



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *FAS* E *FASL* EM  
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA  
HUMANA-1 (HIV-1)***

RENATA BEZERRA HERMES

Belém-Pará

2009

**RENATA BEZERRA HERMES**

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *FAS* E *FASL* EM  
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA  
HUMANA-1 (HIV-1)***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto.

Belém-Pará

2009

RENATA BEZERRA HERMES

INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *FAS* E *FASL* EM  
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA-1*  
(HIV-1)

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Rosa Cabral  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maristela Gomes da Cunha  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Ricardo Ishak  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. José Alexandre R. Lemos (Suplente)  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 27 de abril de 2009.

**Aos meus pais Ivan e Cleide.**

**Aos meus irmãos Rodrigo e Tatiana.**

**A minha avó Eunice e ao meu avô Cândido (*in memoriam*).**

**Ao meu amor, amigo e companheiro Jairo.**

## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa vencida, e mais uma vez tenho, graças a Deus, muitos a quem deixar o meu muito obrigada.

Obrigada às instituições financiadoras do projeto, CNPq e Capes pelo apoio financeiro durante esta jornada.

À Unidade de Referência Especializada em Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais – URE DIPE o meu muito obrigado por permitir o desenvolvimento desta pesquisa com os pacientes atendidos nesta instituição e principalmente à eles, os quais foram essenciais no desenvolvimento desta pesquisa, e à quem todo este trabalho é dedicado.

Obrigada aos laboratórios de Análises Clínicas e de pesquisa e seus funcionários que participaram deste projeto como voluntários na constituição do grupo controle, a colaboração de vocês foi muito importante.

Ao Laboratório de Virologia que me acolheu desde o início da minha jornada, ainda na iniciação científica, e me ensinou a fazer pesquisa e ser apaixonada por tudo isso. Professores Ricardo Ishak, Antonio Vallinoto, Luiz Fernando Machado, Marluísa Ishak, e Vânia Nakuth muito obrigada por tudo que me foi ensinado ao longo de todos esses anos, pelo incentivo, pela confiança e principalmente pelo exemplo que vocês são.

Não posso deixar de agradecer aos amigos que conquistei no Laboratório de Virologia, os quais me proporcionaram dias muito agradáveis, com as brincadeiras, ajuda, companheirismo e muito apoio. Lucinda, Elizabete, Núbia Caroline, Carolina Miranda, Bárbara, Rafaela, Tati, Andréa, Di Paula, Paulinha, Rosimar, Simone, Felipe, Larissa, Izete, Jacqueline, Ethienne, Aubaneide, Regiane, Érica, Tany, Léo, Lúcio, Iran,

Jamilla, Luana, Juliana, Irlis, Isabella, Priscila, Samara, Maria Helena, Sandra, Steffany e Yuri muito obrigada a todos vocês por fazerem eu me sentir “em casa” quando estou com vocês. Amo vocês!!!

Em especial agradeço àqueles que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho. Di Paula, Regiane, Helena e Andréa pela grande ajuda na coleta das amostras dos pacientes; Maria Helena e Felipe pelos resultados da carga viral; Jamilla, Samara e Priscilla pela quantificação das células T CD4<sup>+</sup>; Lucinda pela coleta das amostras da população controle; Ana Cássia pela ajuda na extração do DNA e um agradecimento muito mais que especial à duas pessoas que contribuíram muito na etapa final deste projeto, Rafa e Bárbara, a participação de vocês foi essencial, muito obrigada pela ajuda nas coletas da população controle, nas extrações de DNA, e pelos infinitos PCR's, digestões e géis, nem sei como retribuir o apoio de vocês, muito obrigada mesmo. Foi muito bom contar com a ajuda de todos vocês, e o melhor, todo o nosso trabalho valeu a pena.

Agradeço ao meu orientador, Professor Antonio Carlos Vallinoto, que me acompanha desde a iniciação científica, por tudo que me ensinou, pelo apoio, incentivo e confiança que a mim foi depositada mais uma vez. Obrigada por hoje eu poder dizer que faço pesquisa, há uma enorme participação sua nessa conquista, por isso deixo os meus sinceros agradecimentos e admiração.

Às minhas amigas do coração, Lucinda, Elizabete, Núbia Caroline e Jacqueline por quem tenho um carinho muito especial. Estamos juntas em mais uma conquista nas nossas vidas. Primeiro a aprovação no mestrado, depois as inúmeras disciplinas e seminários, a qualificação, as apresentações nos congressos, e agora a defesa da dissertação. Amigas, sobrevivemos a tudo isso e agora somos mestras! Lu,

Bete, Carol e Jack, muito obrigada pelo carinho, amor, incentivo, confiança e por tudo que vivemos juntas. Amo vocês!

À minha família, meu alicerce, que mesmo com alguns desentendimentos (como em todas as famílias), sempre me apoiou e me incentivou, principalmente na minha carreira acadêmica e apesar de não compreenderem profundamente o meu trabalho, sempre se orgulharam de mim. Vó, Vô (eu sei que mesmo daí de cima você esta orgulhoso e feliz por mim), Mãe, Pai, Rodrigo, Tati, Laura, Tia Claudia, Victinho, Juninho, Tia Cleonice, Tio Claudio, Tia Arlete, Tia Cléa, Paty, Tia Nila, Tio Marito, Tio Cléo e Tio Ivanildo, muito obrigada por simplesmente tudo. Em especial, agradeço à minha mãezinha, que fez todo o esforço que pode por sempre acreditar que eu iria além. Mãe, te amo!

Um agradecimento muito especial àquele por quem tenho um misto de sentimentos: amor, paixão, amizade, carinho e companheirismo, como costumo dizer, o meu amor, amigo e companheiro Jairo. Tenho muito a agradecer pelas palavras de conforto e incentivo que sempre recebo no momento certo; pela confiança, e por sempre acreditar no meu potencial, me incentivando sempre a ir mais longe, sempre dizendo “Você terá um futuro brilhante”. *Meu*, muito obrigada por dividir comigo todos os momentos, por compreender quando eu preciso estudar o final de semana inteiro, quando preciso sair tarde da universidade, e por você estar sempre de braços abertos quando preciso do teu colo. Sou muito abençoada por ter alguém como você ao meu lado, obrigada por todo o amor e carinho com que sempre me tratou. Te amo... “mais que tudo nessa vida”!

Aos meus amigos de infância por todos os momentos felizes que vivemos juntos, afinal, como eles sempre me dizem, a vida não é só estudar (risos). Denise,

Milena, Dani, Pedro, Jefferson, Raoni e Sara obrigada pelas gargalhadas e por toda a história que temos guardada em nossa memória, e ainda, pelo muito que vamos viver!

Não posso esquecer a inesquecível Biomedicina 2003, afinal de contas, foi onde a minha paixão pela Biomedicina teve início, e vocês contribuíram muito para cada passo que eu dava adiante, em especial Giselle, Lucinda, Vânia e Julio, são tantas as saudades dos trabalhos, brigas e gargalhadas. As lembranças desta turma estarão comigo, sempre.

À turma do mestrado 2007 pelo companheirismo, apoio e por todos os momentos felizes que passamos juntos.

À banca examinadora pelas valiosas sugestões e trabalho dedicado a avaliação do presente estudo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta dissertação tornar-se realidade, os meus sinceros agradecimentos.

Meu Deus, muito obrigada por poder estar conquistando mais uma vitória, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	12
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	14
<b>RESUMO</b> .....	16
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 <i>O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1)</i> .....	18
<b>1.1.1 Biologia do HIV-1</b> .....	19
1.1.1.1 Morfologia do HIV-1 .....	19
1.1.1.2 Genoma do HIV-1 .....	20
1.1.1.3 Replicação do HIV-1 .....	22
<b>1.1.2 Epidemiologia da infecção pelo HIV</b> .....	25
1.1.2.1 Distribuição geográfica .....	25
1.1.2.2 Transmissão do HIV-1 .....	26
<b>1.1.3 Patogênese da infecção pelo HIV-1</b> .....	28
<b>1.1.4 Resposta imune à infecção pelo HIV-1</b> .....	30
1.1.4.1 Resposta humoral .....	30
1.1.4.2 Resposta celular .....	32
<b>1.1.5 Mecanismos de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> .....	34
1.2 APOPTOSE .....	36
<b>1.2.1 Mecanismos de apoptose</b> .....	38
<b>1.2.2 Apoptose na infecção pelo HIV-1</b> .....	43
1.3 O RECEPTOR APOPTÓTICO FAS E SEU LIGANTE FASL .....	45

<b>1.3.1 Histórico</b> .....	45
<b>1.3.2 O receptor FAS</b> .....	46
<b>1.3.3 O ligante de FAS (FASL)</b> .....	48
<b>1.3.4 Caracterização molecular do receptor FAS e seu ligante FASL</b> .....	49
1.3.4.1 Polimorfismos genéticos de <i>FAS</i> e <i>FASL</i> .....	51
<b>1.4 SISTEMA FAS/FASL E A INFECÇÃO PELO HIV-1</b> .....	53
<b>1.5 OBJETIVOS</b> .....	56
<b>1.5.1 Objetivo geral</b> .....	56
<b>1.5.2 Objetivos específicos</b> .....	56
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
<b>2.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAS</b> .....	57
<b>2.1.1 Indivíduos soropositivos para HIV-1</b> .....	57
<b>2.1.2 Indivíduos controles soronegativos para o HIV-1/2</b> .....	58
<b>2.1.3 Aspectos éticos</b> .....	58
<b>2.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HIV-1/2</b> .....	59
<b>2.3 MONITORAMENTO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1</b> .....	59
<b>2.3.1 Quantificação da carga viral plasmática</b> .....	59
<b>2.3.2 Quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup></b> .....	59
<b>2.4 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR</b> .....	59
<b>2.4.1 Extração do DNA</b> .....	59
<b>2.4.2 Investigação molecular das formas alélicas dos genes <i>FAS</i> e <i>FASL</i></b> .....	60
2.4.2.1 Identificação do polimorfismo na posição -670 <i>FAS</i> .....	60
2.4.2.2 Identificação do polimorfismo IVS2nt-124 <i>FASL</i> .....	60
2.4.2.3 Identificação do polimorfismo IVS3nt-169 <i>FASL</i> .....	61

2.4.2.4 Eletroforese .....	62
2.5 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	64
<b>3 RESULTADOS</b> .....	65
3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS .....	65
3.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4 <sup>+</sup> E T CD8 <sup>+</sup> .....	68
3.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA DO HIV-1 .....	79
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	91
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	93
<b>ANEXO 01</b> .....	129
<b>ANEXO 02</b> .....	130
<b>ANEXO 03</b> .....	132

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo -670 <i>FAS</i> (A>G) entre os grupos investigados .....	66
Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo -124 <i>FASL</i> (A>G) entre pacientes infectados pelo HIV-1 e indivíduos soronegativos .....	67
Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo -169 <i>FASL</i> ( <i>T&gt;delT</i> ) entre os grupos analisados.....	68
Tabela 4 – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.....	70
Tabela 5 – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.....	71
Tabela 6 – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1, não submetidos à TARV, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados .....	72
Tabela 7 – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 não submetidos à TARV, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.....	73
Tabela 8 – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> entre os indivíduos controles soronegativos, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.....	74

Tabela 9 – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> entre os indivíduos controles soronegativos, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.....	75
Tabela 10 – Distribuição das freqüências genóticas dos polimorfismos analisados no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o nível de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	77
Tabela 11 - Distribuição das freqüências genóticas do polimorfismo -670 <i>Fas</i> analisados no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o nível de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	78
Tabela 12 – Comparação dos níveis médios de carga viral plasmática entre os indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1 portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.....	80
Tabela 13 – Comparação dos níveis médios de carga viral plasmática entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 não submetidos à TARV, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.....	81
Tabela 14 – Distribuição das freqüências genóticas no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o nível de carga viral plasmática.....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura morfológica do HIV-1.....	19
Figura 2 – Esquema representativo do genoma do HIV-1 .....	20
Figura 3 - Replicação do HIV-1 .....	23
Figura 4 - Distribuição geográfica da prevalência do HIV.....	25
Figura 5 - Anticorpos no combate à infecção pelo HIV-1.....	31
Figura 6 - Representação esquemática das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular necrose e apoptose.....	37
Figura 7 - Indução da apoptose por estímulos internos - via mitocondrial ou intrínseca..	40
Figura 8 - Indução da apoptose por estímulos externos – Via receptor de morte ou extrínseca .....	42
Figura 9 - Representação esquemática da estrutura protéica monomérica do receptor FAS .....	46
Figura 10 – Representação esquemática da subunidade estrutural da proteína trimérica FASL.....	48
Figura 11 - Esquema representativo do gene <i>FAS</i> .....	50
Figura 12 - Esquema representativo do gene <i>FASL</i> .....	50
Figura 13 - Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima <i>MvaI</i> , a partir do fragmento amplificado de 322 pb da região promotora do gene <i>FAS</i> .....	62
Figura 14 - Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima <i>FokI</i> , a partir do fragmento amplificado de 239 pb do segundo íntron do gene <i>FASL</i> .....	63

Figura 15 - Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima <i>HincII</i> , a partir do fragmento amplificado de 185 pb do terceiro íntron do gene <i>FASL</i> .....	63
Figura 16 – Quantificação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> em indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1 e controles soronegativos.....	69

## RESUMO

No presente estudo foram investigadas as frequências dos polimorfismos nos genes *FAS* e *FASL* em um grupo de 198 indivíduos soropositivos para o HIV-1 e 191 indivíduos controles soronegativos, com o objetivo de avaliar a ocorrência de uma possível associação entre os polimorfismos nestes genes e a infecção pelo HIV-1. A identificação dos alelos *A* e *G* do polimorfismo -670 *FAS* foi realizada por meio da técnica de PCR, utilizando seqüências de iniciadores específicos e posterior digestão enzimática (RFLP) com a enzima *MvaI*. A identificação dos alelos *A* e *G* do polimorfismo -124 *FASL*, bem como *T* e *delT* do polimorfismo -169 *FASL* foi realizada através da técnica de ACRS, seguido de RFLP com as endonucleases de restrição *FokI* e *HincII*, respectivamente. As análises das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos analisados não mostraram qualquer diferença significativa entre soropositivos e soronegativos. A análise da quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo -670 *FAS* revelou uma associação significativa, sugerindo que o estado de portador do alelo *G*, em homo ou heterozigose, nos indivíduos infectados pelo HIV-1 pode ser um fator de proteção à depleção destas células no curso da infecção pelo HIV-1. As associações entre o número de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, a carga viral plasmática e os polimorfismos analisados não foram estatisticamente significantes. Desse modo, pode-se sugerir, que o polimorfismo -670 do gene *FAS*, influencie na apoptose dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no curso da infecção pelo HIV-1, assim, faz-se necessário estudos adicionais visando confirmar ou não esta associação, uma vez que a identificação desse polimorfismo pode ser, no futuro, uma importante ferramenta a ser utilizada no acompanhamento da infecção.



