesse sentido, é importante salientar que fatores genéticos podem modificar a eficiência do sistema imunitário. Digno de nota, mudanças nos níveis de certas citocinas são simultaneamente causa e efeito do comprometimento no sistema imunitário ocasionado pelo HIV no organismo hospedeiro.

2.3 Citocinas e modulação da resposta imunitária

As citocinas pertencem a uma família de proteínas solúveis de baixo peso molecular envolvidas na regulação das atividades celulares, notadamente aquelas relacionadas às respostas imunitárias e inflamatórias. São produzidas por vários tipos celulares, principalmente linfócitos e macrófagos ativados, e sua síntese é deflagrada por estímulos inflamatórios e/ou antigênicos. Usualmente as citocinas atuam por mecanismos parácrinos e/ou autócrinos, pela ligação a receptores de alta afinidade nas células-alvo. Algumas citocinas, entretanto, podem ser produzidas em quantidades suficientes para exercerem atividade endócrina ²⁶.

Citocinas que medeiam a imunidade inata são produzidas principalmente pelos macrófagos ativados e incluem TNFs, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e as quimiocinas. Por outro lado, as que medeiam a imunidade adquirida são produzidas principalmente por linfócitos T ativados e incluem IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ

e TGF- β . Além de atuarem como mensageiros, as citocinas atuam como fatores de crescimento para diversos tipos celulares e podem desempenhar papel direto na defesa do organismo. Os interferons liberados localmente, por exemplo, ativam as células adjacentes a uma célula infectada por vírus, propiciando um estado natural de resistência à infecção de novas células ²⁷. Saliente-se ainda que o emprego de citocinas e seus antagonistas constituem estratégia terapêutica essencial para o controle de determinadas doenças, como as hepatites virais ²⁸.

Em resposta aos antígenos protéicos dos microrganismos, os linfócitos T auxiliares (*T helpers* – T_H) CD₄⁺ podem se diferenciar em subpopulações que apresentam padrões distintos de síntese de citocinas. O padrão de síntese denominado T_{H1} é estimulado na infecção por bactérias intracelulares e vírus, situações melhor controladas pela resposta imunitária celular, com ativação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos. Por outro lado, o padrão T_{H2} ocorre em resposta a helmintos e alérgenos que ocasionam estimulação crônica dos linfócitos T e produção de anticorpos pelos linfócitos B. Em outras palavras, citocinas do padrão T_{H1} (e.g., IL-2 e IFN- γ) favorecem principalmente a defesa contra infecções por microrganismos intracelulares e a eliminação de células transformadas, enquanto as do padrão T_{H2} (e.g., IL-4, -5, -6 e -10) estão particularmente envolvidas na imunidade humoral e nas reações mediadas por IgE ²⁷.

A IL-4, originalmente denominada fator estimulador de linfócitos B-1 (*B-cell stimulatory factor-1* – BCSF-1), pertence à família de citocinas em α -hélice e é sintetizada principalmente por linfócitos T_{H2}, mastócitos, basófilos e eosinófilos. A IL-4 tem papel importante na determinação do padrão de resposta imunitária que

o organismo desenvolverá. Essa citocina é responsável pela proliferação e diferenciação de linfócitos T auxiliares CD_4^+ em linfócitos T_{H2} , em detrimento da diferenciação em linfócitos T_{H1} . Adicionalmente, estimula a proliferação e diferenciação de linfócitos B e é o principal estímulo para a produção de anticorpos IgE por essas células. A IL-4 também estimula a proliferação de mastócitos e inibe a proliferação de macrófagos ²⁹.

Diversos estudos reportaram uma elevada produção de IL-4 em pacientes portadores do HIV. Em trabalho publicado por Valentin e colaboradores, essa citocina foi associada a um aumento na replicação de linhagens SI e inibição da replicação de linhagens NSI em linfócitos. Em macrófagos, por outro lado, a IL-4 foi capaz de estimular a replicação de ambas as linhagens. Os autores observaram ainda uma diminuição na expressão de CCR5 na presença da citocina em linfócitos primários, diminuição vista mais proeminente em células positivas para CD_4 . Digno de nota, não foi observado efeito semelhante para outras citocinas do padrão T_{H2} , como IL-5, IL-10 e IL-13. Assim, os autores sugeriram que esses efeitos sejam particulares da IL-4 e concluíram que essa citocina tem papel importante no aparecimento e na manutenção das linhagens X4 do HIV e, conseqüentemente, na patogênese da aids ³⁰. Estudos com modelos *in vitro* ^{31, 32} e *in vivo* ³³ têm suportado essa hipótese.

O Fator de Necrose Tumoral α (*Tumor necrosis factor alpha* – *TNF- α*) foi primeiramente descrito como uma glicoproteína induzida por endotoxina, capaz de causar necrose hemorrágica em tumores ³⁴. É uma citocina pró-inflamatória e angiogênica, que exerce papel importante nas doenças inflamatórias e infecciosas, notadamente nas infecções virais. Sua síntese é feita por

macrófagos, células NK, linfócitos T, linfócitos B e mastócitos³⁵. Nos macrófagos, a produção de TNF- α é estimulada por diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias e parasitas; e, também, por citocinas, como a IL-1, IL-12, IFN- γ . Por outro lado, citocinas como a IL-4, IL-10 e TGF- β inibem a produção de TNF- α nessas células³⁶. A produção crônica de TNF- α atenua as vias de sinalização de receptores para antígenos de linfócitos T, diminuindo as funções dos linfócitos T_{H1} e T_{H2}³⁷.

Em pacientes saudáveis, o TNF- α é usualmente indetectável, mas elevados níveis séricos são detectados em pacientes com doenças inflamatórias ou infecciosas³⁸. Em indivíduos infectados pelo HIV, por exemplo, níveis elevados de TNF- α são observados em todos os estágios da doença, notadamente na vigência de outras infecções concomitantes³⁹. O TNF- α é capaz de inibir a entrada do HIV nos macrófagos, mas não em linfócitos de sangue periférico⁴⁰. Adicionalmente, proporciona diminuição da expressão de receptores CD₄ e de CCR5 na superfície celular e estimula a apoptose de linfócitos T CD₄⁺ e T CD₈⁺³⁶,⁴¹. Por outro lado, a produção TNF- α estimula a replicação do HIV nas células infectadas cronicamente, por meio da ativação da via do NF- κ B^{42, 43}.

2.4 Polimorfismos gênicos, citocinas e infecção pelo HIV

A susceptibilidade de infecção pelo HIV e a progressão para a aids dependem da eficácia da resposta imunitária do indivíduo infectado. No entanto, a resposta imunitária durante a infecção pode variar consideravelmente entre os indivíduos portadores do vírus, devido a diferentes fatores, incluindo os constitucionais, como os fatores genéticos.

Polimorfismos de nucleotídeo simples (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) são alterações genômicas, nas quais apenas uma base nitrogenada está alterada. São consideradas as alterações mais comuns do genoma, ocorrendo a cada 1.000 a 1.200 pares de bases, aproximadamente. No entanto, menos de 1% dos SNPs pode ocasionar alteração do produto gênico. Acredita-se que esses polimorfismos sejam resultado da replicação imprecisa do DNA; entretanto, sua maior estabilidade em relação a outras sequências variantes os torna menos susceptíveis a uma segunda mutação^{44, 45}. SNPs podem ser encontrados em éxons, íntrons e sequências regulatórias do genoma. Devido a sua localização, não é incomum que alguns SNPs sejam co-herdados com um gene relacionado a uma doença específica. Nos casos em que um SNP está em equilíbrio de ligação com um determinado elemento genético participante da patogênese de uma dada doença, sua detecção pode ser utilizada como marcador de diagnóstico ou prognóstico para a mesma⁴⁶.

Embora alguns SNPs sejam funcionais e alterem o produto gênico de maneira quantitativa ou qualitativa, a maioria deles não tem efeito biológico. Dentre os diversos tipos de SNPs estão aqueles ocorrendo em regiões promotoras, que afetam a regulação e expressão protéica; SNPs não-sinônimos, capazes de gerar uma proteína com alterações na sequência de aminoácidos; e SNPs em sítios de *splicing*, que geram proteínas diferentes⁴⁷.

Muitos polimorfismos vêm sendo detectados em sequências de genes codificadores de citocinas, principalmente na região promotora. A presença de determinados SNPs pode influenciar a susceptibilidade ao desenvolvimento ou o prognóstico de algumas doenças imunitárias, infecciosas e até mesmo

neoplásicas. Já foi relatada a associação entre o lúpus eritematoso sistêmico ⁴⁸, a lepra ⁴⁹, a tuberculose ⁵⁰, diferentes formas de cânceres ⁵¹ e determinados polimorfismos na região promotora do gene da IL-10. Em relação à SNPs na região promotora do gene da IL-6, já foram documentadas associações entre a artrite crônica juvenil ⁵², resistência a insulina ⁵³ e a elevado risco de desenvolver doenças cardiovasculares em mulheres brasileiras ⁵⁴. Polimorfismos no gene da IL-1 já foram associados ao adenocarcinoma gástrico subsequente à infecção por *Helicobacter pylori* ⁵⁵. Adicionalmente, um SNP no gene codificador de TGF- β contribuiu para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em chineses com infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) ⁵⁶.

No contexto de infecção pelo HIV, polimorfismos apresentam papel importante na caracterização de alguns poucos indivíduos capazes de resistirem à infecção viral e a progressão da aids. Um importante polimorfismo associado à infecção pelo HIV é a deleção de 32 pares de bases no gene codificador de CCR5 (CCR5- Δ 32). Esse polimorfismo apresenta elevada incidência na região norte da Europa e está ausente em indivíduos africanos ou asiáticos do Leste. Homozigose para CCR5- Δ 32 resulta em atividade não funcional do co-receptor, culminando em resistência à infecção pelas linhagens R5 do HIV. O polimorfismo no gene codificador do co-receptor de linhagens M-trópicas CCR2, no qual uma valina é substituída por uma isoleucina no códon 64 (CCR2-V64I), também tem grande importância na infecção pelo HIV. Resistência para transmissão sexual do vírus já foi associada a indivíduos homozigotos para CCR2-V64I e um atraso na progressão da aids foi associada a indivíduos homozigotos e heterozigotos. Uma mutação no gene codificador do fator derivado de células estromais (*Stromal Cell-*

Derived Factor - SDF-1), o principal ligante de CXCR4, foi associada a um atraso na progressão da aids em pacientes homocigotos^{13, 57}. Em relação a polimorfismos em genes de citocinas, já foi descrito importante associação entre SNP na região promotora do gene da IL-10 na posição -592 e progressão acelerada para aids em pacientes homocigotos para o alelo A⁵⁸. Adicionalmente, um SNP na região promotora do gene da IL-6 foi associado a uma baixa contagem de linfócitos T CD₄⁺ em indivíduos portadores do HIV sob tratamento antirretroviral⁵⁹.

A presença de SNPs na região promotora do gene codificador da IL-4 já foi associada a diversas doenças, entre elas a bronquite asmática⁶⁰, a artrite reumatoide⁶¹, o carcinoma renal⁶² e o câncer colo-retal⁶³. Rosenwasser e colaboradores associaram a presença do SNP na posição -589 da região promotora do gene codificador da IL-4 (SNP/pIL-4 -589; rs2243250) a um aumento da atividade do promotor, levando a um aumento da transcrição gênica, e a elevados níveis séricos de IgE em famílias de asmáticos⁶⁴. No entanto, a associação desse SNP a um aumento nos níveis séricos de IgE não foi reproduzida em outro estudo⁶⁵. Em relação ao SNP na posição -1098 (SNP/pIL-4 -1098; rs2243248), até o presente momento não foi relatada associação entre a presença desse polimorfismo e alterações nos níveis séricos de IL-4. No entanto, foi relatada associação protetora significativa entre a presença do alelo G e o desenvolvimento de artrite idiopática juvenil⁶⁶ e, mais recentemente, forte associação entre a presença do alelo T e o desenvolvimento de artrite reumatoide⁶⁷.