## ABSTRACT

The present study investigated the frequency of the polymorphisms in the *FAS* and *FASL* gene in a sample of 198 HIV-1 seropositives individuals and 191 healthy control individuals, in order to evaluate the occurrence of a possible association between the polymorphisms and HIV-1 infection. The *A* and *G* alleles identification of the -670 *FAS* polymorphism was performed through a PCR followed by restriction endonucleases analyses (RFLP), with the enzyme *MvaI*. The identification of *A* and *G* alleles of -124 *FASL* polymorphism, *T* and *delT* of the -169 *FASL* polymorphism was performed using ACRS assay, followed by RFLP with the restriction endonucleases *FokI* and *HincII*, respectively. The analysis of allele and genotype frequencies of polymorphisms examined did not show any differences between seropositives and seronegatives individuals. The analysis of the quantification of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from individuals with different genotypes of -670 *FAS* polymorphism showed a significant association, suggesting that the state of carrier of the *G* allele in homo or heterozygosity in HIV-1 individuals infected may be a protection factor from depletion of these cells in the course of HIV-1 infection. Associations between the *FAS* and *FASL* genes polymorphisms and the number of CD8<sup>+</sup> T-cells and plasma viral load were not statistically significant. These findings suggest that the -670 *FAS* gene polymorphism, influences the apoptosis of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the course of HIV-1 infection, thus it is necessary further studies to confirm or not this association since that the identification of this polymorphism may be in the future, an important tool to be used in monitoring the infection.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA I (HIV-1)

O *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) foi identificado como agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) em 1983 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984), sendo descrito como um vírus linfotrópico com afinidade preferencial para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Wei *et al.*, 1995).

O HIV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*. (ICTV, 2006). De acordo com as seqüências genéticas e propriedades sorológicas, esse vírus pode ser classificado em duas espécies: HIV-1 e HIV-2 (Coffin *et al.*, 1986, Clavel *et al.*, 1986.).

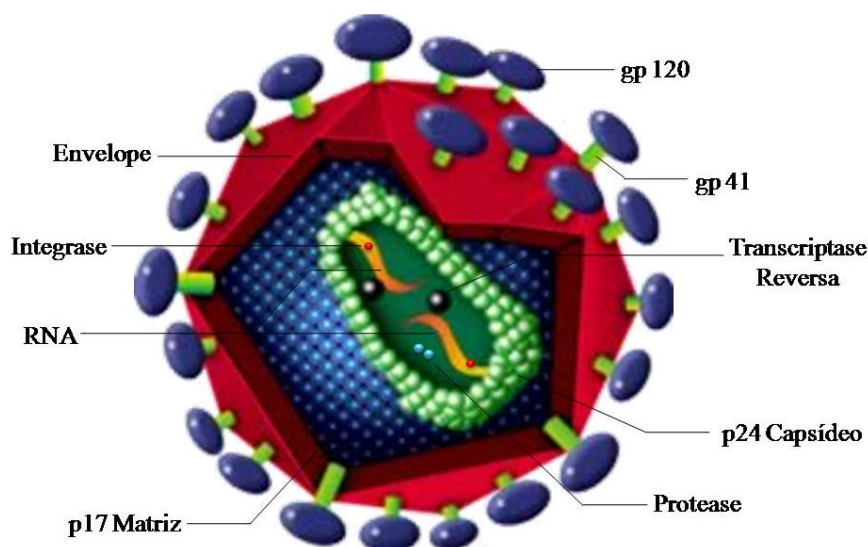
O HIV-1 é o mais disseminado pelo mundo, sendo o principal responsável pela pandemia da Aids, já o HIV-2 parece ser menos patogênico e é encontrado quase que exclusivamente na África ocidental (Hahn *et al.*, 2000).

O HIV-1 é classificado em três grupos: M (*main*), O (*outlier*) e N (*non-M, non-O*), os quais podem ser subdivididos em subtipos, além de um número crescente de formas recombinantes circulantes (CRF). O grupo M é o responsável pela maior parte das infecções no mundo e pode ser dividido em nove subtipos A-D, F-H, J e K (Gürtler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998; Osmanov *et al.*, 2002).

### 1.1.1 Biologia do HIV-1

#### 1.1.1.1 Morfologia do HIV-1

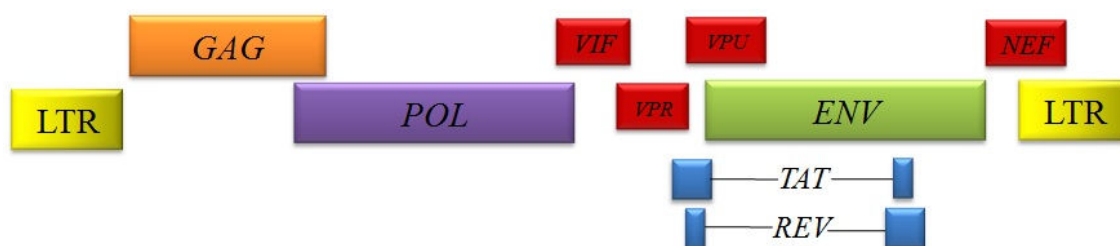
O HIV-1 é uma partícula esférica que mede aproximadamente 100 nm de diâmetro e apresenta, externamente, um envelope composto por uma bicamada lipídica oriunda da membrana da célula hospedeira acrescida das glicoproteínas virais gp120 e gp41 (Haseltine & Wong-Staal, 1988). Internamente ao envelope encontra-se a matriz viral que é formada pela proteína p17. O capsídeo viral, o qual apresenta simetria cônica, é formado pela proteína p24 e envolve duas cópias lineares de RNA genômico de fita simples, polaridade positiva e, ainda, as enzimas protease, transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e a proteína p7 de ligação ao RNA (Vaishnav & Wong-Staal, 1991). No interior do capsídeo encontram-se, ainda, as proteínas necessárias à replicação viral: p6, Vif, Vpr e Nef (Frankel & Young, 1998; Figura 1).



**Figura 1-** Estrutura morfológica do HIV-1 (Adaptado de Chemistry at Wellesley College <<http://www.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/hiv/t-hiv.GIF>>).

### 1.1.1.2 Genoma do HIV-1

O genoma do HIV-1 é constituído por duas cópias de uma molécula de RNA de fita simples (ssRNA) e de polaridade positiva medindo, aproximadamente, 9,8 kb de comprimento. É composto de nove genes, os quais são flanqueados por duas regiões terminais longas e repetitivas denominadas LTR (*Long Terminal Repeats*). Três genes são estruturais: *GAG*, *POL* e *ENV*, característicos dos retrovírus e seis são regulatórios: *TAT*, *REV*, *VIF*, *VPU*, *VPR* e *NEF* (Haseltine & Wong-Staal, 1988; Greene, 1991; Figura 2).



**Figura 2** – Esquema representativo do genoma do HIV-1 (Adaptado de Subbramanian & Cohen, 1994).

O gene *GAG* codifica um precursor de 55 kDa (Pr55<sup>Gag</sup>) que, ao ser clivado por uma protease viral durante a maturação, origina as proteínas estruturais que compõem a matriz e o capsídeo viral, P17 e P24, as proteínas mais internas do nucleocapsídeo, P7 e P6, e dois pequenos peptídeos, P1 e P2, cuja função parece estar associada com as taxas de clivagem do precursor nos sítios específicos (Wills & Craven, 1991; Pettit *et al.*, 1994; Krausslich *et al.*, 1995; Vogt, 1997; Wiegers *et al.*, 1998). O gene *POL* codifica as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase. A protease cliva os polipeptídios precursores codificados pelos genes *GAG* e pelo próprio

gene *POL*; a transcriptase reversa, além de ser responsável pela replicação do RNA viral também possui ação de RNase; e a integrase é responsável pela integração do ácido nucléico viral ao genoma celular. O gene *ENV*, por sua vez, codifica uma poliproteína precursora de 160 kDa (gp160), a qual é clivada por proteases celulares em duas subunidades, originando as glicoproteínas de superfície gp120 e transmembrana gp41 (Frankel & Young, 1998).

O genoma do HIV-1, diferentemente de outros retrovírus, possui ainda seis genes regulatórios (*TAT*, *REV*, *VIF*, *VPU*, *VPR* e *NEF*) que codificam proteínas auxiliares, as quais são capazes de regular a replicação e a infectividade viral (Subbramanian & Cohen, 1994).

Os genes *TAT* e *REV*, codificam duas proteínas reguladoras de mesmo nome, que são conhecidas como fator de transativação e fator regulador de expressão protéica, respectivamente. Mutações nesses dois genes mostraram prejudicar, significativamente, o processo de replicação, indicando que ambas são essenciais para o processo de replicação viral *in vitro* (Cullen, 1992).

Os demais genes, *VIF*, *VPU*, *VPR* e *NEF*, codificam proteínas auxiliares consideradas acessórias e não essenciais, pois apesar de modularem eventos da replicação *in vitro*, modulando a patogênese viral, são dispensáveis para a replicação viral. O gene *VIF* codifica uma proteína acessória cuja função esta associada à infectividade viral. O gene *VPU*, presente somente no HIV-1, é responsável pela codificação de uma proteína que possui a função de inibir a expressão de CD4 na célula, além de auxiliar em um brotamento eficiente do vírus. O gene *VPR* codifica um fraco fator de transcrição, que modula a transcrição da LTR do HIV-1. O gene *NEF*, por sua vez, codifica uma proteína que regula negativamente a expressão de CD4 e de MHC de

classe I na célula do hospedeiro e aumenta a infectividade viral (Willey *et al.*, 1992; Cullen, 1992; Subbramanian & Cohen, 1994; Frankel & Young, 1998; Turner & Summers, 1999; Wang *et al.*, 2000).

#### 1.1.1.3 Replicação do HIV-1

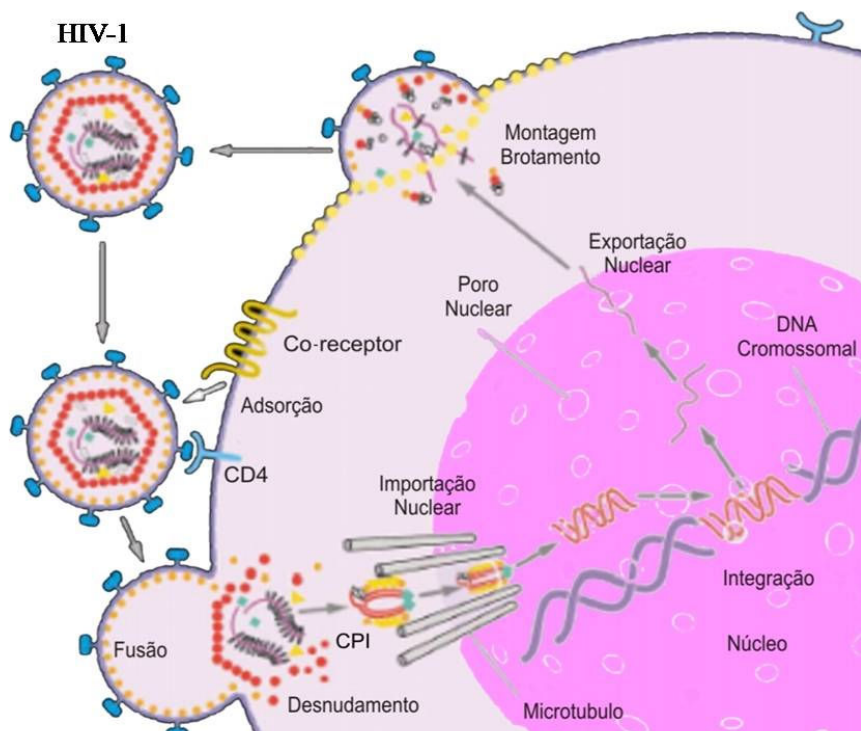
O HIV-1 apresenta tropismo por células que apresentam receptores CD4 de superfície, como linfócitos T, monócitos, macrófagos e células do sistema nervoso, sendo os linfócitos T CD4<sup>+</sup> seu principal alvo durante a infecção (Klatzmann *et al.*, 1984; Kowalski *et al.*, 1987).

A replicação do HIV-1 inicia com a ligação da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula alvo. A interação com o receptor da célula alvo é mediada pela glicoproteína de superfície, gp120, a qual se liga ao receptor CD4 com alta afinidade (Lasky *et al.*, 1987). Entretanto, apenas a interação gp120-CD4 não é suficiente para a entrada do HIV-1 na célula alvo, necessitando ainda da interação entre o vírus e moléculas co-receptoras. Um grupo de receptores de quimiocinas, pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G, atuam como co-receptores essenciais ao reconhecimento da célula alvo (Clapham, 1997). As duas principais classes de HIV-1, as que apresentam tropismo por células T e as que apresentam tropismo por macrófagos, diferem quanto aos co-receptores envolvidos no reconhecimento viral: os vírus que possuem tropismo por macrófagos utilizam os co-receptores CCR5, enquanto que os vírus que possuem tropismo por células T necessitam dos co-receptores CXCR4 (Berger, 1997; Chan & Kim, 1998).

Após a adsorção à membrana celular, mediante interação com o receptor CD4 e o receptor de quimiocina, a gp120 sofre uma mudança conformacional que se

estende à proteína gp41, promovendo a fusão vírus-célula, permitindo que o capsídeo viral penetre na célula (Lifson *et al.*, 1986; Lu & Kim, 1997; Jiang *et al.*, 1999; Figura 3), sendo que o vírus pode, ainda, penetrar na célula via endocitose mediada por receptores, seguida da degradação do envelope viral (Bauer *et al.*, 1987).

Após a penetração do vírus na célula hospedeira, ocorre o desnudamento e a liberação do conteúdo do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira, o que se faz necessário para a etapa seguinte: a transcrição reversa, a qual é mediada pela enzima viral transcriptase reversa (Frankel & Young, 1998). Esta enzima viral promove a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla, catalisando as reações de polimerização de DNA dependente de RNA e dependente de DNA, além de clivar a fita de RNA do híbrido RNA-DNA formado durante o processo (Vaishnav & Wong-Staal, 1991).



**Figura 3** - Replicação do HIV-1 (Adaptado de Sherman & Greene, 2002).

A molécula de DNA formada é, então, transportada para o núcleo da célula hospedeira sob a forma de um complexo de nucleoproteínas, através da ação das

proteínas Vpr e Vif, as quais estão diretamente associadas ao transporte do complexo de pré-integração ao núcleo e ao aumento do potencial infeccioso, respectivamente (Cohen *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1997). Ao chegar ao núcleo, o DNA formado sofre a ação da enzima integrase, a qual promove a integração estável do DNA viral ao DNA da célula hospedeira formando o que se denomina de próvirus (Katz & Skalka, 1994).

O genoma proviral integrado ao material genético da célula infectada inicia a fase tardia da replicação com a transcrição e o processamento do RNA viral. Os transcritos irão dar origem ao RNA genômico e à síntese de proteínas estruturais (Greene, 1991).

Após a síntese do RNA viral e das proteínas virais, a próxima etapa consiste na montagem e no brotamento das partículas virais. Os vírus são inicialmente montados próximos a membrana celular na forma de partículas imaturas, compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais (Wainberg *et al.*, 1988).

Após ou durante o brotamento, fase em que o vírus adquire o envelope a partir da membrana da célula do hospedeiro, as partículas passam por uma modificação morfológica conhecida como maturação, que consiste na clivagem das poliproteínas pela enzima viral protease, produzindo enzimas e proteínas do capsídeo viral, de modo que a partícula viral toma a forma característica tornando-se infecciosa (Greene, 1991; Kaplan *et al.*, 1994).



## 1.1.2 Epidemiologia da infecção pelo HIV

### 1.1.2.1 Distribuição geográfica

Nas últimas décadas, a infecção pelo HIV tem sido um dos problemas de saúde mais importantes no mundo, sendo considerado um desafio à saúde pública.

Segundo o último relatório da UNAIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*) e da OMS (Organização Mundial de Saúde), o HIV já infecta cerca de 33,2 milhões de pessoas em todo o mundo, acometendo aproximadamente 15,4 milhões mulheres e 17,8 homens, com 2,5 milhões de novas infecções em 2007 e 2,1 milhões de morte neste mesmo ano (UNAIDS/WHO, 2007; Figura 4).



**Figura 4** - Distribuição geográfica da prevalência do HIV (Adaptado de UNAIDS/WHO, 2007).

O número de infectados diminuiu 16% em relação à estimativa publicada em 2006 (39,5 milhões), o que tem sido explicado ser, provavelmente, devido a uma

atualização dos dados estimados para os casos da Índia e da África subsaariana (UNAIDS/WHO, 2006; 2007).

A região mais afetada continua sendo a África subsaariana com 22,5 milhões de infectados. Nesta região 68% dos adultos e 90% das crianças são infectadas pelo vírus, sendo a Aids a principal causa de morte na região, responsável por 76% dos casos (UNAIDS/WHO, 2007).

No Brasil, desde 1980 até junho de 2008, já foram notificados 506.499 casos e, apesar da redução da mortalidade devido à introdução da política de acesso universal ao tratamento antiretroviral, o impacto da Aids ainda é grande, com mais de 205.409 óbitos notificados até 2007, e com mais de 13 mil casos novos ocorrendo no primeiro semestre de 2007 (Boletim Epidemiológico Aids e DST, 2008).

Segundo o último Boletim Epidemiológico de Aids e DST, dos casos notificados até junho de 2008, 60% (305.725 casos) se concentra na região Sudeste, 19% (95.552 casos) na região Sul, 12% (58.348 casos) no Nordeste, 6% (28.719 casos) no Centro-Oeste e 4% (18.155 casos) no Norte (Boletim Epidemiológico Aids e DST, 2008).

#### 1.1.2.2 Transmissão do HIV-1

Estudos epidemiológicos demonstraram que a maioria das infecções causadas pelo HIV-1 ocorreu por meio da transmissão sexual, pois o vírus pode ser encontrado no sêmen, tanto na forma livre, como associado à célula (Kashuba *et al.*, 1999; Delwart *et al.*, 2000; Pao *et al.*, 2005). Além da transmissão sexual existem outras categorias de exposição, as quais incluem a via sangüínea (através do compartilhamento de seringas e agulhas por usuários de drogas injetáveis (UDI), transfusões sangüíneas e

hemoderivados) e a via materno-infantil, na qual ocorre a transmissão da infecção da mãe para a criança durante a gestação, no momento do parto ou durante o aleitamento materno (CDC, 1999). O HIV-1 também pode ser adquirido por profissionais de saúde em caso de acidentes com materiais perfuro-cortantes contaminados com sangue ou, ainda, pelo contato com secreções de pacientes portadores do vírus (Machado *et al.*, 1992).

Entre as categorias de exposição, a via que continua a crescer em importância é a sexual, principalmente na relação heterossexual, a qual tem contribuído para a feminização da epidemia e, conseqüentemente, contribuído para o aumento da transmissão vertical (Galvão *et al.*, 2004), a qual pode ocorrer de três maneiras distintas: intra-útero, no decorrer do nascimento e no pós-parto, neste caso por meio do aleitamento materno. Além desses fatores, a infecção avançada é, também, um fator de risco, pois taxas elevadas de transmissão são encontradas entre mães com baixos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou com sintomas da doença (Bryson, 1996; Orloff *et al.*, 1996; Dabis *et al.*, 2000).

Em relação à transmissão pela via sangüínea, esta ocorre, principalmente, através de instrumentos contaminados entre UDI, o que foi demonstrado em vários estudos descritos na literatura (Bobkov *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2004). Por outro lado, a implantação de testes sorológicos de triagem nos hemocentros contribuiu de forma significativa para a queda da transmissão do HIV-1 pela via sangüínea, quando comparado ao início da epidemia, entretanto devido à existência do período de janela imunológica, o risco, ainda que pequeno, existe (Salles *et al.*, 2003; Phelps *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2006).

### 1.1.3 Patogênese da infecção pelo HIV-1

As interações entre o HIV-1 e o hospedeiro humano são bastante complexas, conforme evidenciado pela grande variabilidade na taxa de progressão da doença observada em pacientes infectados (Liu *et al.*, 1997). A infecção pelo HIV-1 deprime o sistema imunológico na medida em que infecta e destrói os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, os quais normalmente coordenam a resposta imune, além do aumento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, diminuindo a relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Pantaleo & Fauci, 1996).

As manifestações clínicas da infecção variam desde um estado de portador assintomático até o desenvolvimento de doenças oportunistas graves e potencialmente letais, com a Aids como o estágio mais avançado da doença, e podem variar de acordo com diversos fatores, como idade, sexo, genética do hospedeiro, histórico de tratamento, entre outros (Cao *et al.*, 1995; Chaisson *et al.*, 2000; Paranjape, 2005).

A manifestação inicial da infecção pelo HIV-1 em metade a dois terços dos indivíduos recentemente infectados é caracterizada como uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa, chamada de síndrome retroviral aguda, descrita por Cooper e colaboradores em 1985. Os sintomas mais frequentes são febre, sudorese, mal estar, mialgias, anorexia, náuseas, diarreia e faringite não exsudativa, além de cefaléia, fotofobia, meningismo e exantema maculopapular (Ho *et al.*, 1985; Niu *et al.*, 1993). Sintomas neurológicos ocorrem em uma minoria e podem incluir meningite asséptica, encefalite, neuropatia periférica e uma polineuropatia aguda ascendente, conhecida como Síndrome de Guillain-Barré (Carne *et al.*, 1985; Hagberg *et al.*, 1986 ; Elder *et al.*, 1986; Denning *et al.*, 1987). Úlceras aftosas orais ou esofágicas podem ocorrer em alguns casos (Fusade *et al.*, 1992; Ruiz-Laiglesia *et al.*, 1996).

Após a infecção primária, o paciente infectado pode permanecer assintomático por vários anos. Também pode apresentar sintomas pouco específicos como linfadenopatia generalizada persistente, fadiga, febre baixa, sudorese noturna, diarreia intermitente e perda de peso (Chaisson *et al.*, 2000). Outras formas de apresentação se devem a processos imunologicamente mediados, resultantes da resposta do hospedeiro à infecção viral crônica, como linfadenopatia, trombocitopenia, polineuropatias, miopatias e complexo Aids-demência (Navia *et al.*, 1986a; 1986b; Kurtzberg *et al.*, 1987; Fuller *et al.*, 1993). Conforme já mencionado, pode haver uma variação considerável no tempo de progressão da doença, com alguns indivíduos progredindo em menos de dois anos, enquanto outros, chamados de progressores lentos (*long-term non-progressors*), podem permanecer assintomáticos e sem alterações imunológicas por muitos anos, com pelo menos oito anos de infecção sem nenhuma alteração imunológica (Cao *et al.*, 1985; Phair *et al.*, 1992; Sheppard *et al.*, 1993). Após um período variável de tempo, a maior parte dos pacientes começa a apresentar sinais e sintomas clínicos de imunodeficiência, com manifestações variadas, sendo a maioria delas relacionada às infecções oportunistas que acometem o paciente, além de neoplasias (Chaisson *et al.*, 2000).

A progressão à Aids, em pacientes infectados pelo HIV-1, parece estar diretamente relacionada à diminuição na contagem de células T CD4<sup>+</sup> e à carga viral no plasma e nos tecidos linfóides (Graziosi *et al.*, 1998). Embora diversos fatores estejam relacionados à variabilidade na taxa de progressão da doença, a ativação do sistema imunológico é provavelmente o fator determinante mais importante (Bentwich *et al.*, 2000), pois além de facilitar a replicação viral, alterar o perfil da produção de citocinas e afetar o ciclo celular, é também associada com vários graus de disfunção imune, como

deficiência na resposta imunológica e apoptose, os quais aceleram à progressão da doença e diminuem a sobrevida do paciente (Bentwich *et al.*, 1998; Fahey, 1998; Srebel & Bour, 1999; Gougeon & Montagnier, 1999; Hazenberg *et al.*, 2000).

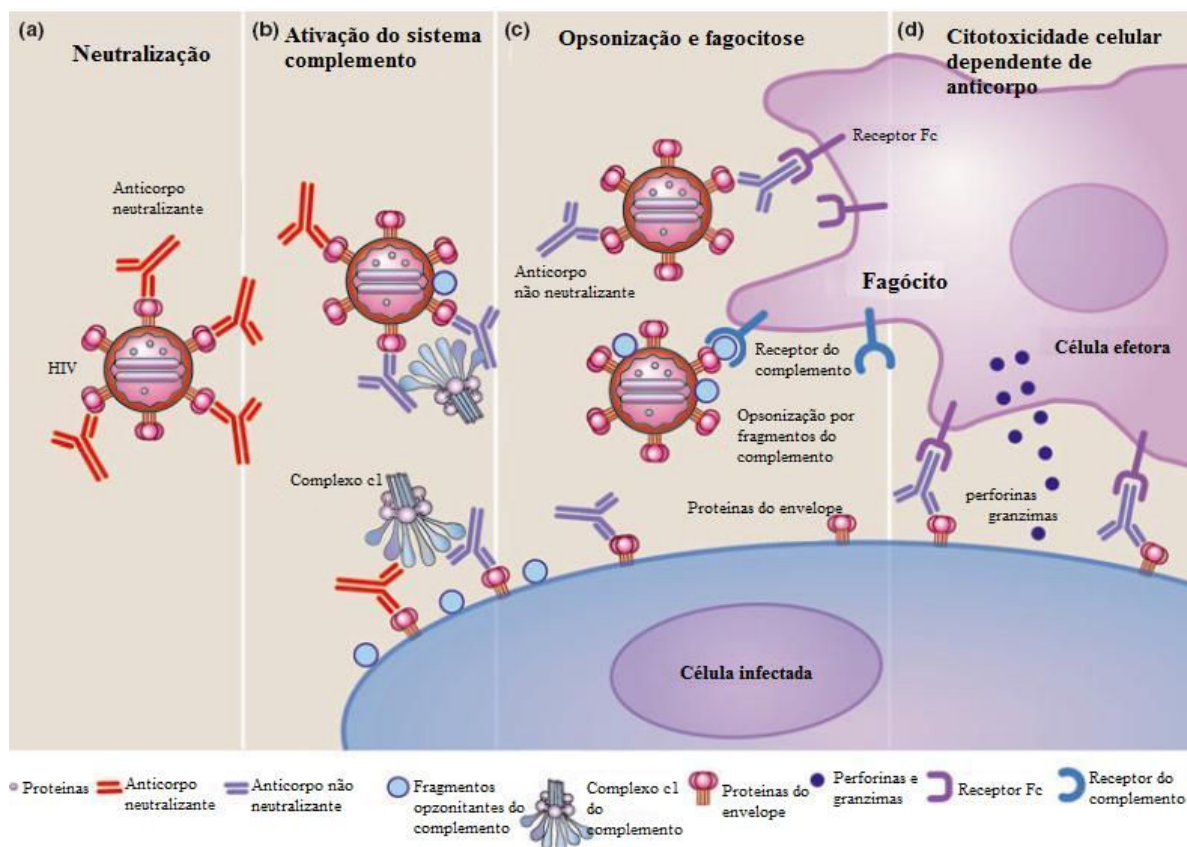
#### **1.1.4 Resposta imune à infecção pelo HIV-1**

Apesar de a primeira linha de defesa instalada em um processo infeccioso ser os mecanismos da imunidade inata, o controle da infecção pelo HIV-1, através da diminuição da carga viral plasmática e dos sintomas clínicos, é alcançado com maior eficácia com a instalação da resposta imune específica celular e humoral, mediada principalmente pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e pela produção de anticorpos anti-HIV, respectivamente (Vergis & Mellors, 2000).