No contexto de infecção pelo HIV, foi relatada associação entre a presença do alelo -589T no gene da IL-4 e emergência de variantes X4 do vírus, síntese elevada de IgE e efeito protetor quanto à progressão para aids ^{68, 69}. Entretanto, esses resultados não foram confirmados em outros estudos avaliando homens homossexuais ⁷⁰, crianças ⁷¹ e indianos ⁷² portadores do HIV. Em relação ao SNP na posição -1098 do gene da IL-4, até o momento não há dados na literatura sobre os possíveis efeitos de seus alelos em pacientes portadores do HIV.

Em relação a outros genes de citocinas, o gene codificador do TNF- α é altamente polimórfico. De fato, diversos polimorfismos na sua sequência promotora já foram descritos, incluindo SNPs nas posições -1031 T/C (rs1799964), -862 C/A (rs1800630), -857 C/T (rs1799724), -308 G/A (rs1800629), e -238 G/A (rs361525) ⁷³. O polimorfismo na posição -862 (SNP/pTNF- α -862) já foi associado a alterações transcricionais no gene codificador de TNF- α , conferindo aos portadores do alelo A menores níveis séricos da citocina ⁷⁴. Adicionalmente, o polimorfismo na posição -238 (SNP/pTNF- α -238) foi associado a uma diminuição na atividade do promotor, resultando em menor produção de TNF- α nos indivíduos portadores do alelo A ⁷⁵. SNPs na região promotora do gene do TNF- α estão associados a diversas doenças imunitárias, infecciosas e neoplásicas ^{73, 76} incluindo a doença de Alzheimer ⁷⁷, a artrite reumatoide ⁷⁸, o lúpus eritematoso sistêmico ⁷⁹, a fibrose hepática em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) ⁸⁰ e o câncer cervical ⁸¹.

Em relação à infecção pelo HIV, Maher e colaboradores (2002) relataram que o alelo -238A esteve presente mais frequentemente nos portadores do HIV que desenvolveram lipodistrofia, em relação aos pacientes portadores do HIV que não desenvolveram a doença. Assim, a presença de -238A foi considerado um fator de risco para o desenvolvimento da síndrome ⁸². Em 2003, Delgado e colaboradores relataram que SNPs nas posições -1030 e -862 podiam ser empregados como marcadores de viremia fora de controle do HIV, ao analisar pacientes infectados controladores e não controladores da viremia ⁸³.

Tendo em vista os dados apresentados, nota-se que a identificação de SNPs em genes de citocinas apresenta um potencial promissor para a estratificação dos pacientes portadores do HIV em relação à progressão da doença e eventos adversos durante o seguimento clínico. A identificação de SNPs nos genes codificadores da IL-4 e do TNF- α pode ser útil para o rastreamento de pacientes que apresentam alterações constitutivas na produção dessas citocinas, o que, por sua vez, pode modular a resposta imunitária, tornando-a mais ou menos eficiente no combate à infecções virais. Saliente-se ainda que pacientes portadores do HIV com determinados SNPs em genes codificadores de citocinas podem apresentar susceptibilidade geneticamente determinada ao desenvolvimento de outras doenças associadas à aids, incluindo novas infecções e certas neoplasias malignas, principalmente aquelas induzidas por vírus oncogênicos.

2.5 Referências bibliográficas

- ¹ *Pneumocystis pneumonia* – Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981; 30: 250-252.
 - ² Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia* among homosexual men – New York City and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981; 30: 305-308.
 - ³ Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians in the United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1982; 31: 353-354.
 - ⁴ Sepkowitz KA. Aids – The first 20 years. N Eng J Med 2001; 344(23): 1764-1772.
 - ⁵ Joint United Nations Program on HIV/AIDS and World Health Organization. 2008 Report on the Global AIDS epidemic. Geneva, Switzerland; 2008. Disponível em <http://www.unaids.org>.
 - ⁶ Joint United Nations Program on HIV/AIDS and World Health Organization. AIDS Epidemic Update. Geneva, Switzerland; 2009. Disponível em <http://www.unaids.org>.
 - ⁷ Meira DA. Acquired Immunodeficiency Syndrome in Brazil. Croat Med J 2002; 43 (4): 475-479.
 - ⁸ Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico – Aids/DST ano V nº 01. Dados Epidemiológicos do Brasil. 27^a a 52^a Semanas Epidemiológicas, Julho a Dezembro de 2007 e 1^a a 26^a. Semanas Epidemiológicas, Janeiro a Julho de 2008. Brasília, DF, Brasil.
-

-
- ⁹ Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico – Aids/DST 2009 - Dados preliminares. Brasília, DF, Brasil. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>
- ¹⁰ Schwartz SA, Nair MPN. Current concepts in Human Immunodeficiency Virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999 6 (3): 295-305.
- ¹¹ Padian NS, Shiboski SC, Glass SO, Vittinghoff E. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus (HIV) in northern California: results from a ten-year study. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 350-357.
- ¹² Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med.* 2001 134 (Pt 1): 761-776.
- ¹³ Marmor M, Hertzmark K, Thomas SM, Halkitis PN, Volgler M. Resistance to HIV infection. *J Urban Health* 2006; 83 (1): 5-17.
- ¹⁴ Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220 (4599): 868-871.
- ¹⁵ Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 224 (4648): 497-500.
- ¹⁶ Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardländer B, Esparza J, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Estimated Global Distribution and
-

-
- Regional Spread of HIV-1 Genetic Subtypes in the Year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29 (2): 184-190.
- ¹⁷ De Silva TI, Cotton M, Rowland-Jones SL. HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends Microbiol* 2008; 16 (12): 588-595.
- ¹⁸ Stevenson M. HIV-1 Pathogenesis. *Nat Med* 2003; 9 (7): 853-860.
- ¹⁹ Weiss RA. Gulliver's travels in HIVland. *Nature* 2001; 410: 963-967.
- ²⁰ Manavi K. A review on infection with human immunodeficiency virus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006; 20 (6): 923-940.
- ²¹ Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau N. Change in co-receptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185 (4): 621-628.
- ²² Weiss RA. Getting to know HIV. *Trop Med Int Health* 2000; 5 (7): A10-A15.
- ²³ Cadogan M, Dalgleish AG. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *Lancet* 2008; 8: 675-684.
- ²⁴ Spano JP, Costagliola D, Katlama C, Mounier N, Oksenhendler E, Khayat D. AIDS-related malignancies: state of the art and therapeutic challenges. *J Clin Oncol* 2008; 26 (24): 1-9.
- ²⁵ Bellan C, De Falco G, Lazzi S, Leoncini L. Pathologic aspects of AIDS malignancies. *Oncogene* 2003; 22: 6639-6645.
- ²⁶ Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med* 2000; 343 (1): 37-49.
-

-
- ²⁷ Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med* 2000; 343 (2): 108-117.
- ²⁸ Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and post-treatment with interferon alfa. *Hepatology* 1996; 24 (1): 6-9.
- ²⁹ Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77 (9): 1859-1870.
- ³⁰ Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A et al. Dual effect of interleukin-4 on HIV-1 expression: Implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 8886-8891.
- ³¹ Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T et al. IL-4 and glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4⁺ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 642-649.
- ³² Jourdan P, Abbal C, Nora N, Hori T, Uchiyama T, Vandrell JP et al. Cutting edge: IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *J Immunol* 1998; 160: 4153-4157.
- ³³ Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M et al. Interleukin-4 transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for the screening of antiviral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 2008; 197: 134-141.
-

-
- ³⁴ Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975; 72 (9): 3666-3670.
- ³⁵ Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Ann Rev Immunol* 1992; 10: 411-432.
- ³⁶ Herbein G, O'Brien WA. Tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223: 241-256.
- ³⁷ Cope AP, Liblau RS, Yang XD, Congia M, Laudanna C, Schreiber RD et al. Chronic tumor necrosis factor alters T-cell responses by attenuating T-cell receptor signaling. *J Exp Med* 1997; 185: 1573-1584.
- ³⁸ Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; 214: 149-160.
- ³⁹ Calabrese LH, Zein N, Vassilopoulos D. Safety of antitumor necrosis factor (anti-TNF) therapy in patients with chronic viral infections: hepatitis C, hepatitis B, and HIV infection. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (2): 8-24.
- ⁴⁰ Herbein G, Montaner LJ, Gordon S. Tumor necrosis factor alpha inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: a selective role for the 75-kilodalton receptor. *J Virol* 1996; 70 (11): 7388-7397.
- ⁴¹ Karsten V, Gordon S, Kirn A, Herbein G. HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor- α . *Immunology* 1996; 88: 55-60.
-

-
- ⁴² Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB. Tumor necrosis factor α activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF- κ B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5974-5978.
- ⁴³ Montano MA, Nixon CP, Ndung'u T, Bussman H, Novitsky VA, Dickman D, Essex M. Elevated tumor necrosis factor- α activation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Southern Africa is associated with an NF- κ B enhancer gain-of-function. *J Infect Dis* 2000; 181: 76-81.
- ⁴⁴ Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.
- ⁴⁵ The International SNP Map Working Group. A map of the human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-933.
- ⁴⁶ Knight J. Polymorphisms in tumor necrosis factor and other cytokines as risks for infectious diseases and the septic syndrome. *Cur Infect Dis Rep* 2001; 3: 427-439.
- ⁴⁷ Kwok PY, editor. *Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols. Methods in molecular biology: v. 212.* Totowa, NJ: Humana Press; 2003.
- ⁴⁸ Mok CC, Lanchbury JS, Chan DW, Lau CS. Interleukin-10 promoter polymorphisms in southern chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41(6): 1090-1095.
-

-
- ⁴⁹ Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V e. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 2005; 118: 293-300.
- ⁵⁰ Ates Ö, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol* 2008; 28 (3): 232-236.
- ⁵¹ Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer* 2006; 5: 143-149.
- ⁵² Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102 (7): 1369-1376.
- ⁵³ Goyenechea E, Parra D, Martínez JA. Impact of interleukin 6 -174G>C polymorphisms on obesity-related metabolic disorders in people with excess in body weight. *Met Clin Experim* 2007; 56: 1643-1648.
- ⁵⁴ Tonet AC, Karnikowski M, Moraes CF, Gomes L, Karnikowski MGO, Córdova C et al. Association between the -174G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 47-53.
- ⁵⁵ El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.
-

-
- ⁵⁶ Qi P, Chen Y, Wang H, Fang M, Ji Q, Zhao Y et al. -590C>T polymorphism in the TGF- β 1 gene promoter, impact on the hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58 (9): 1433-1440.
- ⁵⁷ O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* 2000; 177: 99-111.
- ⁵⁸ Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL-10. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (26): 14467-14472.
- ⁵⁹ Fernandez S, Rosenow AA, James IR, Roberts SG, Nolan RC, French MA et al. Recovery of CD4⁺ T cells in HIV patients with stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central major histocompatibility complex genes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41: 1-5.
- ⁶⁰ Gervaziev YV, Kaznacheev VA, Gervazieva VB. Allelic polymorphisms in the interleukin-4 promoter regions and their association with bronchial asthma among the Russian population. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 257-264.
- ⁶¹ Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M. The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005; 26: 48-51.
-

-
- ⁶² Kleinrath T, Gassner C, Lackner P, Thurnher M, Ramoner R. Interleukin-4 promoter polymorphisms: a genetic prognostic factor for survival in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007; 25 (7): 845-851.
- ⁶³ Landi S, Bottari F, Gemignani F, Gioia-Patricola L, Guino E, Osorio A et al. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphisms and colorectal cancer risk. *Eur J Cancer* 2007; 43: 762-768.
- ⁶⁴ Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995; 25 (2): 74-78.
- ⁶⁵ Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima T et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 449-453.
- ⁶⁶ Cinek O, Vavrincova P, Striz I, Drevinek P, Sedlakova P, Vavrinec J et al. Association of single nucleotide polymorphisms within cytokine genes with juvenile idiopathic arthritis in the Czech population. *J Rheumatol* 2004; 31: 1206-1210.
- ⁶⁷ Trajkov D, Mishevskaja-Perchinkova S, Karadzova-Stojanoska A, Petlichkovski A, Strezova A, Spiroski M. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 1291-1300.
- ⁶⁸ Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N et al. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol* 2000; 74 (12): 5452-5459.
-