##### 1.1.4.1 Resposta humoral

A infecção pelo HIV-1 estimula uma intensa produção de anticorpos contra a maioria das proteínas estruturais e regulatórias do vírus. O momento desta produção a partir da infecção ainda é muito discutido e parece ser particular de cada organismo, mas é provável que em poucos dias após a infecção já seja iniciada a produção de anticorpos anti-HIV, embora sejam detectados nos testes sorológicos de rotina a partir de aproximadamente seis a oito semanas de infecção. (Pellegrin *et al.*, 1996; Richman *et al.*, 2003; Aasa-Chapman *et al.*, 2004). Entretanto, somente uma fração destes anticorpos, mais particularmente o produzidos contra a gp41 e contra o domínio variável V3 que permite a ligação ao receptor CD4 da glicoproteína de superfície gp120, possuem atividade de neutralização (Wyatt & Sodroski, 1998; Parren *et al.*, 1999).

Enquanto a neutralização é frequentemente considerada a maneira mais eficiente de defesa mediada por anticorpo contra infecções virais, tem sido observado, em outras doenças virais, que os anticorpos não neutralizantes podem ter um papel importante na eliminação do vírus e das células infectadas através das ações do sistema complemento, da fagocitose e das células *natural killer* (Figura 5), entretanto na infecção pelo HIV-1 o impacto destas funções imunes mediada por anticorpos não neutralizantes ainda não está bem esclarecido (Sinclair et al., 1988; Kohl *et al.*, 1990; Blue *et al.*, 2004; Logvinoff *et al.*, 2004; Hangartner *et al.*, 2006).



**Figura 5** – Resposta de anticorpos no combate à infecção pelo HIV-1: (a) Neutralização da partícula livre pelo anticorpo; (b) Lise pela ativação do sistema complemento mediada por anticorpos; (c) opsonização das partículas virais e fagocitose; (d)

Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) contra células infectadas (Huber & Trkola, 2007).

Na infecção pelo HIV-1 tem sido observado que a produção de anticorpos neutralizantes é muito escassa e rapidamente se observa o desenvolvimento de um mecanismo de escape viral contra os mesmos (Richman *et al.*, 2003). Isto se deve ao fato de que as regiões imunogênicas das glicoproteínas são altamente variáveis e induzem a síntese de anticorpos sensíveis ao escape viral, devido às mutações nos epítomos reconhecidos. E, além disso, os epítomos de interação com o receptor CD4, que são muito mais conservados e que seriam capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes de amplo espectro, só se expõem quando a proteína muda sua conformação ao se ligar ao receptor CD4, portanto após a infecção (Kwong *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003).

Por outro lado, nos modelos de imunização desenvolvidos até o momento não se obteve, de forma significativa, níveis elevados de anticorpos neutralizantes, e sua presença não esteve associada à proteção da infecção (Robinson *et al.*, 1999). Estes dados reforçam a dúvida de muitos pesquisadores em relação ao papel da resposta imune humoral no controle da infecção pelo HIV-1, dificultando assim o desenvolvimento de uma vacina (Burton *et al.*, 2004).

#### 1.1.4.2 Resposta celular

Na infecção pelo HIV-1 é desenvolvida uma resposta celular antiviral que envolve diversas populações celulares, incluindo linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL) e células *natural killer* (NK). Entretanto a maioria dos trabalhos sugere que a resposta mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> representam,



provavelmente, o mecanismo mais importante de proteção à infecção pelo HIV-1 (Rosenberg *et al.*, 1997; 2000; McMichael & Rowland-Jones, 2001; Alcamí, 2004).

Em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estes, possuem um importante papel na resposta imune específica contra o HIV-1, pois são responsáveis por desencadear uma resposta imunológica mediada por linfócitos B e CTL, além de uma resposta antiviral peculiar (Rosenberg *et al.*, 1997)

Sem dúvida a resposta mais importante no combate à infecção pelo HIV-1 é mediada pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. O estudo da resposta citotóxica *in vitro* mediada pelos CTL tem demonstrado que nos pacientes soropositivos existe uma expansão clonal de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com atividade citotóxica, e este tipo de resposta é particularmente mais intensa na infecção aguda, e está associada com o controle da replicação viral (Rosenberg *et al.*, 2000; Varela-Rohena *et al.*, 2008; Bangham, 2009).

A resposta mediada pelos CTL desenvolvida após a exposição ao HIV-1 pode controlar a infecção de duas maneiras, ou através de sua atividade citotóxica destruindo as células infectadas, ou por meio da supressão da replicação viral, neste caso sem destruir as células infectadas (Walker *et al.*, 1986; Walker & Plata, 1990).

No contexto da citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> em células infectadas pelo HIV-1, a via apoptótica desencadeada por interação do receptor FAS com seu ligante FASL parece estar diretamente envolvida, uma vez que os CTL são altamente indutores da apoptose mediada pela via FAS/FASL, o que leva a hipótese de que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem eliminar células infectadas pelo HIV-1 através da interação do receptor FAS, presente nas células CD4<sup>+</sup> infectadas, com o ligante FASL, freqüentemente presente nas células T CD8<sup>+</sup>, em particular na infecção pelo HIV-1

(Alderson *et al.*, 1995; Boise *et al.*, 1995; Katsikis *et al.*, 1995; Sloand *et al.*, 1997; Petrovas *et al.*, 2004).

Os epítomos virais antigênicos responsáveis por desencadear uma resposta mediada por linfócito T citotóxico CD8<sup>+</sup> estão, principalmente, localizados nos peptídeos codificados pelos genes *GAG*, *POL*, *ENV* e *NEF* (Johnson & Walker, 1994), e falhas no controle da replicação viral por células T CD8<sup>+</sup> podem ocorrer por diversos mecanismos, incluindo mutações virais nestes peptídeos, dificultando o reconhecimento pelo CTL (Borrow *et al.*, 1997; Lieberman *et al.*, 2001). Estes epítomos alterados podem levar a proliferação de CTL sem desenvolver os mecanismos efetores que induzem a citólise e, como consequência, ocorrerá acúmulo de células T CD8<sup>+</sup> de memória que não se diferenciarão em células efectoras e, portanto, não haverá citólise das células infectadas, contribuindo para o estado crônico de replicação do HIV-1 (McMichael & Rowland-Jones, 2001).

### **1.1.5 Mecanismos de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>**

A destruição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sem dúvida, representa o mecanismo mais característico da infecção pelo HIV-1 (McCune, 2001). Inicialmente se acreditava que esta destruição era somente uma consequência direta da replicação viral e do consequente efeito citopático nas células infectadas (Ho *et al.*, 1995), entretanto outros mecanismo indiretos de destruição têm sido descritos associados ao processo de imunossupressão que ocorre durante o curso da infecção.

Um mecanismo indireto associado à imunossupressão se deve a mecanismos imunológicos, uma vez que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados se tornam alvos do sistema imune, pois ao expressar peptídeos virais associados às moléculas do complexo de

histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I) são suscetíveis ao reconhecimento e destruição por linfócitos T citotóxicos (McMichael & Rowland-Jones, 2001), além disso, em modelos experimentais tem sido demonstrado que a infusão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados origina uma diminuição no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados (Brodie *et al.*, 1995).

Outros mecanismos têm sido ainda associados ao processo de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, tais como bloqueio da ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, alteração na redistribuição linfocitária com um aumento do recrutamento dos linfócitos para os gânglios linfáticos (McCune, 2001), hiperativação do sistema imunológico (Bentwich *et al.*, 1998; 2000), predomínio de cepas X4 indutoras de sincício (Schellekens *et al.*, 1992; Schuitemaker *et al.*, 1992; Connor *et al.*, 1993; 1997; Casper *et al.*, 2002) e apoptose (Badley *et al.*, 2000).

Apesar de existir uma importante polêmica sobre o papel de cada um destes mecanismos na imunossupressão e ser difícil determinar o impacto real destes *in vivo*, provavelmente todos desempenham uma determinada função na diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a qual é a característica mais importante da infecção pelo HIV-1, responsável pelo quadro de imunodeficiência caracterizado por diversas manifestações clínicas. Ademais, dentre estes mecanismos, tem se demonstrado uma importância significativa para a apoptose promovida pelas células T citotóxicas no mecanismo de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> característico da infecção pelo HIV-1 (Ameisen & Capron, 1991; Badley *et al.*, 2000; Roshal *et al.*, 2001; Chaves & Kallas, 2004).

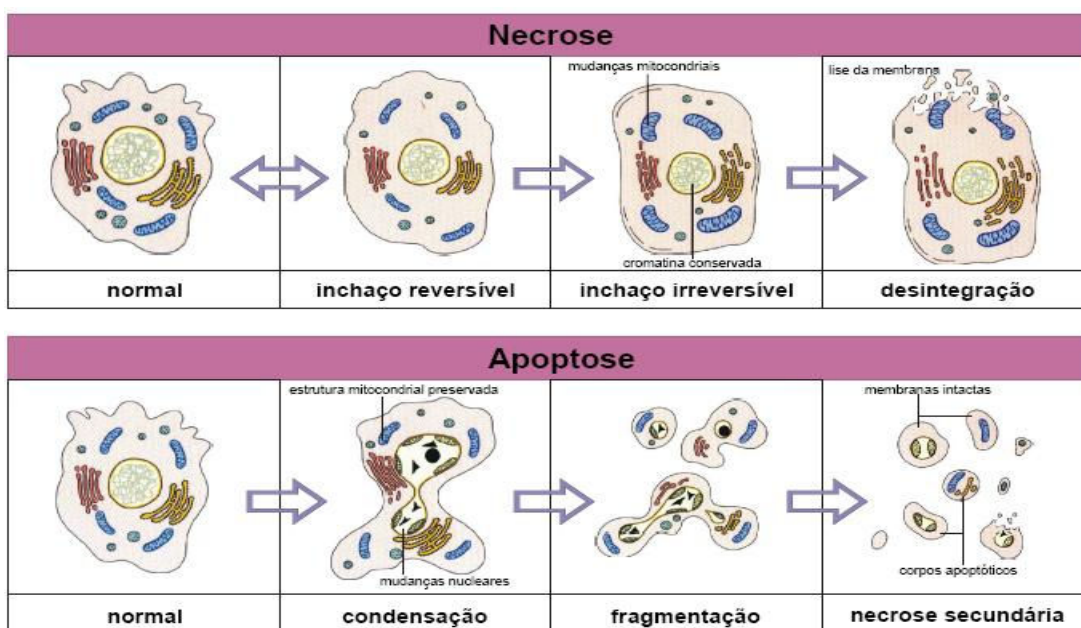
## 1.2 APOPTOSE

O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez por Kerr, Wyllie e Currie em 1972 para designar uma forma distinta de morte celular que ocorre de maneira fisiológica (Kerr *et al.*, 1972).

A apoptose, processo fisiológico de morte celular programada, desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos. Esse processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores (Wyllie *et al.*, 1980; Hale *et al.*, 1996; Green, 2003).

Trata-se de um processo de morte ativa das células íntegras, sem comprometimento das células vizinhas, e pode ser comparada metaforicamente a um “suicídio celular”. As células que iniciam esse processo apresentam várias alterações típicas nas quais se incluem a condensação da cromatina, degradação internucleossômica do DNA, destruição do citosqueleto, alterações na assimetria de fosfolípidos de membrana plasmática com exposição da fosfatidilserina, diminuição do volume citoplasmático, entre outras. As organelas citoplasmáticas permanecem intactas e, em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma vesículas denominadas corpúsculos apoptóticos, os quais contêm fragmentos do núcleo e algumas organelas. Estes corpúsculos ou corpos apoptóticos são rapidamente reconhecidos e englobados por fagócitos e/ou células adjacentes, e degradados pelos lisossomos (Morgan, 2002; Elmore, 2007).

Este tipo de morte celular difere da necrose, um processo passivo de morte celular na qual a célula aumenta seu volume citoplasmático ocorrendo perda da integridade da membrana e, conseqüentemente, ocorre liberação dos conteúdos celulares enzimaticamente degradados no tecido circunvizinho, resultando em reação inflamatória (Trump *et al.*, 1997). Na apoptose não há reação inflamatória devido não ocorrer a liberação dos constituintes celulares aos tecidos adjacentes, já que os corpúsculos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos ou células vizinhas (Savill & Fadok, 2000; Kurosaka *et al.*, 2003; Figura 6). Vale ressaltar ainda, que a morte celular por necrose é essencialmente patológica, enquanto a apoptótica pode ser desencadeada por estímulos fisiológicos e/ou patológicos.



**Figura 6** - Representação esquemática das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular necrose e apoptose (Adaptado de Anazetti & Melo, 2007).

### 1.2.1 Mecanismos de apoptose

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares dependente de energia (Elmore, 2007).

O processo de apoptose pode ser iniciado por estímulos externos, através da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular, denominados receptores de morte, ou pelo estresse intracelular, caracterizando as principais vias de ativação, extrínseca ou via receptor de morte e intrínseca ou mitocondrial, respectivamente (Thorburn, 2004; Schwarz *et al.*, 2007).

Ambas as vias culminam para a ativação de proteases conhecidas como caspases, as quais são responsáveis por uma cascata de eventos que levam ao aparecimento das alterações celulares características comuns a todas as células em apoptose e a ação destas proteases culmina em uma via efetora comum independente da via estimulante (Nunez *et al.*, 1997; Thornberry, 1998).

As caspases foram identificadas a partir do conhecimento dos genes *ced-3* e *ced-4* do *Caenorhabditis elegans*, os quais são essenciais para a execução do processo de morte celular neste nematóide (Yuan & Horvitz, 1992; Yuan *et al.*, 1993). A clonagem do gene *ced-3*, o qual codifica uma protease homóloga à enzima conversora de interleucina 1- $\beta$  (ICE) de mamíferos, permitiu a identificação das caspases como uma grande família de proteases cisteínicas essenciais ao processo de morte celular (Alnemri *et al.*, 1996).

Estas proteases cisteínicas são sintetizadas no interior das células como precursores inativos, denominados pró-caspases e requerem um processamento para atingir a forma ativa. Cada pró-caspase possui um domínio amino-terminal de tamanho variável, também conhecido como pró-domínio, uma subunidade grande e uma

subunidade pequena (Nicholson & Thornberry, 1997). O processamento envolve a remoção do pró-domínio e a junção das subunidades grande e pequena formando um heterodímero, posteriormente dois destes heterodímeros se associam originando uma caspase ativa (Launay *et al.*, 2005). Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica (Rosen & Casciola-Rosen, 1997).

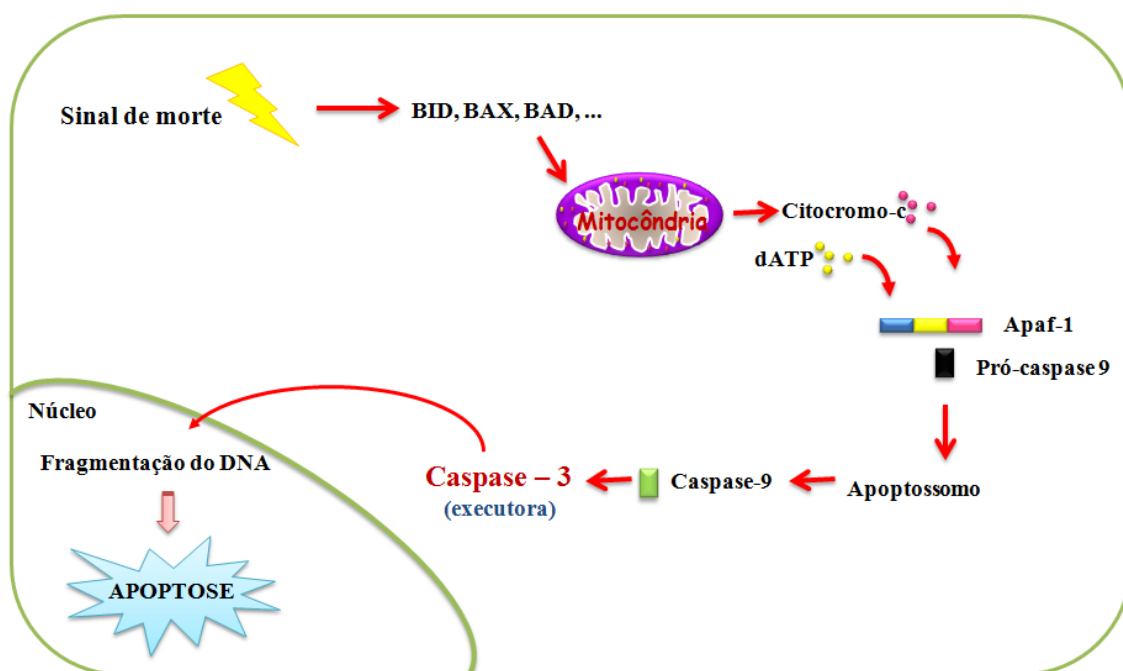
Até o momento quinze membros desta família já foram clonadas e caracterizadas, e muitas estão associadas ao processo de apoptose e inflamação. Entre as relacionadas ao processo de apoptose, podem ser classificadas em caspases iniciadoras e caspases executoras, baseada na diversidade entre os pró-domínios. As iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) possuem pró-domínio longo e agem como reguladores e iniciadores do processo de apoptose. As executoras (caspases 3, 6 e 7) possuem pró-domínio curto e agem como efetores da fragmentação nuclear, relacionadas à execução propriamente dita do processo de apoptose (Cohen *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 2005; Chowdhury *et al.*, 2008).

Conforme foi dito anteriormente duas principais vias de ativação das caspases desencadeiam a morte celular apoptótica, denominadas via intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou via receptor de morte (Figura 7).

A via intrínseca ou mitocondrial é iniciada devido sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, como lesão do DNA, alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Na presença destes sinais ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para a mitocôndria (Saelens *et al.*, 2004). Essas proteínas são membros da família de proteínas BCL-2, a

qual exerce importante função reguladora da apoptose, composta por membros pró-apoptóticos (BAX, BKA, BAD, BID, BIK, BCL-X<sub>S</sub>, etc.) e anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-W, MCL-1) (Gross *et al.*, 1999).

A translocação das proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação do citocromo-c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna, para o citosol, aonde irá se associar às proteínas apaf-1 (fator de ativação de protease apoptótica-1) e pró-caspase 9, formando o apoptossomo (Chinnaiyan, 1999; Hill *et al.*, 2004). Na presença de ATP ocorre a ativação da caspase 9, a qual desencadeia a ativação das pró-caspases executoras 3 e 7 promovendo o processo de apoptose (Slee *et al.*, 2001; Figura 7).



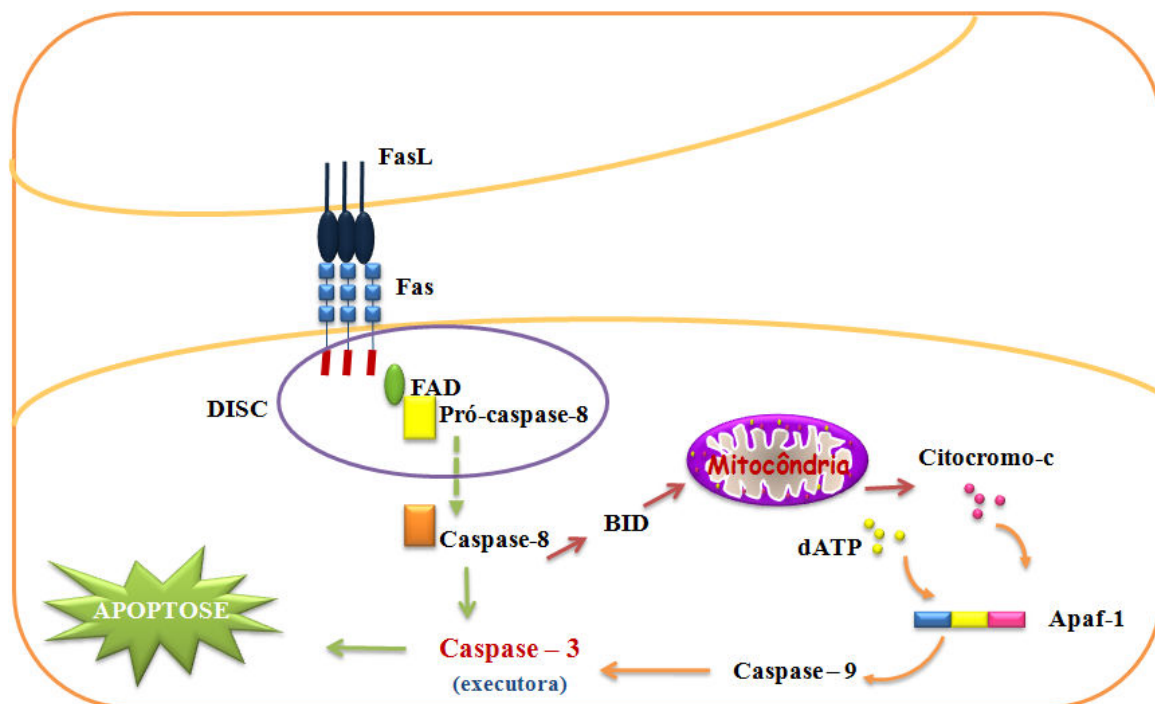
**Figura 7** - Indução da apoptose por estímulos internos - via mitocondrial ou intrínseca (Adaptado de BioAgency Biotecnologia Ltda. <[http://www.bioagency.com.br/catalogos/09\\_apoptose\\_2004.pdf](http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose_2004.pdf)>).



Em relação à via extrínseca o desenvolvimento do processo de apoptose envolve interações mediadas por receptores transmembrana. Tais receptores, conhecidos como receptores de morte, são membros da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (TNF) (Locksley *et al.*, 2001). Os membros desta superfamília de receptores TNF compartilham domínios extracelulares ricos em cisteína e possuem um domínio citoplasmático denominado de domínio de morte, o qual possui um importante papel na transdução do sinal de morte para o meio intracelular (Ashkenazi & Dixit, 1998). Os ligantes mais caracterizados neste contexto e os seus respectivos receptores de morte incluem FASL/FAS, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 (Chicheportiche *et al.*, 1997; Ashkenazi & Dixit, 1998; Peter & Kramer, 1998; Suliman *et al.*, 2001, Elmore, 2007).

A seqüência de eventos que definem a via extrínseca da apoptose é melhor caracterizada com os modelos de interação entre FASL/FAS e TNF- $\alpha$ /TNFR1. Nestes modelos ocorre o acoplamento do ligante com o seu respectivo receptor, estes formam agregados que, na forma de trímeros, ligam-se ao domínio de morte de proteínas adaptadoras presentes no citosol que são recrutadas após a associação entre ligante e receptor. O acoplamento de FASL/FAS resulta na ligação do domínio de morte da proteína FADD (domínio de morte associado ao FAS) ao receptor FAS, enquanto a associação entre o ligante de TNF e seu receptor leva a ligação deste com o domínio de morte da proteína adaptadora TRADD (domínio de morte associado ao receptor TNF), além do recrutamento das proteínas FADD e RIP (proteína de interação com receptores) (Hsu *et al.*, 1995; Grimm *et al.*, 1996; Wajant, 2002). A proteína adaptadora FADD associa-se então com a pró-caspase 8 através da dimerização do domínio efetor de morte, formando um complexo de sinalização indutor de morte (DISC), o que promove

a ativação da enzima iniciadora caspase 8, que por sua vez ativa a enzima efetora caspase 3 (Kischkel *et al.*, 1995; Salvesen, 1999; Budihardjo *et al.*, 1999; Figura 8).



**Figura 8** - Indução da apoptose por estímulos externos – Via receptor de morte ou extrínseca (Adaptado de Fan *et al.*, 2005).

A caspase 8, ativada via receptor de morte, pode, também, ativar a caspase 3 através da proteína BID, que por sua vez, é translocada à superfície da mitocôndria e interage seqüencialmente com as proteínas externas da membrana mitocondrial. Como resultado, tem-se a formação de poros que permitem a liberação do citocromo-c e a ativação da enzima iniciadora caspase 9, que por sua vez ativa a caspase executora 3, conforme ocorre quando iniciado pela via mitocondrial (Kuwana *et al.*, 2002).

A atividade da caspase 3 tem como consequência a degradação de proteínas celulares e reguladores da apoptose, assim como a decomposição do DNA

cromossômico (WOO *et al.*, 1998). Conseqüentemente com a ativação da caspase 3, que conforme descrito pode ser via mitocondrial ou via receptores de morte, a célula passa a apresentar alterações bioquímicas e morfológicas característicos da apoptose, sendo portanto a via final comum de ambos modelos de estimulação do processo (Nunez *et al.*, 1998).

### **1.2.2 Apoptose na infecção pelo HIV-1**

O processo de morte celular programada faz parte de diversos processos fisiológicos do organismo, entretanto a execução fisiologicamente anormal da apoptose pode estar associada a diversas patologias, uma vez que tanto a exacerbação quanto a diminuição deste processo de morte celular podem promover conseqüências biológicas adversas (Elmore, 2007).

Se a alteração conduzir à diminuição da morte celular programada, ocorrerá apoptose insuficiente, característico de doenças como câncer, doenças auto-imunes e algumas infecções virais. Por outro lado, se houver indução da morte celular programada ocorre apoptose excessiva ou aumentada, como observado em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, lesões isquêmicas, hepatites virais, lesões hepáticas associadas ao álcool e induzidas por toxinas, sendo bastante característico na infecção pelo HIV-1, principalmente no quadro de Aids (Badley *et al.*, 2000; Renehan *et al.*, 2001; Gougeon, 2003).

A infecção pelo HIV-1 é caracterizada pela diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e o processo de apoptose tem sido estudado com maior ênfase desde que foi proposto como um importante responsável por este mecanismo (Ameisen & Capron, 1991; Badley *et al.*, 2000; Cossarizza, 2008).