-
- ⁶⁹ Nakayama EE, Meyer L, Iwamoto A, Persoz A, Nagai Y, Rouzioux C et al. Protective effect of interleukin-4 – 589T polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 disease progression: relationship with virus load. *J Infect Dis* 2002; 185: 1183-1186.
- ⁷⁰ Kwa D, van Rij RP, Boeser-Nunnink B, Vingerhoed J, Schuitemaker H. Association between an interleukin-4 promoter polymorphism and the acquisition of CXCR4 using HIV-1 variants. *AIDS* 2003; 17 (7): 981-985.
- ⁷¹ Singh KK, Hughes MD, Chen J, Spector SA. Lack of protective effects of interleukin-4 -589-C/T polymorphism against HIV-1-related disease progression and central nervous system impairment, in children. *J Infect Dis* 2004; 189: 587-592.
- ⁷² Chatterjee A, Rathore A, Dhole TN. Association of IL-4 589 C/T promoter and IL-4R α I50V receptor polymorphism with susceptibility to HIV-1 infection in North Indians. *J Med Virol* 2009; 81: 959-965.
- ⁷³ Bayley JP, Ottenhoff THM, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004; 5: 315-329.
- ⁷⁴ Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J et al. A common functional polymorphism (C /A substitution at position -862) in the promoter region of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . *Hum Mol Genet* 1999; 8 (8): 1443-1449.
- ⁷⁵ Kaluza W, Reuss E, Grossman S, Hug R, Schopf RE, Galle PR et al. Different transcriptional activity and *in vitro* TNF- α production in psoriasis patients carrying
-

-
- the TNF- α -238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1180-1183.
- ⁷⁶ Hajjer AH, Hutchinson IV. TNF- α gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 216-228.
- ⁷⁷ Ramos EM, Lin MT, Larson EB, Maezawa I, Tseng LH, Edwards KL et al. Tumor necrosis factor α and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 1165-1169.
- ⁷⁸ Fonseca JE, Cavaleiro J, Teles J, Sousa E, Andreozzi VL, Antunes M et al. Contribution for new genetic markers of rheumatoid arthritis activity and severity: sequencing of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 (37): 1-10.
- ⁷⁹ Hirankarn N, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn. Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF-alpha gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population. *Int J Immunogene*. 2007; 34: 425-430.
- ⁸⁰ Kusumoto K, Uto H, Hayashi K, Takahama Y, Nakao H, Suruki R et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. *Cytokine* 2006; 34: 24-31.
- ⁸¹ Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL et al. TNF- α promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis* 2005; 191: 969-976.
-

⁸² Maher B, Alfirevic A, Vilar FJ, Wilkins EGL, Park BK, Pirmohamed M. TNF- α promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *AIDS* 2002; 16: 2013-2018.

⁸³ Delgado JC, Leung JY, Baena A, Clavijo OP, Vittinghoff E, Buchbinder S et al. The -1030/-862-linked TNF promoter single-nucleotide polymorphisms are associated with the inability to control HIV-1 viremia. *Immunogenetics* 2003; 55: 497-501.

Manuscript:

Single nucleotide polymorphisms in cytokine-coding genes in human immunodeficiency virus-infected patients from Brazil

3 Manuscrito

Single nucleotide polymorphisms in cytokine-coding genes in human immunodeficiency virus-infected patients from Brazil

Running title:

SNPs in cytokine-genes in HIV-infected patients

Authors:

Ana Rachel Oliveira Léda, BSc; Alexandre Naime Barbosa, MD, MSc; Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida, MD, MSc; Lenice do Rosário de Souza, MD, PhD; Domingos Alves Meira, MD, PhD; Deilson Elgui de Oliveira, PhD.

Affiliations:

All authors are from Botucatu School of Medicine, Sao Paulo State University (UNESP) – Botucatu, SP, Brazil

Correspondence:

Deilson Elgui de Oliveira, PhD
Botucatu School of Medicine – State University of Sao Paulo
Pathology Department - Molecular Pathology Laboratory
Rubião Júnior, s/n – Botucatu, Sao Paulo, Brazil
18618-970
Phone/Fax: +55 14 3811-6238
E-mail: elgui@patolgiamolecular.net

Manuscript formatted according to the *Genes and Immunity* Journal “Instructions to authors” (except for Figures and Tables, within the text for reading convenience).

3.1 Abstract

The natural history of HIV infection and its progression towards aids may vary considerably among different individuals, possibly due to genetic factors, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs). In cytokines genes promoters, SNPs may affect protein synthesis and regulation, resulting in more or less efficient immune responses against HIV. The present study evaluated the frequencies and possible effects of SNPs in the IL-4 gene promoter at positions -589 and -1098 and in the TNF- α gene promoter at positions -238 and -862 in HIV-infected patients from Brazil. DNA samples from 157 patients were obtained from peripheral blood mononuclear cells, and SNPs genotyping was performed by High Resolution Melting analysis (HRM). Patients carrying *TT* at SNP/pIL-4 -589 had lower circulating T CD₈⁺ cells compared to *CC* carriers ($p=0.0104$). Moreover, carriers of *TT* at SNP/pIL-4 -1098 had more circulating T CD₈⁺ cells compared to *GT* carriers ($p=0.0053$). Regarding SNP/pTNF- α -238, *GG* and *GA* proportions were significantly different between patients without HAART and patients on HAART without therapeutic failure ($p=0.0205$). In conclusion, these results provide compelling evidence that the presence of SNPs in cytokine-coding genes do modify the natural history of HIV infection, mainly due to changes in the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Human immunodeficiency virus (HIV), cytokines, single nucleotide polymorphisms, High resolution melting (HRM).

3.2 Introduction

The natural history of HIV infection and its progression towards AIDS rely on the efficiency of the immune system against the virus, and it may vary considerably among different individuals. In part, this variation is related to genetic factors, including single nucleotide polymorphisms (SNPs), the most abundant genetic variations within the genome¹. Indeed, SNPs and other polymorphisms in genes coding for cytokines and molecules of the major histocompatibility complexes (MHC) have been shown to have an impact on different aspects of HIV infection^{2, 3}.

SNPs located in cytokines genes promoters may affect protein synthesis and regulation, with important effects in the immune system and the pathogenesis of some diseases⁴⁻⁶. For instance, the SNP at position -589 in the IL-4 gene promoter (SNP/pIL-4 -589; rs2243250) was reported to increase its transcriptional activity⁷; this effect, however, was not confirmed by another study⁸. In the same gene promoter, some alleles of the SNP located in the -1098 position (SNP/pIL-4 -1098; rs2243248) have been strongly associated with the development of different diseases^{9, 10}, even though they have not yet been associated with changes in the cytokine production. In the setting of HIV infection, changes in IL-4 production may impact the immune responses against the virus, essentially because it stimulates humoral immunity, instead of a more efficient cytotoxic response¹¹. Moreover, it has been reported that IL-4 downregulates the expression of the CCR5 co-receptor and upregulates the expression of the CXCR4 co-receptor in T lymphocytes, favoring the propagation of X4 strains within the infected organism¹²⁻¹⁵.

In comparison with other cytokine-coding genes, the TNF- α gene is highly polymorphic, with many SNPs reported so far ¹⁶. SNPs at positions -238 (SNP/pTNF- α -238; rs361525) and -862 (SNP/pTNF- α -862; rs1800630) within the gene promoter were associated with transcriptional effects and changes in TNF- α production ^{5, 6}. TNF- α has pro-inflammatory properties known to be important during viral infections ¹⁷, and high levels of this cytokine have been detected in all stages of HIV infection ¹⁸. It was previously reported that TNF- α downregulates the cell surface expression of both CD₄ and CCR5, and it also stimulates apoptosis of T CD₄⁺ and T CD₈⁺ lymphocytes ¹⁹.

Based on this data, the identification of individuals carrying different alleles of SNPs in cytokine-coding genes may be relevant for the evaluation of the course of HIV infection and disease progression. As SNPs/pIL-4 and SNPs/pTNF- α may have an impact on cytokine production, these polymorphisms may modify the efficiency of the immune responses against the HIV. Hence, the present study aimed to evaluate the frequency of SNPs/pIL-4 -598, SNPs/pIL-4 -1098, SNPs/pTNF- α -238, and SNPs/pTNF- α -862 in HIV-positive patients, as well as to evaluate the possible associations between specific genotypes with clinical and laboratorial data available.

3.3 Subjects and Methods

3.3.1 Patients

The present study was approved by the Committee on Ethics in Research of the Botucatu School of Medicine, State University of Sao Paulo (UNESP). One-hundred and fifty-seven HIV-infected patients attending the HIV/Aids Day-Clinic in Botucatu, Sao Paulo, Brazil, were recruited during 2007-2008. Patients were adults (18 years old or more), and they were treated exclusively with anti-retroviral drugs provided by the Brazilian Government. After informed consent, blood samples for DNA extraction from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained for all patients. In addition, general data (e.g., sex, age, ethnicity, declared sexual orientation, putative route of HIV infection, etc.) and results for laboratorial tests (including HIV viremia and T CD₄⁺ and T CD₈⁺ cells counts) were retrieved by interviews and evaluation of medical records, respectively.

3.3.2 DNA extraction

Whole blood samples were collected into 4mL BD *Vacutainer*[®] EDTA tubes (Beckson-Dickson, Rutherford, NJ, USA), and PBMC were isolated with *Histopaque*[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) after 400xg centrifugation for 30min. DNA extraction was performed using 200µL of mononuclear cells using the *QIAamp DNA Blood Mini Kit*[®] (Qiagen, Valencia, CA, USA), accordingly to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted, quantified with the NanoVue[™] spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), and stored at -20°C until use for of SNPs/pIL-4 -598 and -1098 and SNPs/pTNF-α -238 and -862 genotyping.

3.3.3 SNPs genotyping by High Resolution Melting analysis

DNA segments in which the SNP/pIL-4 -598, SNP/pIL-4 -1098, SNP/pTNF- α -238 and SNP/pTNF- α -862 are included were amplified by Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) with the Rotor-Gene™ 6000 equipment (Corbett Research, Sydney, Australia), using Eva Green™ (Biotium Inc, Hayward, CA, USA), a third generation dsDNA intercalating dye. DNA samples were normalized at 20ng/ μ L and each SNP was analyzed separately. After DNA amplification, samples were submitted to High Resolution Melting (HRM) analysis to identify the SNPs alleles. Control samples for each SNP genotype were selected and validated by DNA sequencing. All test and control samples were evaluated in duplicates. The qPCR conditions, thermocycling profiles and control samples used are shown in Table 1; primer pair sequences and amplicons sizes are listed in Table 2.

TABLE 1 – qPCR conditions and cycling pattern used to amplify SNPs/pIL-4 at positions -589 and -1098, and SNPs/pTNF- α at positions -238 and -862.