Nos linfonodos de indivíduos infectados, o número de células CD4<sup>+</sup> em apoptose é significativamente maior do que em indivíduos não-infectados (Muro-Cacho *et al*, 1995). Além disso, a taxa de apoptose é bem maior nas células infectadas por vírus indutores de sincícios, portanto em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, desta maneira os macrófagos desempenham um papel central na patogênese da infecção pelo HIV-1, funcionando como um reservatório viral, por sua capacidade de resistir aos processos apoptóticos, podendo manter-se infectados por um período relativamente longo (Embretson *et al*, 1993; Pantaleo *et al*, 1993; Aquaro *et al*, 2002).

A replicação do HIV-1 em macrófagos pode ser influenciada por um conjunto de fatores, entre eles a fagocitose de células apoptóticas, como acontece no linfonodo de pacientes infectados pelo HIV-1, onde as células apoptóticas podem ser fagocitadas por macrófagos infectados (Embretson *et al*, 1993; Pantaleo *et al*, 1993; Muro-Cacho *et al*, 1995; Gregory, 2000). Visto que a fagocitose de células apoptóticas altera a secreção de várias citocinas por macrófagos, as quais podem influenciar a replicação do HIV (Fauci, 1996), foi observado que a exposição de macrófagos infectados a células apoptóticas, *in vitro*, amplificou de maneira significativa a replicação do HIV-1 (Lima *et al*, 2002). Assim a apoptose na infecção pelo HIV-1, além de estar diretamente relacionada com a depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, parece estar associada indiretamente ao aumento da replicação viral.

Várias proteínas virais tem sido estudadas no contexto de indução da apoptose, tais como NEF, VPR e TAT, por exemplo (Westendorp *et al*, 1995; Jacotot *et al*, 2000; Geleziunas *et al*, 2001). A via apoptótica mais importante neste contexto é a via receptor de morte, mas particularmente através da ativação de receptores FAS por meio da interação FAS/FASL, que induzem apoptose tanto em células infectadas quanto

não infectadas (Nagata, 1999; Cossarizza *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2001; Alimonti *et al.*, 2003).

### 1.3 O RECEPTOR APOPTÓTICO FAS E SEU LIGANTE FASL

#### 1.3.1 Histórico

No final da década de 80, dois estudos independentes isolaram anticorpos que possuíam ação citolítica frente às diversas linhagens celulares humanas e reconheciam proteínas que foram denominadas FAS e APO-1. Nestes estudos a proteína FAS foi reconhecida por IgM, enquanto a APO-1 foi reconhecida por anticorpos da sub-classe IgG3 (Yonehara *et al.*, 1989; Trauth *et al.*, 1989).

Dois anos depois, a partir de células humanas e de camundongo foi clonado o DNAc do antígeno FAS e observou-se que células murinas transformadas, as quais expressavam constitutivamente o gene *FAS* sofriam apoptose ao serem tratadas com anticorpos específicos, indicando a participação desta molécula na transdução de sinais apoptóticos (Itoh *et al.*, 1991).

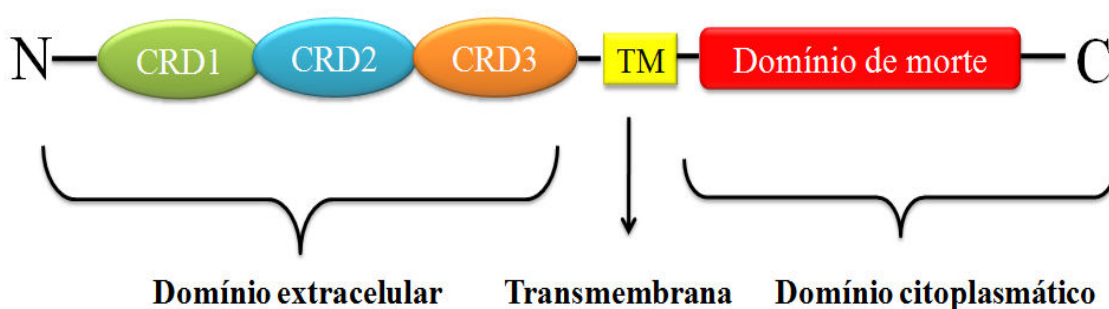
Posteriormente, a purificação e clonagem do gene *APO-1* levou à conclusão que este e *FAS* eram idênticos, tratando-se de um único gene e, conseqüentemente, FAS e APO-1 tratam-se da mesma proteína (Oehm *et al.*, 1992).

No início da década de 90, Suda e seu grupo de pesquisa identificaram uma molécula que desencadeia o processo de apoptose ao se ligar ao receptor de membrana celular FAS, codificado pelo gene *FAS*, sendo denominada ligante de FAS (FASL) (Suda *et al.*, 1993; Suda & Nagata, 1994).

### 1.3.2 O receptor FAS

A proteína FAS, conhecida também como APO-1 ou CD95, é um receptor transmembrânico do tipo I pertencente à superfamília dos receptores de TNF (Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992).

Trata-se de uma proteína monomérica de aproximadamente 48 kDa formada por 355 aminoácidos (Oehm *et al.*, 1992) que, assim como todos os membros da família que a compõe, possui um domínio extracelular contendo três repetições ricas em cisteína, um domínio transmembrana e um domínio intracelular citoplasmático, onde se encontra o domínio de morte (Figura 10). O domínio amino-terminal extracelular é o mais similar entre os membros desta família, com 24 a 30% da seqüência de aminoácidos conservada, mas particularmente na região rica em cisteína (Smith *et al.*, 1994). Por outro lado, o domínio citoplasmático intracelular apresenta pequena homologia entre os membros, com exceção de alguns casos, a exemplo de FAS e TNFR1 (Hill & Lunec, 1996).



**Figura 9** - Representação esquemática da estrutura proteica monomérica do receptor FAS. CRD: Domínio rico em cisteína; TM: domínio transmembrana (Adaptado de Feig *et al.*, 2007).

O receptor FAS foi originalmente descrito como uma molécula com capacidade de mediar a apoptose em células transformadas (Trauth *et al.*, 1989), entretanto atualmente sabe-se que clones normais de células T humanas são suscetíveis à apoptose via FAS; sendo portanto uma proteína expressada na superfície de diversos tipos celulares, como linfócitos, fibroblastos, células epiteliais e algumas células endoteliais, e é responsável por desencadear o processo de morte celular nestas células (Leithauser *et al.*, 1993).

Os padrões de expressão deste receptor na superfície variam de acordo com o tipo celular, por exemplo, apresenta-se abundantemente expressado em linfócitos, entretanto em linfócitos T a expressão é maior que em linfócitos B (Digiuseppe *et al.*, 1996). Além disso, em linfócitos T de memória ativados há maior quantidade de FAS em relação aos linfócitos T virgens não estimulados, os quais expressam pouco ou até mesmo não há receptor FAS expresso (Salmon *et al.*, 1994; Krueger *et al.*, 2003).

Em pacientes infectados pelo HIV-1 é observado um aumento de FAS na superfície de linfócitos (Debatin *et al.*, 1994; Silvestris *et al.*, 1996), e estudos tem associado este aumento a diminuição drástica na contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> por indução de apoptose nestas células (McCloskey *et al.*, 1995; Cossarizza *et al.*, 2000).

Este receptor está presente na superfície das células como uma proteína monomérica e medeia o processo apoptótico através da interação com o anticorpo anti-FAS ou por meio de seu ligante natural, denominado ligante de FAS (FASL) (Nagata, 1999).

### 1.3.3 O ligante de FAS (FASL)

O ligante de FAS (FASL, CD95L, CD178), uma proteína transmembrana tipo II de 40 kDa formada por 281 aminoácidos, assim como o seu receptor, pertence à superfamília de proteínas TNF (Suda *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994; Nagata & Golstein, 1995).

Trata-se de uma proteína trimérica, composta por uma região N terminal, encontrada no citoplasma, e uma região C terminal que se entende para o espaço extracelular (Figura 11). A região extracelular de aproximadamente 15 aminoácidos é bastante conservada (20-25%) entre os membros da mesma família, enquanto que o comprimento e a sequência do segmento citoplasmático diferem significativamente (Nagata, 1997).



**Figura 10** – Representação esquemática da subunidade estrutural da proteína trimérica FASL (Adaptado de Sun *et al.*, 2006).

Este ligante, além de ser encontrado acoplado à membrana celular, pode ser encontrado na forma solúvel (28 kDa), resultante da clivagem da proteína de 40 kDa por uma metaloprotease dependente de zinco (Mariani *et al.*, 1995; Kayagaki *et al.*, 1995).

FASL foi descrito primeiramente como um proteína citotóxica expressada somente em células T ativadas e, atualmente, sabe-se que é encontrado em muitas outras células de diferentes órgãos, como cérebro, olhos, placenta e testículos, sendo associado



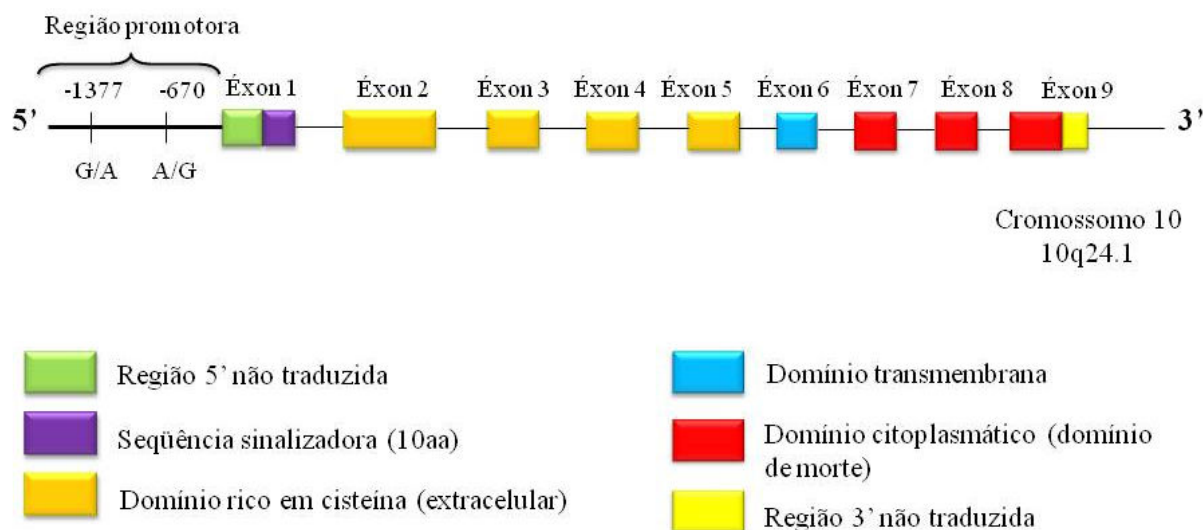
ao mecanismo de “*immune privilege*”, protegendo estes órgão de inflamação por meio da ativação apoptótica (Green & Ferguson, 2001; Ferguson & Griffith, 2006). Além disso, este ligante é um dos principais efetores de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> e células *natural killer* (Ashkenazi & Dixit, 1998).

#### **1.3.4 Caracterização molecular do receptor FAS e seu ligante FASL**

O gene responsável pela codificação do receptor FAS está localizado no braço longo do cromossomo 10 humano na posição 10q24.1 (Inazawa *et al.*, 1992).

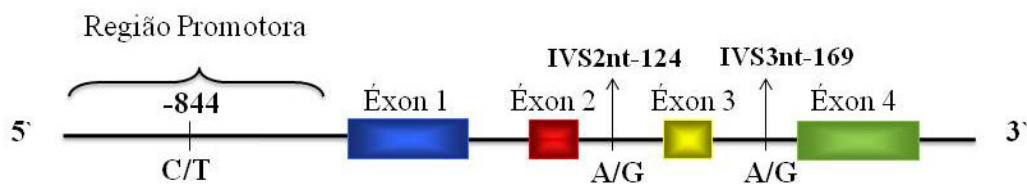
O gene *FAS* humano, também denominado *TNFRSF6*, é composto por nove éxons e oito íntrons e mede aproximadamente 25 kb. O éxon 1 codifica a região 5' não traduzida e os 10 primeiros aminoácidos que forma a seqüência sinalizadora. A região extracelular da molécula consiste de três domínios ricos em cisteína e é codificada pelos éxons 2, 3, 4 e 5. O sexto éxon codifica a região transmembrânica e os éxons 7 e 8 são responsáveis por codificar parte da porção citoplasmática próxima à membrana, a qual é complementada pelo éxon 9. Além codificar o restante da porção citoplasmática, incluindo o domínio de morte, o éxon 9 codifica também a região 3' não traduzida (Berhmann *et al.*, 1994; Figura 12).

Pelo menos oito splincings alternativos do gene que codificam sete isoformas diferentes têm sido descritos. A isoforma que não apresenta o domínio transmembrana pode regular negativamente a apoptose mediada pela isoforma completa (Hughes & Crispe, 1995; Cascino *et al.*, 1996; Bonnal *et al.*, 2008; NCBI Reference Sequence).



**Figura 11** - Esquema representativo do gene *FAS* (Fonte primária).

Em relação ao gene codificador do ligante de FAS, gene *FASL*, este foi isolado em 1994 e mapeado no braço longo do cromossomo humano 1 na posição 1q23, através da hibridização *in situ* por fluorescência. O gene *FASL* mede aproximadamente 8 kb, e é formado por uma região promotora, quatro éxons e três íntrons (Takahashi *et al.*, 1994; Figura 13).



**Figura 12** - Esquema representativo do gene *FASL* (Fonte primária).

#### 1.3.4.1 Polimorfismos genéticos de *FAS* e *FASL*

Diversos polimorfismos tem sido descritos tanto nos genes *FAS* quanto no seu ligante *FASL* e associados a diversas patologias (Huang *et al.*, 1997; Huang & Manollis, 2000; Bolstad *et al.*, 2000; Pinti *et al.*, 2002; Sibley *et al.*, 2003; Nasi *et al.*, 2005; Crew *et al.*, 2007).