REACTION	REACTION COMPOSITION	CYCLING PATTERN	CONTROLS*
SNP/pIL-4 -589 C/T	Buffer (Tris-Cl 28mM pH 8.4 / KCl 70mM) 1X, 2.5mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq), Eva Green 1X and 0.2 μ M of each primer.	94°C – 5min (1x); 94°C–20s, 58°C–20s, 72°C–20s (35x)	CC: BCBL-1 CT: LCL-9001 TT: LCL-RJ
SNP/pIL-4 -1098 G/T	Buffer (Tris-Cl 28mM pH 8.4 / KCl 70mM) 1X, 3,0mM MgCl ₂ , 0,2mM each dNTP, 1,25U DNA polymerase (Taq), Eva Green 1X and 0,25 μ M of each primer.	94°C – 10min (1x); 94°C–20s, 55°C–30s, 72°C–20s (40x)	GG: LFF GT: IBL-4 TT: LCL-9001
SNP/pTNF-α -238 G/A	Buffer (Tris-Cl 28 mM pH 8.4 / KCl 70mM) 1X, 2.0mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq), Eva Green 1X and 0.2 μ M of each primer.	94°C – 10min(1x); 94°C–30s, 58°C–20s, 72°C–20s (40x)	GG: BCBL-1 GA: IBL-1 AA: none
SNP/pTNF-α -862 C/A	Buffer (Tris-Cl 28mM pH 8.4 / KCl 70 mM) 1X, 2.5mM MgCl ₂ , 0.2mM each dNTP, 1.25U DNA polymerase (Taq) Eva Green 1X and 0.15 μ M of each primer.	94°C–5min(1x); 94°C–20s, 58°C–20s 72°C–20s (40x)	CC: BC-5 CA: BC-3 AA: none

*Cells from which reference DNA was extracted: BC-3, BC-5 and BCBL-1 are primary effusion lymphoma cells; IBL-1: immunoblastic lymphoma; IBL-4 and LCL-RJ are Burkitt's lymphoma cells; and LCL-9001 is a lymphoblastic cell line. LFF: PBMC from voluntary blood donor.

TABLE 2 – Oligonucleotide sequences used to detect SNPs/pIL-4 at positions -589 and -1098 and SNPs/pTNF- α at positions -238 e -862 using qPCR-HRM.

Target	Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Amplicon	Ref
SNP/pIL-4 -589 (rs2243250)	rs2243250.S	TAT GGA CCT GCT GGG ACC CAA ACT AG	150pb	20
	rs2243250.A	TGA TCT GGG GCT CCT TCT CTG CAT AG		
SNP/pIL-4 -1098 (rs2243248)	rs2243248.2S	GGG CTG ATT TGT AAG TTG G	82pb	*
	rs2243248.2A	CCC ACT TTT TGA ATG GAA C		
SNP/pTNF-α -238 (rs361525)	rs361525.S	CAG TCA GTG GCC CAG AAG AC	75pb	21
	rs361525.A	AGC ATC AAG GAT ACC CCT CAC A		
SNP/pTNF-α -862 (rs1800630)	rs1800630.S	ATG TAG CGG CTC TGA GGA ATG GGT TAC	132pb	22
	rs1800630.A	CTA CAT GGC CCT GTC TTC GTT AAG		

*These oligonucleotides were designed by AROL and DEO using the Oligo Analyzer and Oligo Explorer software version 1.0.0 (Teemu Kuulasmaa, Kuopio, Finland).

All samples submitted to SNPs genotyping by HRM reached the amplification plateau at the end of the qPCR reaction; in addition, only samples with concordant replicates were analyzed. SNP genotyping was performed by comparing

control samples curves with the amplification curves for the test samples. Comparisons between HRM and conventional melting curves were also performed to improve the identification of the SNPs genotypes.

3.3.4 *Statistical analysis*

In addition to the genotyping results for IL-4 and TNF- α SNPs, the following data were collected for all patients: age, sex, declared sexual orientation, most probable route of HIV infection, ethnicity, estimated time of HIV infection, the HIV clinical stage according to the classification of the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ²³, response to anti-retroviral therapy, T CD₄⁺ and T CD₈⁺ cells counts, and HIV viral load at the beginning of the study. Statistical analysis using categorical variables were performed using the Chi-square test, and Fisher's exact test. The variables age, T CD₄⁺ and T CD₈⁺ cells counts, and HIV viremia were fitted for a generalized linear model with negative binomial error, followed by the likelihood ratio test (LR test). Whenever necessary, the least square means test (LS Means) was performed. The Mann-Whitney test was used to analyze age versus sex. In all tests, significance was defined as $p < 0.05$ and the statistical analyses were performed using the SAS software package, version 9.1.3.

3.4 Results

3.4.1 Casuistic description

Out of the 157 patients included in the study, 58.6% (92/157) were male and 41.4% (65/157) were female. Women were significantly younger than men ($p=0.005$; Mann-Whitney test), and overall patients' age ranged from 18 to 70 years old. According to ethnicity, 110/157 (70%) patients were considered Caucasian and 47/157 (30%) were non-Caucasian, which included African and native South-America descendents.

Overall, 110/137 (80.3%) patients were receiving Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART); for 20 patients this information was not available. By the time patients were recruited, 82/157 (52.2%) had undetectable HIV viremia or less than 50 HIV copies/mm³. Out of those patients with detectable HIV viremia or greater than 50 viral copies/mm³, 16.6% had 50-1,000 copies, 11.5% had 1,000-10,000 copies, 8.9% had 10,000-100,000 copies, and 4.5% had more than 100,000 viral copies/mm³. Medians for the circulating T CD₄⁺ and T CD₈⁺ lymphocytes were 456.0 cells/mm³ and 961.0 cells/mm³, respectively.

According to the CDC classification²³, patients were mostly classified as C (77/152; 50.7%), for aids symptoms; and 3 (91/152; 59.9%), for the lowest T CD₄⁺ cells count during the history of HIV infection. Due to lack of clinical and laboratorial data, 5/157 (3.2%) patients included in the study were not classified according to the CDC stage.

The Figure 1 illustrates the qPCR-HRM-based genotyping approach for each SNP evaluated in the IL-4 and TNF- α genes promoters.

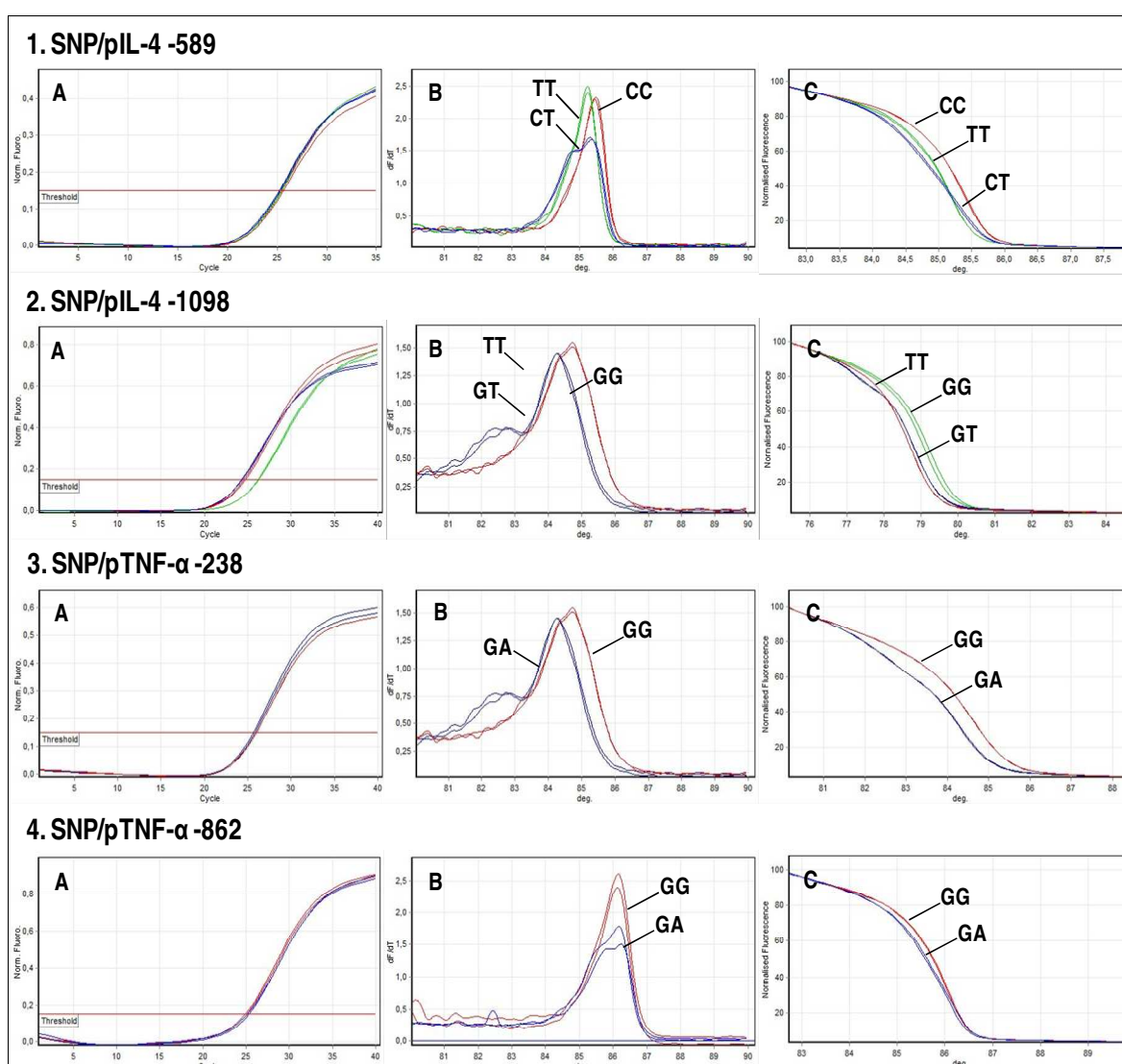


FIGURA 1 – qPCR-HRM-based genotyping of the SNP -589 and -1098 in the IL-4 gene promoter (SNP/pIL-4 -589 and SNP/pIL-4 -1098, respectively), and SNP -238 and -862 in the TNF- α gene promoter (SNP/pTNF- α -238 and SNP/pTNF- α -862, respectively). A) Amplification plot; B) Conventional melting analysis; C) High Resolution Melting Analysis (HRM). For SNP/pTNF- α -238 and SNP/pTNF- α -862, the homozygous genotypes AA were not found by qPCR-HRM either among reference or test samples.

3.4.2 IL-4 SNPs

Out of the 157 patients genotyped for SNP/pIL-4 -589, 74 (47.2%) carried the CT genotype, followed by 61 (38.8%) and 22 (14.0%) patients that carried the CC and TT genotypes, respectively. The HIV-infected patients evaluated were al-

so group into carriers (n=96; 61.2%) and non-carriers (n=61; 38.8%) of the *T* allele.

Considering the SNP/pIL-4 -589, there was no significant difference in the T CD₄⁺ cells counts among patients carrying the *TT*, *CT* or *CC* genotypes, or even for those patients grouped according to the presence of the *T* allele. On the other hand, the T CD₈⁺ counts were significantly different among genotypes (p=0.0448; LR test), so that patients carrying *TT* had lower circulating T CD₈⁺ cells compared to *CC* carriers (p=0.0104; LS Means). However, only a trend was found for the difference between the T CD₈⁺ counts between *TT* and *CT* carriers (p=0.0810; LS Means) (Figure 2). A trend was also noted that *T* allele carriers had lower T CD₈⁺ counts compared to non-carriers (p=0.0682; LS Means).

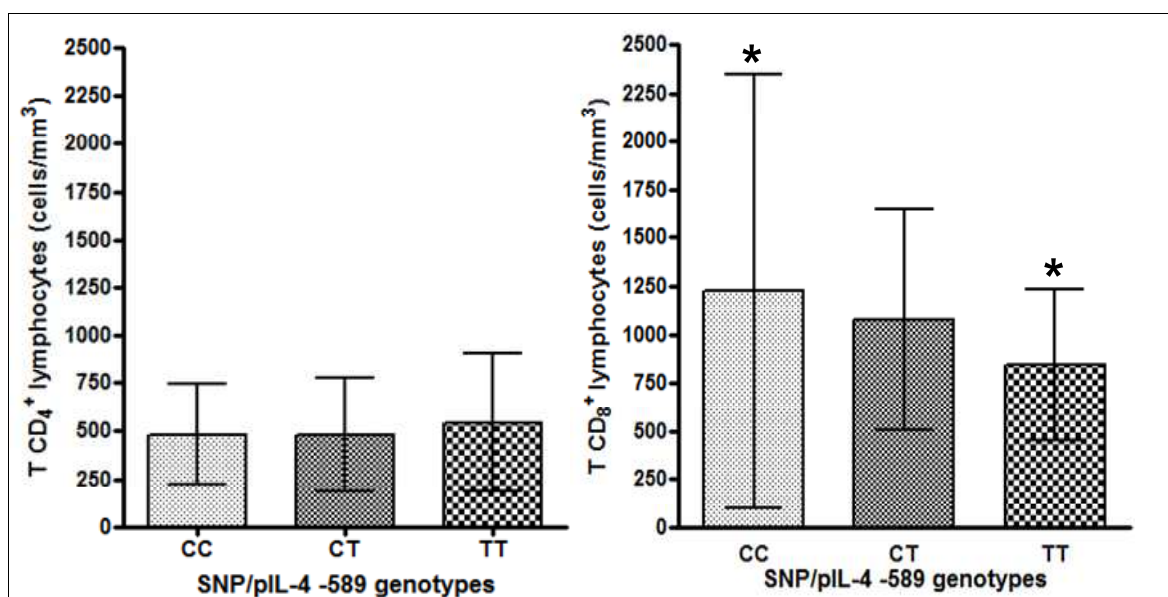


FIGURE 2 – Association between SNP/pIL-4 -589 and T CD₄⁺ and T CD₈⁺ cells counts among HIV-infected patients. Data were not available for 8 patients (n=149). Error bars represent standard deviation. *p=0.0104 (LS Means).

The analysis of the SNP/pIL-4 -589 genotypes considering the estimated time of retroviral infection revealed that patients carrying *CT* and *CC* were infected by HIV longer than *TT* carriers ($p=0.0149$; LR Test) (Table 3).

TABLE 3 – Association between the SNP/pIL-4 -589 genotypes and the estimated time of HIV infection for the evaluated patients.

SNP/pIL-4 -589 genotypes	Estimated time of HIV-infection (years)		P
	Mean	Standard deviation	
CC	9,16 ^A	6,60	0,0149*
CT	9,44 ^A	6,25	
TT	5,80 ^B	4,68	

* LR Test. Means with the same letters were equivalent.

Considering SNP/pIL-4 -1098, 137/157 (87.3%) and 20/157 (12.7%) patients carried the *TT* and the *GT* genotypes, respectively. The *GG* genotype was not found. Curiously, the heterosexual intercourse was the most frequent route of HIV infection among *TT* carriers (102/137; 74.5%), followed by 23/137 (16.8%) patients presumably infected by homosexual intercourse and 12/137 (8.7%) patients presumably infected by other routes (including blood transfusion, sharing contaminated needles by intravenous-drug users, and mother-to-child transmission). Moreover, heterosexual intercourse was the only route of infection mentioned among the 20 *GT* carriers ($p=0.0345$; Fisher's exact test).

Although the T CD₄⁺ cells counts for patients carrying the *TT* and the *GT* genotype were similar, the T CD₈⁺ cells counts for these genotypes were significantly different ($p=0.0053$; LS Means) (Figure 3).

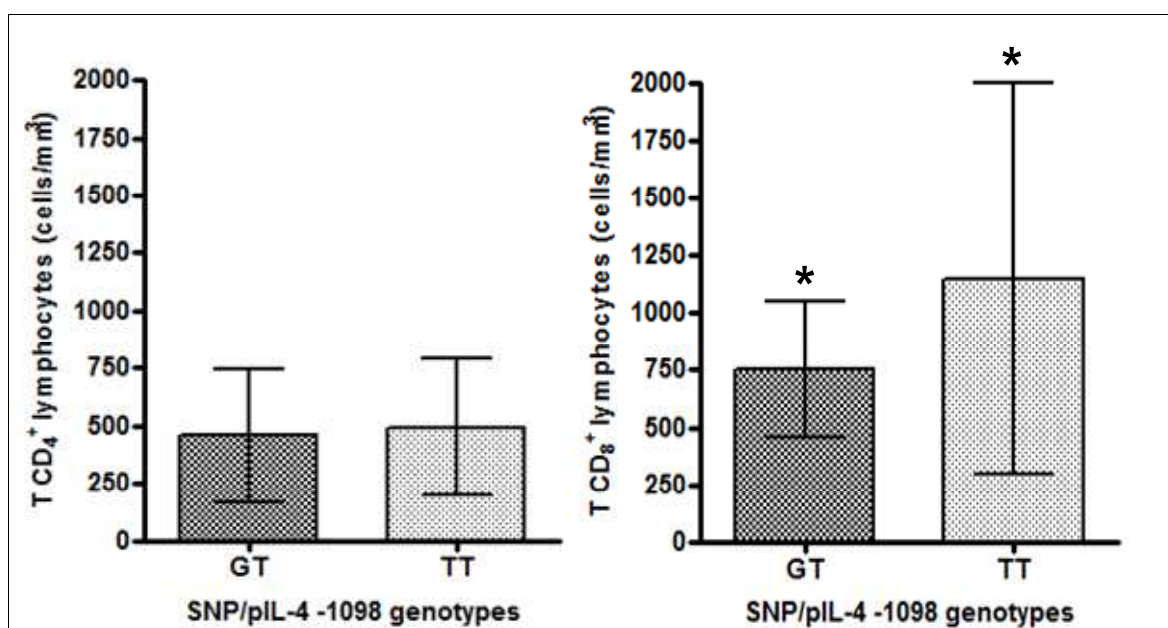


FIGURE 3 – SNP/pIL-4 -1098 and T CD₄⁺ and T CD₈⁺ cells count among HIV-infected patients. Data was not available for 8 patients (n=149). Error bars represent standard deviation. *p=0.0053 (LS Means).

None of the other associations analyzed for SNP/pIL-4 -589 and SNP/pIL-4 -1098 achieved statistical significance.

3.4.3 TNF- α SNPs

The GG and GA genotypes at SNP/pTNF- α -238 were identified in 134/157 (85.3%) and 23/157 (14.7%) patients, respectively. The AA genotype was not found. Considering the SNP/pTNF- α -238 genotypes and response to the anti-retroviral therapy, GG and GA proportions were significantly different between patients without anti-retroviral therapy and patients on HAART with no therapeutic failure (p=0.0205; Fisher's exact test) (Figure 4).

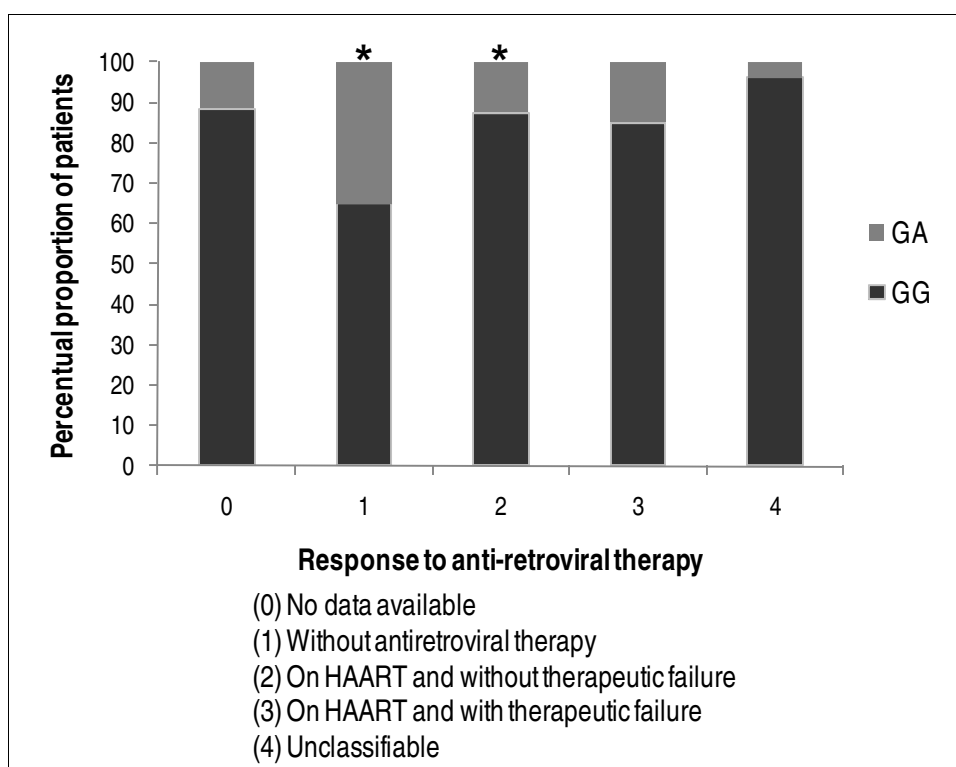


FIGURE 4 – Association between SNP/pTNF- α -238 and response to anti-retroviral therapy for the HIV-infected patients evaluated. * $p=0.0205$ (Fisher's exact test).

Regarding the SNP/pTNF- α -862, out of the 157 HIV-infected patients 106 (67.5%) and 50 (31.8%) were carriers of CC and CA genotypes, respectively. Only one patient (1/157; 0.7%) carried the AA genotype, verified only after DNA sequencing. Curiously, when age at the time of recruitment was analyzed, it was observed that CC carriers (mean=39.0 years old; SD=11.0 years old) were significantly younger than patients with the CA genotype (mean=43.5 years old; SD=8.6 years old) ($p=0.0135$; LS Means).

None of the other associations analyzed for SNP/pTNF- α -238 and SNP/pTNF- α -862 achieved statistical significance.

3.5 Discussion

The present study evaluated effects of selected SNPs in IL-4 and TNF- α genes promoters for HIV-infected patients from Brazil. As these polymorphisms may have an impact on cytokine production, some genotypes might be associated with changes in the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines, modulating the immune responses against the HIV infection. Additionally, the presence of SNPs varies considerably among different individuals, and this might be one of the reasons for the differences in HIV susceptibility and disease progression.

The SNP genotyping was performed by qPCR-coupled HRM analysis, which is an improvement of the conventional post-qPCR melting analysis. Although other SNPs have been previously identified by HRM²⁴, no other studies in the literature that evaluated SNPs in cytokine-coding genes using this approach were identified so far. In the present study the HRM analysis revealed to be a useful and sensitive tool to detect SNPs within cytokine-coding genes.

A low frequency of the *TT* genotype at SNP/pIL-4 -589, compared to the frequencies of *CC* and *CT* genotypes, was observed in the population studied. Similar results were reported for HIV-positive patients from Europe^{25, 26} and India²⁷. On the other hand, high frequency of the *TT* genotype was reported in a Japanese cohort²⁸.

Rosenwasser and colleagues (1995) reported an association between the presence of the *T* allele at SNP/pIL-4 -589 with an increased promoter activity, leading to increase in IL-4 synthesis. Furthermore, carriers of the *T* allele had higher IgE serum levels compared to non-carriers⁷. This association, however, was not verified in another study⁸. Interestingly, Nakayama and colleagues (2000)

reported that the presence of the *T* allele was associated not only with high levels of IgE, but also with the emergence of X4 strains of HIV in infected patients ²⁸. Few years later (2002), the authors reported that the presence of the *T* allele was associated with low levels of HIV viral load and delayed disease progression towards AIDS ²⁵, but other studies did not observe any of these associations ^{26, 27, 29}. In the present study, due to the short follow-up (2 years) and very few death events to allow survival analysis, the association of SNP/pIL-4 -589 and disease progression could not be performed.

HIV-infected patients carrying the *TT* genotype at SNP/pIL-4 -589 had lower circulating T CD₈⁺ cells than patients carrying the *CT* or *CC* genotypes. Assuming that the *T* allele is associated with increased IL-4 transcription ⁷, patients with the homozygote *T* genotype might have increased humoral immunity over the cytotoxic responses due to differentiation of the T_{H2} subset of T lymphocytes. In this setting, the immunity against HIV for *TT* carriers might be less effective, so that this genotype could be associated with increased viral replication. Though this hypothesis is reasonable, it could not be verified in the present study, since no difference between HIV viremia among patients with distinct genotypes of the SNP/pIL-4 -589 was found.