No gene *FAS* dois principais polimorfismos tem sido descrito na região promotora. O primeiro está localizado na posição -670 e cria um sítio de restrição para a endonuclease *MvaI*, devido uma substituição de adenina (A) para guanina (G) nesta posição conferindo os alelos *A*, selvagem, e *G*, mutante, respectivamente. Pelo fato de este polimorfismo se localizar no sítio de ligação de transdução de sinal e de ativadores de transcrição (STAT), pode ter um papel funcional na regulação e expressão do gene (Huang *et al.*, 1997; 1999). Outro polimorfismo descrito na região promotora do gene *FAS* ocorre por uma substituição de guanina (G) para adenina (A) na posição -1377, que leva à alteração na seqüência consenso de ligação ao fator de transcrição SP-1, e desta maneira o alelo mutante *A* não se ligará ao mesmo, podendo estar associado à alteração funcional do receptor FAS ou à diminuição da sua expressão (Huang & Manollis, 2000; Sibley *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Na região codificante do gene, polimorfismos adicionais tem sido descritos nos éxons 2, 3 e 7 (Horiuchi *et al.*, 1999; Koshkina *et al.*, 2007).

Considerando o gene *FASL*, os principais polimorfismos descritos localizam-se na região promotora e no segundo e terceiro íntron do gene (Bolstad *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003).

Na região promotora do gene *FASL* há um polimorfismo descrito na posição -844, resultante da incorporação de timina (T) no lugar de citosina (C), e sugere-se que

esta alteração influencie tanto na expressão do ligante como na sinalização mediada pelo mesmo (Wu *et al.*, 2003).

Em relação ao polimorfismo localizado no segundo íntron, denominado IVS2nt-124, ocorre devido uma substituição de A para G no nucleotídeo 124 bases antes da primeira base do terceiro éxon. Outro polimorfismo, conhecido como IVS3nt-169, ocorre no terceiro íntron e resulta da deleção de uma timina (T) no nucleotídeo 169 bases antes da primeira base do quarto éxon. Até o momento não se sabe se estes polimorfismos estão associados à alteração na expressão gênica (Bolstad *et al.*, 2000; Pinti *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Não há relatos ainda de polimorfismos existentes na região codificadora do gene.

Diversos destes polimorfismos estão sendo associados a um aumento na suscetibilidade a várias patologias, incluindo síndrome linfoproliferativa, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, tireodite de Hashimoto, variados tipos de câncer, entre outras (Rieux-Laucat *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Del Rey *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Crew *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008). Mais recentemente, pesquisas têm buscado associação entre estes polimorfismos e o mecanismo de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-1, haja vista a importância do sistema FAS/FASL neste processo (Vasilescu *et al.*, 2004; Nasi *et al.*, 2005).

#### 1.4 SISTEMA FAS/FASL E A INFECÇÃO PELO HIV-1

A morte celular por apoptose tem sido proposta como o principal mecanismo envolvido na patogênese da infecção pelo HIV-1 associada ao processo de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sendo que a via mais envolvida é a mediada por ativação do receptor FAS através de seu ligante FASL (Ameisen, 1994; Nagata, 1999; Badley *et al.*, 2000).

O sistema FAS/FASL está envolvido na regulação da resposta imune e no processo de maturação dos linfócitos, e a apoptose mediada pelo receptor FAS é, em adição à via das perforinas e granzimas, um mecanismo pelo qual os linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> matam seus alvos (Alderson *et al.*, 1995; Boise *et al.*, 1995).

Durante infecções virais, a via de ativação do receptor FAS pode resultar na eliminação de células infectadas, bem como na destruição de células não infectadas. Muitos estudos estão sendo desenvolvidos demonstrando o papel da interação entre FAS/FASL durante a infecção pelo HIV-1, e já foi observado um aumento na expressão do receptor FAS nos linfócitos de pacientes infectados com conseqüente aumento da apoptose nestes (Debatin *et al.*, 1994; Katsikis *et al.*, 1995; McCloskey *et al.*, 1995; Oyaizu *et al.*, 1995; Estaquier *et al.*, 1996).

Neste contexto Bohler e colaboradores sugeriram que a desregulação do sistema FAS/FASL inicia um importante papel no desenvolvimento de imunodeficiência durante o curso da infecção pelo HIV-1 em crianças (Bohler *et al.*, 1997).

Um estudo realizado em 1997 por Sloand e colaboradores demonstrou que a expressão do receptor FAS é aumentada em pacientes infectados pelo HIV-1 quase três vezes mais em relação aos controles soronegativos, tanto em linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto

CD8<sup>+</sup>, o que foi confirmado por estudo de Mueller em 2001, em que se observou que células T CD8<sup>+</sup> HIV-1 específicas são três vezes mais sensíveis à apoptose estimulada por FAS quando comparado às células T CD8<sup>+</sup> CMV específicas (Sloand *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 2001). Além disso, foi observado por Sloand um aumento significativo de FAS em pacientes com história de infecção oportunista e/ou contagem de CD4 < 200 células/ $\mu$ L (Sloand *et al.*, 1997).

Neste mesmo estudo foi detectado ainda um aumento de FASL em linfócitos de pacientes infectados pelo HIV-1, o que não foi observado no grupo de indivíduos soronegativos (Sloand *et al.*, 1997). Dockrell e seu grupo de pesquisadores, mostraram que a expressão de FASL é aumentada quatro vezes mais em macrófagos, no tecido linfóide, de pacientes infectados pelo HIV-1 em relação aos soronegativos. Assim, tanto linfócitos, quanto macrófagos podem induzir a apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup> mediada pelo receptor FAS na infecção pelo HIV-1 (Badley *et al.*, 1996;1997; Dockrell *et al.*, 1998).

A análise da interação deste sistema nos pacientes infectados pelo HIV-1, tem demonstrado que antes da terapia anti-retroviral há uma suscetibilidade aumentada de apoptose mediada por FAS, o que diminui significativamente durante a terapia, juntamente com o aumento dos níveis de célula T CD4<sup>+</sup>, mostrando que este sistema está diretamente relacionado à depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-1 (Badley *et al.*, 1998).

Em 2000, uma pesquisa sugeriu que em pacientes com infecção aguda causada por HIV-1 pode existir uma desregulação do sistema FAS/FASL, o que provavelmente não está inteiramente relacionado à produção viral, mas pode contribuir de maneira significativa para a patogênese da doença (Cossarizza *et al.*, 2000).

Estudos têm buscado, também, associação entre os polimorfismos existentes nos genes *FAS* e *FASL* e o mecanismo de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HIV-1. Em 1998, Cascino e colaboradores não encontraram nenhuma associação significativa entre os polimorfismos no gene *FAS* e a infecção pelo HIV-1, assim como estudo de Vasilescu e colaboradores, que ao analisarem os polimorfismos tanto no gene *FAS* quanto no gene *FASL* não observaram significância estatística entre os polimorfismos nestes genes e a progressão a Aids (Cascino *et al.*, 1998; Vasilescu *et al.*, 2004). Entretanto estudo de Nasi em 2005 observou uma diferença significativa na distribuição do polimorfismo IVS3nt169 presente no gene *FASL*, sendo deleção de T encontrada com maior frequência em controles saudáveis. Além disso, pacientes com a combinação desta deleção em heterozigose (T/delT) com o homozigoto A/A na posição -124 *FASL*, demonstraram melhor resposta terapêutica, considerando o aumento dos níveis de linfócito T CD4<sup>+</sup> (Nasi *et al.*, 2005).

Entretanto estes resultados ainda são muito controversos, sendo necessário um maior número de investigações que busquem determinar o papel destes polimorfismos no curso da infecção pelo HIV-1, pois, caso exista alguma associação, pode ser no futuro uma importante ferramenta a ser utilizada no acompanhamento e tratamento da infecção.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

Caracterização molecular dos polimorfismos nos genes *FAS* e *FASL* em indivíduos portadores da infecção pelo *Vírus da imunodeficiência humana-1* (HIV-1).

### 1.5.2 Objetivos específicos

**i)** Determinar a frequência do polimorfismo -670 (A>G) no gene *FAS* em indivíduos portadores do HIV-1 e em indivíduos soronegativos para a infecção;

**ii)** Determinar a frequência dos polimorfismos IVS2nt-124 (A>G) e IVS3nt-169 (delT) no gene *FASL* em indivíduos portadores do HIV-1 e em indivíduos soronegativos para a infecção;

**iii)** Investigar a existência de associação entre os polimorfismos nos genes *FAS* e *FASL* com os níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos indivíduos portadores da infecção pelo HIV-1 e comparar com os valores obtidos em um grupo controle de indivíduos soronegativos;

**iv)** Investigar a existência de associação entre os polimorfismos nos genes *FAS* e *FASL* com os níveis de carga viral plasmática nos indivíduos portadores da infecção pelo HIV-1.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 2.1.1 Indivíduos soropositivos para HIV-1

No presente estudo foram avaliados 198 indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1, 70 mulheres e 128 homens, cujas idades variam entre 19 e 69 anos, com média de 39,9 anos, atendidos na Unidade de Referência Especializada em Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais (URE-DIPE), do Estado do Pará, no período entre setembro de 2007 e junho de 2008, cujas amostras de sangue foram obtidas em um sistema de colheita a vácuo, em tubos de 5 mL contendo EDTA como anticoagulante, para a obtenção de plasma e massa celular.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará para a realização de testes de contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e de carga viral plasmática, como parte integrante da Rede Nacional de Contagem de Células CD4<sup>+</sup> e da Rede Nacional de Carga Viral Plasmática, do Ministério da Saúde, e caracterização do polimorfismo genético.

Os critérios de inclusão adotados foram indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, que façam parte do acompanhamento da Rede Nacional de contagem de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e carga viral plasmática, que aceitaram participar da pesquisa após esclarecimento do estudo mediante a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) e responderam ao questionário epidemiológico (Anexo 2) entregues no momento da coleta, deste foi obtido as informações sobre gênero, idade e uso de terapia anti-retroviral (TARV). Foram excluídos da pesquisa indivíduos que não preencheram os requisitos estipulados acima.

### **2.1.2 Indivíduos controles soronegativos para HIV-1/2**

Neste estudo foi utilizado como grupo controle, um total de 191 indivíduos profissionais da saúde, 129 mulheres e 62 homens cujas idades variam entre 18 e 62 anos, com média de 29,5 anos, provenientes de Laboratórios de Pesquisa e Laboratórios de Análises Clínicas públicos e particulares da cidade de Belém, cujas amostras foram coletadas em um sistema de colheita a vácuo em tubos de 5 mL contendo EDTA como anticoagulante, no período entre julho de 2007 e janeiro de 2009, e encaminhadas ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Pará, onde foram processadas e em seguida estocadas a -20°C até o momento do uso.

As amostras foram testadas para presença de anticorpos anti-HIV-1/2 através de ensaio imunoenzimático, e avaliadas quanto aos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, além da caracterização do polimorfismo genético.

Foram incluídos na pesquisa amostras de indivíduos maiores de 18 anos de idade, soronegativos para HIV-1/2 e que aceitaram em participar do estudo. Foram excluídos aqueles que não aceitaram assinar o termo de consentimento e/ou que apresentaram resultado positivo ou inconclusivo na sorologia para HIV-1/2.

### **2.1.3 Aspectos éticos**

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto, protocolo nº 2092/05, em obediência à resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, a qual trata das diretrizes e normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos (Anexo 3).

## 2.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HIV-1/2

Os indivíduos que constituíram o grupo controle tiveram suas amostras de plasma testadas para a presença de anticorpos anti-HIV-1/2, através de um ensaio imunoenzimático (*Ortho-Clinical Diagnostic Inc., Rochester, USA*) no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

## 2.3 MONITORAMENTO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1

### 2.3.1 Quantificação da carga viral plasmática

A carga viral plasmática nos indivíduos soropositivos para o HIV-1 foi determinada pelo método *branched DNA (bDNA)*, utilizando o kit *Versant® HIV-1 RNA 3.0 Assay bDNA (Bayer Corporation, Massachusetts, USA)*, através do equipamento de leitura *System 340 bDNA Analyzer (Siemens, Deerfield, USA)*.

### 2.3.2 Quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

A contagem de linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup>) e citotóxicos (CD3<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup>) foi realizada por citometria de fluxo (*BD FACScount™, Becton & Dickinson*) usando o kit de monitoramento da *FACScount™ Reagents* de acordo com o protocolo padrão recomendado pelo fabricante (*Becton & Dickinson, San Jose, USA*).

## 2.4 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2.4.1 Extração do DNA

A Extração de DNA total a partir de leucócitos do sangue periférico foi realizada no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da

Universidade Federal do Pará, através do método de fenol-clorofórmio, seguindo as etapas de lise celular, precipitação de proteínas, precipitação e hidratação do DNA.

## **2.4.2 Investigação molecular das formas alélicas dos genes *FAS* e *FASL***

### **2.4.2.1 Identificação do polimorfismo na posição -670 *FAS***

Os alelos *A* e *G* na posição -670 do gene *FAS* foram identificados através da reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática com a endonuclease de restrição *MvaI*, uma vez que a troca de A para G cria um sítio de restrição nesta posição reconhecido pela enzima (Huang *et al.*, 1999).

A PCR foi realizada em um volume de 50 µL contendo 100 ng de DNA extraído, 200 Mm de cada dNTP, 200 nmol de cada iniciador, KCl<sub>2</sub> 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1 U de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores envolvidos nesta reação foi (-670Dir) 5'-CTACCTAAGAGCTATCTACCGTTC-3' e (-670Rev) 5'-GGCTGTCCATGTTGTGGCTGC-3', o qual amplifica um produto de 322 pares de base. O produto amplificado (322 pb) foi submetido à incubação com a endonuclease de restrição *MvaI*, sendo clivado em 221 e 101 pares de base devido um sítio natural para a enzima qualquer que seja o alelo, e no caso da presença do alelo *G*, outro sítio é criado, sendo o fragmento de 221 pb, clivado em 184 e 37 pb, já na presença do alelo *A*, o fragmento de 221 pb não é digerido.