As far as it could be verified, this is the first study to evaluate the frequency and effects of SNP/pIL-4 -1098 genotypes in HIV-infected patients. In the present population, the *TT* genotype was found more frequently than the *GT* genotype, and none of the patients had the *GG* genotype. Similar results were reported for healthy individuals and patients with juvenile ¹⁰ and rheumatoid arthritis ⁹, all from East Europe. Interestingly, very high frequency of the *GG* genotype was

found among healthy individuals and asthmatic patients from Russia²⁰, which can be attributable to ethnic factors. Overall, the frequencies observed for the SNP/pIL-4 -1098 are in agreement with the frequencies reported in the literature^{9, 10, 30, 31}.

In the present study, patients with the *TT* genotype for SNP/pIL-4 -1098 had higher T CD₈⁺ cells counts than *GT* carriers, and similar results were found in a study with HIV-negative patients with idiopathic pulmonary fibrosis³². Unfortunately, there is lack of published information to validate any hypothesis on the reason of the association between some SNP/pIL-4 -1098 genotypes and the number of circulating T CD₈⁺ in different pathological settings.

In relation to SNP/pTNF- α -238, the *GG* genotype was identified more frequently than *GA*, and the *AA* genotype was not found. High frequency of the *GG* genotype, and low frequency or total absence of the *AA* genotype were also observed in Hispanic and non-Hispanic HPV-positive women³³, in adult intensive care patients from the United Kingdom³⁴ and in Korean patients with various types of cancer³⁵. In HIV-infected patients from England, *GG* genotype was also found more frequently than genotypes *GA* and *AA*³⁶. Thus, frequencies of the SNP/pTNF- α -238 genotypes in the present study are also in agreement with the overall frequencies published in the literature.

Kaluza and colleagues (2000) reported that patients with the *GA* and *AA* genotypes at SNP/pTNF- α -238 had decreased levels of TNF- α compared to *GG* carriers. The authors suggested that the presence of the *A* allele contribute to low TNF- α production⁶. However, Ugliarolo and colleagues (1998) did not observe association between TNF- α levels and this SNP³⁷. The analysis between

SNP/pTNF- α -238 and the response to anti-retroviral therapy in the present study revealed that the proportions between GG and GA genotypes were significantly distinct between patients without anti-retroviral therapy and patients receiving HAART without failure. It has been reported that TNF- α regulates macrophage-induced T CD₄⁺ lymphocytes apoptosis, especially in HIV-infected patients. Also, taken that anti-retroviral therapy in asymptomatic patients usually starts when T CD₄⁺ cells counts are lower than 350 cells/mm³, and considering that the A allele might be associated with low TNF- α production⁶, it is plausible that GA carriers (presumably low TNF- α producers) have lower depletion of T CD₄⁺ lymphocytes, which may postpone the beginning of HAART. On the other hand, if GG carriers have greater depletion of T CD₄⁺ lymphocytes due to high TNF- α production, they are more prone to start the anti-retroviral therapy earlier.

High frequency of the CC genotype and low frequency of the AA genotype at SNP/pTNF- α -862 were observed in the present study. Similar genotype frequencies were found in healthy European men⁵, Hispanic and non-Hispanic HPV-positive women³³, north-American patients with Alzheimer disease³⁸, and patients with systemic lupus erythematosus from Thailand³⁹. In the HIV setting, high and low frequencies of genotypes CC and AA, respectively, were found as well⁴⁰.

Ugliarolo and colleagues (1998) observed lack of association between SNP/pTNF- α -862 and changes in TNF- α gene expression in T and B cells³⁷, but Skoog and colleagues (1999) reported that the presence of the A allele was associated with low TNF- α serum levels. The latter authors suggested that the CA genotype affects the interaction between nuclear proteins and the TNF- α gene promoter, with consequent changes in the cytokine synthesis. Furthermore, they sug-

gested that carriers of the A allele were at higher risk to become infected by intracellular pathogens, and might have worse prognosis for infectious diseases due to downregulation of TNF- α ⁵.

In the HIV setting, Delgado and colleagues (2003) evaluated the presence of SNP/pTNF- α -862 genotypes in two groups of patients: controllers of the HIV viremia (less than 1,000 HIV copies/mL after 10 years of infection in the absence of anti-retroviral therapy) and non-controllers of viremia (viral load greater than 1,000 HIV copies/mL). The CA and AA genotypes were identified more frequently in non-controllers, and the majority of controllers carried the CC genotype. The authors suggested that the presence of SNP/pTNF- α -862 was associated with lack of control of the HIV viremia. However, this phenomenon was not considered to be associated with deregulation in TNF- α production, due to previous data of the same group ⁴⁰. In the present study, no significant association between SNP/pTNF- α -862 and HIV viremia was found.

In summary, the present study observed that SNPs in the IL-4 gene promoter have strong associations with the number of circulating T CD₈⁺ lymphocytes, with possible effects on HIV infection progression towards aids. The results also support the hypothesis that some genotypes of SNP/pTNF- α -238 may also have an impact on disease progression, changing the susceptibility to depletion of T CD₄⁺ lymphocytes. Taken together, these results provide compelling evidence that the presence of SNPs in cytokine-coding genes do modify the natural history of HIV infection.

3.6 Acknowledgements

The authors would like to thank all members of the Molecular Pathology Laboratory for the technical assistance during the experiments; Carina Alves de Oliveira and Luciene Ferreira Daltin for collecting blood samples; and Carolyne Chaves, MD, for collecting clinical and laboratorial data. We are grateful to Luciene Vaz de Arruda Silveira, PhD, and H elio Rubens de Carvalho Nunes, Msc, for the support with the statistical analysis. In addition, we express thanks to Dr. Ethel Cesarman for providing DNA samples extracted from different cell lineages used to identify control samples for the SNPs genotypes.

3.7 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

3.8 References

- ¹ Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.
 - ² Marmor M, Hertzmark K, Thomas SM, Halkitis PN, Volgler M. Resistance to HIV infection. *J Urban Health* 2006; 83 (1): 5-17.
 - ³ O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* 2000; 177: 99-111.
 - ⁴ Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003; 75: 711-717.
 - ⁵ Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J et al. A common functional polymorphism (C /A substitution at position -862) in the promoter region of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . *Hum Mol Genet* 1999; 8 (8): 1443-1449.
 - ⁶ Kaluza W, Reuss E, Grossman S, Hug R, Schopf RE, Galle PR et al. Different transcriptional activity and *in vitro* TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α -238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1180-1183.
-

-
- ⁷ Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995; 25 (2): 74-78.
- ⁸ Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima T et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 449-453.
- ⁹ Trajkov D, Mishevaska-Perchinkova S, Karadzova-Stojanoska A, Petlichkovski A, Strezova A, Spiroski M. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 1291-1300.
- ¹⁰ Cinek O, Vavrincova P, Striz I, Drevinek P, Sedlakova P, Vavrinec J et al. Association of single nucleotide polymorphisms within cytokine genes with juvenile idiopathic arthritis in the Czech population. *J Rheumatol* 2004; 31: 1206-1210.
- ¹¹ Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77 (9): 1859-1870.
- ¹² Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A et al. Dual effect of interleukin-4 on HIV-1 expression: Implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8886-8891.
- ¹³ Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T et al. IL-4 and glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4⁺ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 642-649.
-

-
- ¹⁴ Jourdan P, Abbal C, Nora N, Hori T, Uchiyama T, Vandrell JP et al. Cutting edge: IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *J Immunol* 1998; 160: 4153-4157.
- ¹⁵ Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M et al. Interleukin-4 transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for the screening of antiviral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 2008; 197: 134-141.
- ¹⁶ Bayley JP, Ottenhoff THM, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 2004; 5: 315-329.
- ¹⁷ Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Ann Rev Immunol* 1992; 10: 411-432.
- ¹⁸ Calabrese LH, Zein N, Vassilopoulos D. Safety of antitumor necrosis factor (anti-TNF) therapy in patients with chronic viral infections: hepatitis C, hepatitis B, and HIV infection. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (2): 8-24.
- ¹⁹ Herbein G, O'Brien WA. Tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223 (3): 241-256.
- ²⁰ Gervaziev YV, Kaznacheev VA, Gervazieva VB. Allelic polymorphisms in the interleukin-4 promoter regions and their association with bronchial asthma among the Russian population. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 257-264.
- ²¹ Packer BR, Yeager M, Burdett L, Welch R, Beerman M, Qi L et al. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation, assay development,
-

-
- and frequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res* 2000; 34. Database issue: D617-D621. Assay # 003_1232.
- ²² Strassberg SS, Cristea IA, Qian D, Parton LA. Single nucleotide polymorphisms of tumor necrosis factor- α and the susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42: 29-36.
- ²³ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992; 41:RR-17.
- ²⁴ Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 2004; 50 (10): 1748-1754.
- ²⁵ Nakayama EE, Meyer L, Iwamoto A, Persoz A, Nagai Y, Rouzioux C et al. Protective effect of interleukin-4 – 589T polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 disease progression: relationship with virus load. *J Infect Dis* 2002; 185: 1183-1186.
- ²⁶ Kwa D, van Rij RP, Boeser-Nunnink B, Vingerhoed J, Schuitemaker H. Association between an interleukin-4 promoter polymorphism and the acquisition of CXCR4 using HIV-1 variants. *AIDS* 2003; 17 (7): 981-985.
- ²⁷ Chatterjee A, Rathore A, Dhole TN. Association of IL-4 589 C/T promoter and IL-4R α I50V receptor polymorphism with susceptibility to HIV-1 infection in North Indians. *J Med Virol* 2009; 81: 959-965.
-

-
- ²⁸ Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N et al. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol* 2000; 74 (12): 5452-5459.
- ²⁹ Singh KK, Hughes MD, Chen J, Spector SA. Lack of protective effects of interleukin-4 -589-C/T polymorphism against HIV-1-related disease progression and central nervous system impairment, in children. *J Infect Dis* 2004; 189: 587-592.
- ³⁰ Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtioni ES. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *Eur J Immunogenet* 2003; 30: 5-10.
- ³¹ Trejaut JA, Tsai Z-U, Lee H-L, Chen Z-X, Lin M. Cytokine gene polymorphisms in Taiwan. *Tissue Antigens* 2004; 64: 492-499.
- ³² Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Dutka J, TerIM et al. Correlation of IL-1alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scand J Immunol* 2007; 65: 265-270.
- ³³ Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL et al. TNF- α promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis* 2005; 191: 969-976.
- ³⁴ Pappachan JV, Coulson TG, Child NJA, Markham DJ, Nour SM, Pulletz MCK et al. Mortality in adult intensive care patients with severe systemic inflammatory response syndromes is strongly associated with hipo-immune *TNF* -238A polymorphism. *Immunogen* 2009; 61: 657-662.
-

-
- ³⁵ Jang WH, Yang YI, Yea SS, Lee YJ, Chun JH, Kim HI et al. The -238 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett* 2001; 166: 41-46.
- ³⁶ Maher B, Alfirevic A, Vilar FJ, Wilkins EGL, Park BK, Pirmohamed M. TNF- α promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *AIDS* 2002; 16: 2013-2018.
- ³⁷ Ugliarolo AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG et al. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor- α gene promoter. *Tissue Antigens* 1998. 52 (4): 359-367.
- ³⁸ Ramos EM, Lin MT, Larson EB, Maezawa I, Tseng LH, Edwards KL et al. Tumor necrosis factor α and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 1165-1169.
- ³⁹ Hirankarn N, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn. Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF-alpha gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population. *Int J Immunogenet* 2007; 34: 425-430.
- ⁴⁰ Delgado JC, Leung JY, Baena A, Clavijo OP, Vittinghoff E, Buchbinder S et al. The -1030/-862-linked TNF promoter single-nucleotide polymorphisms are associated with the inability to control HIV-1 viremia. *Immunogenetics*. 2003; 55: 497-501.
-

Anexos

4 Anexos

4.1 Dados gerais dos pacientes portadores do HIV incluídos no estudo.

EP	Sexo ¹	Idade (anos)	Etnia ²	Opção sexual ³	Anos HIV ⁴	Via de contágio ⁵	CDC ⁶	Resposta ao tratamento ⁷	Linfócitos (células/mm ³)		Viremia HIV ⁸		SNP/pIL-4		SNP/pTNF- α	
									T CD ₄ ⁺	T CD ₈ ⁺	Cópias/mm ³	Log	-589	-1098	-238	-862
001	M	31	Cauc	Hetero	4	Hetero	A2	Sem HAART	582	586	21.819	4,3	TT	GT	AG	CC
002	M	58	Cauc	Hetero	11	Transfusão	A2	Sem falha	554	408	Ind	Ind	TT	TT	GG	CC
003	F	31	Cauc	Hetero	13	Hetero	A2	Sem HAART	471	771	17.961	4,3	TT	GT	GG	CC
004	M	51	Cauc	Bissexual	12	Hetero	A3	Com falha	180	584	5.833	3,8	CT	TT	GG	CC
005	F	49	Cauc	Hetero	11	Hetero	C3	Inclassificável	975	721	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
006	F	64	Cauc	Hetero	1	Hetero	A3	Sem falha	284	383	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
007	M	70	Cauc	Hetero	2	Hetero	C3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CC	TT	GG	CC
008	M	41	Cauc	HSH	27	UDI	A2	Sem HAART	410	2189	136.871	5,1	CT	TT	AG	CA
010	F	31	Cauc	Hetero	13	Hetero	A2	Sem falha	516	864	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
011	M	43	Cauc	Hetero	22	Hetero	B3	Sem falha	299	1560	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
012	F	41	Cauc	Hetero	13	Hetero	n.d.	Com falha	327	1081	4.645	3,7	CC	TT	GG	CC
013	M	41	Cauc	Hetero	18	Hetero	C3	Inclassificável	101	607	Ind	Ind	CC	GT	GG	CC
014	F	57	Cauc	Hetero	19	Hetero	A2	Com falha	327	1126	1.946	3,3	CT	TT	GG	CC
015	M	61	Cauc	Hetero	14	Hetero	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CC	TT	GG	CC
016	M	38	Cauc	Hetero	10	Outro	B3	n.d.	373	2186	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
017	F	30	Cauc	Hetero	10	Hetero	A2	Sem falha	1145	1280	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
018	M	29	Cauc	Hetero	21	Transfusão	A3	Inclassificável	1232	1967	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
019	M	48	Cauc	Hetero	2	Hetero	C3	Sem falha	715	1601	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
020	M	29	Cauc	HSH	8	Homo	A2	Sem falha	467	530	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
021	F	45	Pardo	Hetero	15	Hetero	A2	Sem falha	733	613	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
022	F	31	Cauc	Hetero	12	Hetero	C2	Inclassificável	363	877	944	3	CT	TT	GG	CA
023	M	26	Cauc	Hetero	3	Hetero	A2	Sem falha	282	560	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
024	M	43	Cauc	HSH	7	Homo	C3	Sem falha	567	1368	Ind	Ind	CT	TT	GA	CC
025	M	48	Cauc	Bissexual	21	Hetero	C3	Com falha	490	525	394	2,6	CC	TT	GG	CC
026	M	38	Cauc	Hetero	20	Hetero	C3	Sem HAART	113	2888	8.914	4	CT	TT	GA	CC
027	F	30	Cauc	Hetero	6	Hetero	C3	Sem falha	723	1393	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
028	M	41	Cauc	Hetero	3	Hetero	C3	Sem falha	181	267	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA

EP	Sexo ¹	Idade (anos)	Etnia ²	Opção sexual ³	Anos HIV ⁴	Via de contágio ⁵	CDC ⁶	Resposta ao tratamento ⁷	Linfócitos (células/mm ³)		Viremia HIV ⁸		SNP/pIL-4		SNP/pTNF- α	
									T CD ₄ ⁺	T CD ₈ ⁺	Cópias/mm ³	Log	-589	-1098	-238	-862
029	F	34	Índ	Hetero	13	Hetero	B2	Inclassificável	835	1383	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
030	F	40	Pardo	Hetero	17	UDI	B?	Inclassificável	764	1454	606	2,8	CT	TT	GG	CA
031	M	50	Oriental	HSH	18	Homo	A1	Com falha	453	1255	2.294	3,4	CT	TT	GG	CC
032	M	41	Cauc	HSH	10	Homo	C3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CC	TT	GG	CC
033	F	23	Pardo	Hetero	0	Hetero	C3	Inclassificável	176	405	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
034	M	29	Cauc	Hetero	2	Hetero	C2	Sem falha	564	1005	Ind	Ind	CC	TT	GA	CC
035	M	35	Cauc	Hetero	13	Hetero	C2	Sem falha	614	1059	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
036	F	23	Cauc	Hetero	6	Hetero	C2	Com falha	720	1261	242	2,4	TT	GT	GG	CC
037	M	29	Índio	Bissexual	2	Hetero	C3	Sem falha	319	641	Ind	Ind	TT	GT	GG	CC
038	M	41	Cauc	HSH	1	Homo	A1	Sem HAART	672	1078	7.951	3,9	TT	TT	GG	CC
039	F	38	Cauc	Hetero	10	Hetero	A1	Sem falha	983	1372	Ind	Ind	CT	GT	GG	CC
040	M	69	Cauc	Hetero	16	Hetero	C3	Sem falha	388	391	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
041	M	32	Cauc	Hetero	13	Hetero	C3	Com falha	449	1777	10.451	4	CC	TT	GG	CC
042	M	39	Cauc	Bissexual	8	Homo	C3	Inclassificável	717	1454	Ind	Ind	TT	TT	GG	CC
043	M	49	Afro	Hetero	10	Hetero	C3	Sem falha	500	587	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
044	F	28	Pardo	Hetero	6	Hetero	B2	Sem falha	885	758	Ind	Ind	TT	TT	GA	CC
045	M	34	Cauc	Hetero	12	Hetero	B2	Sem falha	1050	1309	Ind	Ind	CT	TT	GG	AA
046	M	34	Pardo	Hetero	4	Hetero	C3	Inclassificável	160	1009	687	2,8	CT	TT	GG	CC
047	M	42	Cauc	Bissexual	13	Homo	B2	Sem falha	1142	1792	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
048	F	41	Cauc	Hetero	15	Hetero	C3	Com falha	10	278	182.845	5,3	CC	GT	GA	CA
049	M	33	Pardo	Hetero	12	Hetero	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CC	TT	GG	CC
050	M	46	Cauc	Bissexual	14	Hetero	C2	Com falha	348	1072	456	2,7	CT	TT	GG	CC
051	F	35	Cauc	Hetero	1	Hetero	B3	Sem falha	112	464	Ind	Ind	TT	TT	GA	CC
052	F	38	Afro	Hetero	13	Hetero	C3	Sem falha	597	746	Ind	Ind	CC	GT	GA	CA
053	M	52	Cauc	Hetero	8	Hetero	C3	Sem falha	455	654	53	1,7	CT	GT	GG	CC
054	M	39	Cauc	Hetero	2	Hetero	A?	Inclassificável	588	961	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
055	F	27	Afro	Hetero	10	Transfusão	C2	Sem HAART	322	155	Ind	Ind	CC	TT	GA	CA
056	F	34	Cauc	Hetero	5	Hetero	C3	Inclassificável	152	860	2.412	3,4	CT	TT	GG	CA
057	F	41	Cauc	Hetero	7	Hetero	A2	Sem falha	582	1037	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
058	F	27	Cauc	Hetero	7	Hetero	B2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CC	TT	GG	CA
059	F	33	Cauc	Hetero	0	Hetero	A2	Sem HAART	447	1325	249	2,4	CC	TT	GG	CC

EP	Sexo ¹	Idade (anos)	Etnia ²	Opção sexual ³	Anos HIV ⁴	Via de contágio ⁵	CDC ⁶	Resposta ao tratamento ⁷	Linfócitos (células/mm ³)		Viremia HIV ⁸		SNP/pIL-4		SNP/pTNF- α	
									T CD ₄ ⁺	T CD ₈ ⁺	Cópias/mm ³	Log	-589	-1098	-238	-862
060	M	31	Afro	Hetero	2	Hetero	C2	Sem falha	636	251	59	1,8	TT	TT	GG	CA
061	F	32	Afro	Hetero	3	Hetero	A2	Sem HAART	451	7601	7.601	3,9	CC	TT	GG	CC
062	F	30	Cauc	Hetero	17	Hetero	C3	Com falha	411	1707	761	2,9	CC	TT	GG	CC
063	F	32	Afro	Hetero	16	Hetero	A3	n.d.	114	427	167.916	5,2	TT	GT	GA	CC
064	M	52	Pardo	Hetero	17	Hetero	B3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CC	TT	GA	CC
065	M	28	Pardo	Hetero	8	Hetero	C3	Inclassificável	163	1034	205	2,3	CC	TT	GG	CC
066	M	46	Pardo	Hetero	5	Hetero	A3	Inclassificável	545	1223	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
067	M	68	Pardo	Hetero	14	Hetero	A3	Sem falha	676	3166	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
068	F	46	Afro	Hetero	1	Hetero	C3	Sem falha	367	463	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
069	M	46	Cauc	Bissexual	2	Homo	C2	Inclassificável	421	1191	174	2,2	CT	TT	GG	CC
070	M	44	Cauc	Hetero	18	Hetero	C3	Sem falha	159	999	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
071	M	51	Cauc	Bissexual	22	Homo	C2	Inclassificável	437	1229	72	1,9	CC	TT	GG	CC
072	F	24	Cauc	Hetero	24	Vertical	C2	Sem falha	n.d.	n.d.	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
073	F	57	Cauc	Hetero	6	Hetero	C3	Com falha	81	565	24.835	4,4	CT	TT	GG	CA
074	M	46	Cauc	Hetero	n.d.	Hetero	C3	Sem falha	571	1063	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
075	M	51	Cauc	Hetero	0	Hetero	B2	Inclassificável	328	716	4.914	3,7	CT	TT	GG	CC
076	F	26	Cauc	Hetero	0	Hetero	A1	Sem HAART	1380	2005	91	2	CC	TT	GG	CC
077	M	27	Cauc	Hetero	0	Hetero	C3	Inclassificável	741	1045	114	2,1	CT	GT	GG	CC
078	M	69	Cauc	Hetero	6	Hetero	C3	Sem falha	621	903	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
079	F	57	Pardo	Hetero	n.d.	Outro	C3	Sem falha	1778	1457	Ind	Ind	TT	TT	GG	CA
080	M	45	Afro	Bissexual	13	Homo	C3	Com falha	298	2915	6.478	3,8	CT	TT	GA	CA
081	M	48	Pardo	Hetero	17	UDI	C3	Sem falha	377	606	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
082	F	35	Cauc	Hetero	5	Hetero	A2	Sem falha	789	818	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
083	M	44	Cauc	Hetero	5	Hetero	A3	Sem falha	744	701	Ind	Ind	TT	GT	GG	CA
084	M	46	Cauc	Hetero	3	Hetero	B3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	CT	GT	GG	CA
085	M	48	Cauc	Hetero	10	Hetero	C3	Sem falha	469	1087	Ind	Ind	TT	TT	GG	CA
087	M	42	Cauc	Hetero	11	Hetero	C3	Com falha	347	1598	233	2,4	CC	TT	GG	CA
088	F	37	Cauc	Bissexual	10	Hetero	C3	Sem falha	531	550	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
089	M	44	Pardo	Hetero	5	Hetero	C3	Sem falha	731	925	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
090	F	50	Cauc	Hetero	5	Hetero	A2	n.d.	380	345	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
091	F	35	Cauc	Hetero	16	Hetero	C3	Sem falha	730	895	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC




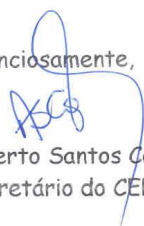
EP	Sexo ¹	Idade (anos)	Etnia ²	Opção sexual ³	Anos HIV ⁴	Via de contágio ⁵	CDC ⁶	Resposta ao tratamento ⁷	Linfócitos (células/mm ³)		Viremia HIV ⁸		SNP/pIL-4		SNP/pTNF- α	
									T CD ₄ ⁺	T CD ₈ ⁺	Cópias/mm ³	Log	-589	-1098	-238	-862
092	F	33	Cauc	Hetero	17	Hetero	C3	Inclassificável	838	1045	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
093	F	38	Pardo	Hetero	5	Hetero	A2	Sem HAART	438	906	7.318	3,9	CT	TT	GA	CC
094	F	48	Cauc	Hetero	18	Hetero	C3	Inclassificável	273	748	918	3	CT	TT	GA	CC
095	M	34	Cauc	HSH	8	Homo	C3	Sem falha	456	1403	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
096	M	39	Pardo	Hetero	9	Homo	C3	Sem falha	660	898	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
097	M	61	Cauc	Hetero	5	Hetero	C3	Sem falha	293	823	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
098	F	40	Cauc	Hetero	10	Hetero	A2	Inclassificável	480	826	533	2,7	CC	TT	GG	CC
099	M	28	Cauc	Hetero	2	Hetero	C3	Sem falha	222	342	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
100	F	48	Cauc	Hetero	9	Hetero	A2	Sem falha	784	1010	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
101	M	48	Pardo	Hetero	9	Hetero	C3	Sem falha	525	1362	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
102	M	38	Cauc	Hetero	17	Hetero	C3	Sem falha	1073	1840	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
103	F	29	Cauc	Hetero	7	Hetero	A3	Sem HAART	191	512	24.886	4,4	CC	GT	GG	CC
104	M	44	Cauc	Bissexual	22	Homo	C3	Sem falha	579	3219	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
105	M	35	Cauc	Hetero	4	Hetero	A1	Sem HAART	775	1543	15.471	4,2	CC	TT	GG	CC
106	M	39	Cauc	Hetero	15	UDI	C3	n.d.	252	1075	9.403	4	CT	TT	GG	CC
107	F	58	Cauc	Hetero	23	Transfusão	B3	Sem falha	582	1349	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
108	M	39	Cauc	Hetero	13	Hetero	A2	Sem HAART	434	908	4.322	3,6	CT	TT	GA	CC
109	F	49	Pardo	Hetero	1	Hetero	C2	Sem HAART	534	1359	93.924	5	CC	GT	GG	CC
110	F	56	Cauc	Hetero	10	Hetero	A2	Sem falha	965	631	Ind	Ind	CC	GT	GG	CA
111	F	35	Cauc	Hetero	1	Hetero	C3	Sem falha	228	658	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
112	F	42	Pardo	Hetero	9	Hetero	C3	Sem falha	170	664	Ind	Ind	CT	GT	GG	CC
113	M	40	Cauc	Hetero	6	Hetero	B3	Com falha	127	414	39.766	4,6	TT	TT	GG	CC
114	M	43	Cauc	HSH	4	Homo	A2	n.d.	518	751	330	2,5	TT	TT	GA	CA
115	M	34	Cauc	HSH	13	Homo	C3	Com falha	355	975	7.082	3,9	CC	TT	GG	CA
116	M	58	Cauc	Hetero	2	Hetero	C3	n.d.	467	657	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
117	M	54	Cauc	HSH	14	Homo	A1	n.d.	567	1884	697	2,8	CT	TT	GG	CC
118	F	47	Cauc	Hetero	10	Hetero	A2	Com falha	704	1521	11.746	4,1	CT	TT	GG	CC
119	M	38	Cauc	Hetero	15	Hetero	C3	Com falha	270	567	74.035	4,9	CC	TT	GA	CA
120	M	46	Cauc	Bissexual	1	Hetero	B3	n.d.	49	1287	265.149	5,4	CT	TT	GG	CA
121	F	32	Oriental	Hetero	0	Hetero	C3	Sem HAART	288	1082	7.439	3,9	CT	TT	GA	CC
122	M	33	Cauc	HSH	2	Homo	A3	Sem HAART	5	204	54.569	4,7	CT	TT	GG	CC

EP	Sexo ¹	Idade (anos)	Etnia ²	Opção sexual ³	Anos HIV ⁴	Via de contágio ⁵	CDC ⁶	Resposta ao tratamento ⁷	Linfócitos (células/mm ³)		Viremia HIV ⁸		SNP/pIL-4		SNP/pTNF- α	
									T CD ₄ ⁺	T CD ₈ ⁺	Cópias/mm ³	Log	-589	-1098	-238	-862
123	M	65	Cauc	Bissexual	2	Homo	A2	Sem HAART	369	2550	166.136	5,2	CT	TT	GG	CC
124	M	31	Cauc	Hetero	5	Hetero	n.d.	n.d.	104	417	266	2,4	CT	TT	GG	CC
125	F	17	Afro	Hetero	1	Hetero	B2	Sem HAART	290	526	51.587	4,7	CT	TT	GG	CC
126	M	33	Oriental	Hetero	2	Hetero	C3	Sem falha	478	792	Ind	Ind	CT	GT	GA	CC
127	M	24	Cauc	Hetero	2	Hetero	A1	Sem HAART	500	1435	5.087	3,7	CC	TT	GG	CC
128	F	43	Cauc	Hetero	1	Hetero	A2	Inclassificável	318	600	122	2,1	CC	TT	GG	CC
129	F	41	Afro	Hetero	9	Hetero	C3	Sem falha	727	872	Ind	Ind	CT	TT	GA	CC
130	F	33	Cauc	Hetero	5	Hetero	A2	Sem falha	947	1394	Ind	Ind	CT	TT	GA	CC
131	M	48	Cauc	HSH	11	Hetero	A1	n.d.	1127	1068	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
132	F	52	Pardo	Hetero	13	Hetero	A2	Sem falha	801	1009	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
133	F	46	Pardo	Hetero	0	Hetero	B3	Inclassificável	120	493	83	1,9	CC	TT	GG	CA
134	F	26	Afro	Hetero	5	Hetero	A2	Sem falha	788	1087	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC
135	F	48	Cauc	Hetero	6	Hetero	C2	Sem falha	628	1089	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
137	M	36	Cauc	Hetero	13	Hetero	C3	Sem falha	127	385	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
138	M	39	Afro	Hetero	10	Hetero	A2	n.d.	498	797	318	2,5	CT	TT	GA	CC
139	M	45	Cauc	Hetero	15	Hetero	C3	Sem falha	568	1155	Ind	Ind	TT	TT	GG	CA
140	M	35	Afro	Bissexual	1	Homo	C3	Inclassificável	172	643	Ind	Ind	TT	TT	GG	CC
141	F	26	Pardo	Hetero	5	Hetero	C3	Inclassificável	121	254	270.081	5,4	CT	TT	GG	CC
142	M	35	Cauc	Bissexual	1	Homo	C3	Sem falha	142	403	Ind	Ind	TT	TT	GG	CC
143	F	29	Cauc	Hetero	11	Hetero	A2	n.d.	777	1550	972	3	CT	TT	GG	CA
144	M	39	Afro	Hetero	4	Hetero	n.d.	n.d.	349	971	Ind	Ind	TT	TT	GG	CC
145	F	46	Cauc	Hetero	15	Hetero	A1	n.d.	423	3378	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
146	M	43	Cauc	Hetero	9	UDI	C3	Sem falha	641	1494	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
147	F	45	Cauc	Hetero	4	Hetero	A3	Com falha	549	1518	15.198	4,2	TT	TT	GG	CA
148	F	29	Pardo	Hetero	9	Hetero	C3	Com falha	260	804	410	2,6	CC	TT	GG	CC
149	M	51	Cauc	Hetero	12	Hetero	A1	Inclassificável	360	459	Ind	Ind	CT	TT	GG	CA
150	F	41	Pardo	Hetero	5	Hetero	A2	Sem HAART	460	799	1.185	3,1	CT	TT	GG	CC
151	M	48	Cauc	Bissexual	1	Hetero	A3	n.d.	189	640	n.d.	n.d.	CC	GT	GG	CA
152	M	28	Pardo	Bissexual	9	Hetero	A3	n.d.	104	579	n.d.	n.d.	CT	TT	GG	CC
153	M	48	Pardo	Hetero	8	Hetero	A3	n.d.	72	392	Ind	Ind	CT	TT	GG	CC
154	M	36	Pardo	Bissexual	7	Homo	C3	n.d.	96	1789	n.d.	n.d.	CT	TT	GG	CC

EP	Sexo ¹	Idade (anos)	Etnia ²	Opção sexual ³	Anos HIV ⁴	Via de contágio ⁵	CDC ⁶	Resposta ao tratamento ⁷	Linfócitos (células/mm ³)		Viremia HIV ⁸		SNP/pIL-4		SNP/pTNF- α	
									T CD ₄ ⁺	T CD ₈ ⁺	Cópias/mm ³	Log	-589	-1098	-238	-862
155	M	41	Cauc	Bissexual	n.d.	Hetero	C3	Com falha	735	1381	117.115	5,1	CC	TT	GG	CC
156	M	46	Pardo	HSH	2	Homo	C3	n.d.	287	2607	37.697	4,6	CC	TT	GG	CC
157	F	32	Cauc	Hetero	7	Hetero	A3	Sem falha	302	610	Ind	Ind	CT	GT	GG	CA
158	M	49	Cauc	Hetero	20	Hetero	B3	Sem falha	649	789	Ind	Ind	CC	TT	GG	CA
159	F	35	Afro	Hetero	2	Hetero	A3	n.d.	763	1317	7.247	3,9	TT	TT	GG	CC
160	M	37	Cauc	HSH	2	Homo	A3	Inclassificável	252	901	Ind	Ind	CC	TT	GG	CC

⁽¹⁾M: masculino, F: feminino; ⁽²⁾Cauc: caucasianos, Afro: afro-descendente; ⁽³⁾Hetero: heterossexuais, HSH: homem que teve relação sexual com homem; ⁽⁴⁾Tempo estimado de infecção (em anos completos); ⁽⁵⁾Hetero: relação heterossexual, Homo: relação homossexual, Transfusão: transfusão sanguínea, UDIs: compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas por usuários de drogas injetáveis, Vertical: transmissão vertical; ⁽⁶⁾Classificação do estágio da infecção pelo HIV segundo os Centros de Controle de Doenças dos EUA; ⁽⁷⁾Sem HAART: pacientes sem tratamento antirretroviral há pelo menos 6 meses; Sem falha: pacientes sob tratamento antirretroviral e sem falha terapêutica virológica (viremia HIV inferior a 50 cópias/mL após pelo menos 6 meses utilizando continuamente o mesmo esquema de drogas); Com falha: pacientes sob tratamento antirretroviral e com falha terapêutica virológica (viremia HIV detectável/superior a 50 cópias/mL após pelo menos 6 meses utilizando tratamento antirretroviral continuamente); ⁽⁸⁾Ind: indetectável.

4.2 Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB – UNESP, Botucatu.

	Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br		 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997
Botucatu, 01 de setembro de 2008		Of. 374/08-CEP
 Ilustríssimo Senhor Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira Departamento de Patologia Faculdade de Medicina de Botucatu		
 Prezado Dr. Deilson,		
 De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Infecção por gamaherpervírus e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes codificadores de citocinas em pacientes portadores de HIV-1", a ser coordenado por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Drs. Alexandre Naime Barbosa, Ana Paula Ferraz da Silva, Ana Rachel de Oliveira Léda, Domingos Alves Meira, Lenice do Rosário de Souza, Ricardo Antonio Moreira de Barros Almeida e Suzana Ramos da Silva, recebeu do relator parecer favorável , aprovado em reunião de 01/09/2008.		
Situação do Projeto: APROVADO. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.		
 Atenciosamente, 		
Alberto Santos Capelluppi Secretário do CEP.		

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)