### **2.4.2.2 Identificação do polimorfismo IVS2nt-124 *FASL***

A identificação dos alelos *A* e *G* foi realizada através da metodologia de ACRS (*amplification-created restriction site* – sítio de restrição criado por amplificação). Este método é baseado na técnica de PCR, e através dele é possível

avaliar polimorfismos por meio de um iniciador desenhado com a alteração de uma base, de modo que crie um sítio de restrição artificial no alelo selvagem ou mutante (Eiken *et al.*, 1991).

A reação de amplificação de 239 pb do gene *FASL* foi realizada em um volume de 50  $\mu$ L contendo 100 ng de DNA extraído, 200 Mm de cada dNTP, 5 pmol de cada iniciador,  $KCl_2$  50 mM,  $MgCl_2$  1,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1 U de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores envolvidos nesta reação foi (-124Dir) 5'-GCA GTTCAGACCTACATGATTAGGAT-3' e (-124Rev) 5'-CCAATTCTCACCTGTACC TTC-3', o qual contém uma alteração (negrito e sublinhado) que cria um sítio de restrição para a enzima *FokI* na presença do alelo *G*. O produto amplificado foi então submetido à incubação com endonuclease de restrição *FokI*, a qual cliva o alelo *G* em 211 e 28 pb, sendo que o alelo *A* não é digerido e permanece com 239 pb (Nasi *et al.*, 2005).

#### 2.4.2.3 Identificação do polimorfismo IVS3nt-169 *FASL*

Assim como para a identificação do polimorfismo IVS2nt-124 *FASL*, a determinação da deleção de T na posição IVS3nt-169 do terceiro íntron do gene *FASL* foi efetuada por meio de ACRS.

A reação de PCR foi realizada em um volume de 50  $\mu$ L contendo 100 ng de DNA extraído, 200 Mm de cada dNTP, 5 pmol de cada iniciador,  $KCl_2$  50 mM,  $MgCl_2$  1,5 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1 U de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores envolvidos nesta reação foi (-169Dir) 5'-AGGAAAGG ACTTCAAAGCCTA-3' e (-169Rev) 5'-TTGATGCATCACAGAATTTCGTC -3'. O iniciador -169Rev contém uma alteração (negrito e sublinhado) responsável pela criação de um sítio de restrição

para a enzima *HincII* na presença de T na posição -169. O produto amplificado foi submetido então à incubação com a endonuclease de restrição *HincII*, a qual cliva o alelo *T* em 162 e 23 pb, e no caso da deleção de T (alelo *delT*), não há digestão e o fragmento permanece em 185 pb (Nasi *et al.*, 2005).

#### 2.4.2.4 Eletroforese

Os produtos da amplificação e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 3 e 4%, respectivamente, em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA- $\text{Na}_2$  40 mM/1000 mL água deionizada), corado com Syber Safe, mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta (Figuras 14, 15 e 16).

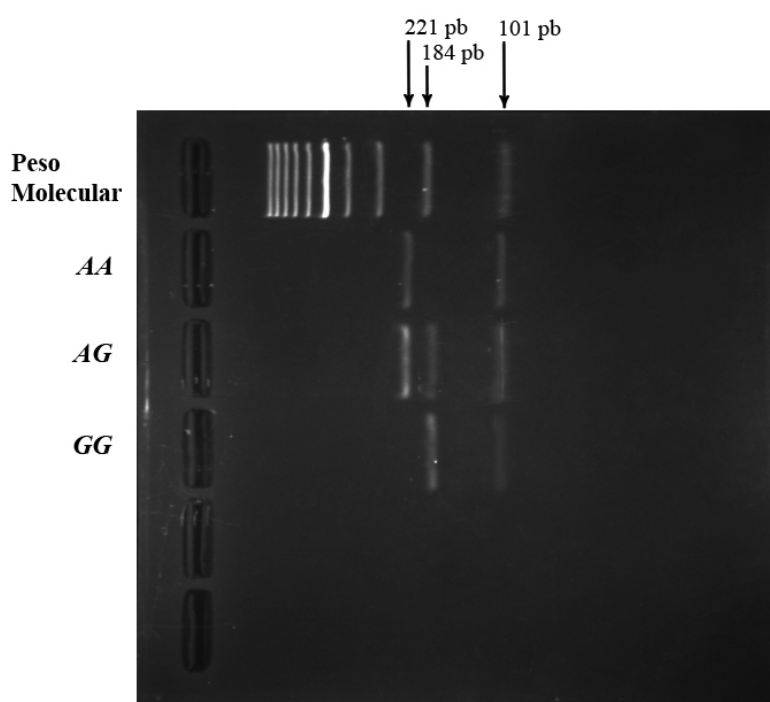


Figura 13 - Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima *MvaI*, a partir do fragmento amplificado de 322 pb da região promotora do gene *FAS*.

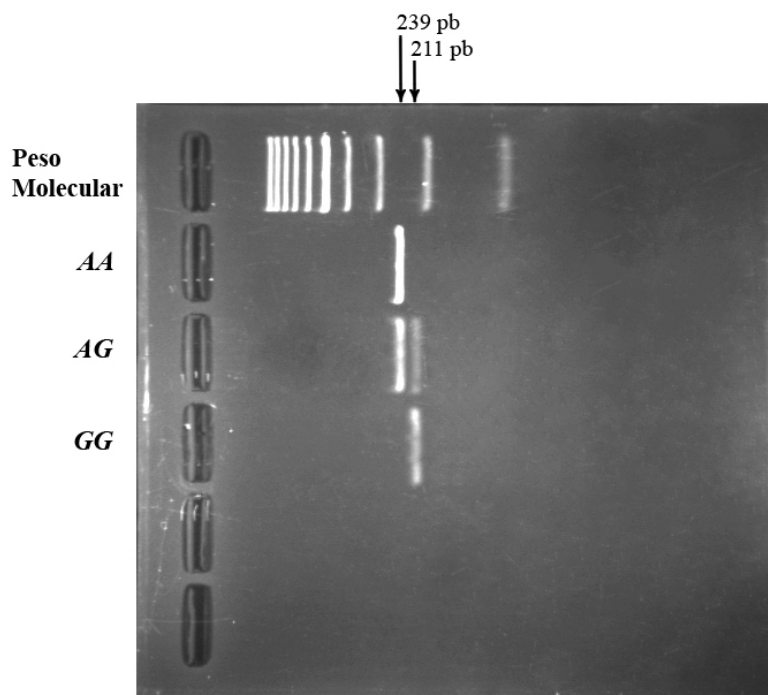


Figura 14 - Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima *FokI*, a partir do fragmento amplificado de 239 pb do segundo íntron do gene *FASL*.

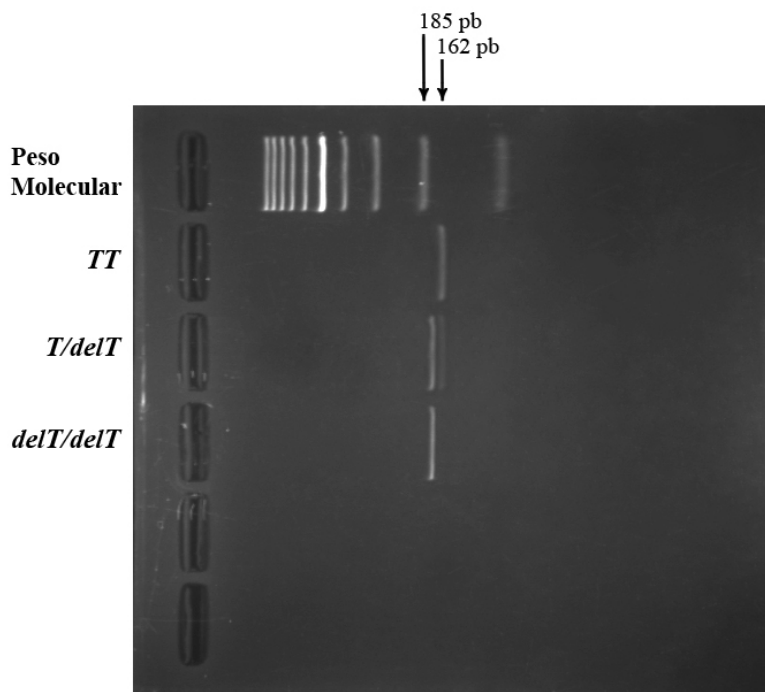


Figura 15 - Perfil eletroforético de RFLP, com a enzima *HincII*, a partir do fragmento amplificado de 185 pb do terceiro íntron do gene *FASL*.

## 2.5 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As análises comparativas das frequências alélicas e genóticas, entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 e controles soronegativos, foram efetuadas por meio do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), enquanto que a análise comparativa dos valores dos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, bem como de carga viral plasmática entre os indivíduos portadores dos diferentes genótipos foi realizada por meio do teste *Mann-Whitney*, e teste G quando os valores foram agrupados em categorias.

Todos os testes foram realizados utilizando o programa BioEstat 5.0v (Ayres *et al.*, 2007).



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Os polimorfismos na região promotora do gene *FAS* e no segundo e terceiro intron do gene *FASL* foram investigados em um grupo populacional composto por 389 indivíduos, subdivididos em 198 indivíduos soropositivos para o HIV-1 e 191 controles soronegativos.

Nos grupos populacionais analisados verificou-se a existências de todas as variantes alélicas para os três polimorfismos analisados. Tanto o grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1, quanto o grupo controle soronegativo estão em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em relação às frequências genotípicas dos polimorfismos -670 *FAS* ( $p: 0,7153$ ;  $p:0,7820$ , respectivamente), -124 *FASL* ( $p:0,8849$ ;  $p: 0,7302$ , respectivamente), e -169 *FASL* ( $p: 0,6893$ ;  $p: 0,3983$ , respectivamente).

Quando analisado o polimorfismo -670 *FAS* a análise comparativa das frequências genotípicas demonstrou a maior prevalência do genótipo selvagem *AA* entre o grupo controle (18,85%) quando comparado ao grupo de infectados (15,15%), bem como a maior prevalência do genótipo homocigoto mutante *GG* entre os soropositivos (38,89%) em relação aos soronegativos (30,89%), o genótipo *AG* apresentou prevalência de 45,96% entre os infectados pelo HIV-1 e 50,26% entre o grupo controle. A análise das frequências alélicas demonstrou a presença dos alelos *A* e *G* com uma frequência de 0,38 e 0,62 nos indivíduos infectados pelo HIV-1 e de 0,44 e 0,56 no grupo controle, respectivamente. Entretanto, as diferenças observadas não apresentaram valores estatisticamente significativos, tanto na análise comparativa das frequências genotípicas ( $p:0,2303$ ), como a análise comparativa das frequências alélicas ( $p:0,1130$ ), (Tabela 1).

**Tabela 1** - Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo -670 *FAS* (A>G) entre os grupos investigados.

<b>Perfil Genético</b>	<b>HIV-1</b>	<b>Controle</b>	$\chi^2$	<i>p</i>
	<b><i>n</i> (%)</b>	<b><i>n</i> (%)</b>		
<i>Alelos</i>				
<i>A</i>	0,38	0,44		
<i>G</i>	0,62	0,56	2,512	0,1130
<i>Genótipo</i>				
<i>AA</i>	30 (15,15)	36 (18,85)		
<i>AG</i>	91 (45,96)	96 (50,26)		
<i>GG</i>	77 (38,89)	59 (30,89)		
<b>Total</b>	<b>198 (100)</b>	<b>191 (100)</b>	<b>2,936</b>	<b>0,2303</b>

*n*: Número de indivíduos analisados.

Em relação ao polimorfismo -124 *FASL*, a análise comparativa das frequências genóticas apresentou o genótipo AA com frequências de 81,82% e 82,72%, AG com frequências de 17,17% e 16,23% e o genótipo GG, menos prevalente, com frequências de 1,01% e 1,05% em soropositivos e soronegativos, respectivamente, o que não revelou diferença estatística significativa ( $p$ : 0,9692). O alelo selvagem *A* foi encontrado com maior frequência, tanto no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 (0,90), quanto no grupo controle soronegativo (0,91), enquanto que o alelo *G* apresentou frequências de 0,10 e 0,09 entre os portadores do HIV-1 e grupo controle, respectivamente, sem diferença significativa ( $p$ : 0,9327) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo -124 *FASL* (A>G) entre pacientes infectados pelo HIV-1 e indivíduos soronegativos.

<b>Perfil Genético</b>	<b>HIV-1</b>	<b>Controle</b>	$\chi^2$	<i>P</i>
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		
<i>Alelos</i>				
<i>A</i>	0,90	0,91		
<i>G</i>	0,10	0,09	0,007	0,9327
<i>Genótipo</i>				
<i>AA</i>	162 (81,82)	158 (82,72)		
<i>AG</i>	34 (17,17)	31 (16,23)		
<i>GG</i>	02 (1,01)	02 (1,05)		
<b>Total</b>	<b>198 (100)</b>	<b>191 (100)</b>	<b>0,063</b>	<b>0,9692</b>

*n*: Número de indivíduos analisados.

Considerando o polimorfismo na posição -169 do terceiro íntron do gene *FASL*, denominado -169 *FASL*, observamos os genótipos *TT*, *T/delT* e *delT/delT* com frequências de 83,33%, 15,66% e 1,01% entre soropositivos e 79,58%, 19,89% e 0,52% entre os soronegativos, respectivamente, entretanto não foi observado diferença estatisticamente significante (*p*: 0,4841), bem como na análise das frequências alélicas (*p*: 0,5157) a qual apresentou o alelo selvagem *T* com frequências de 0,91 e 0,90 entre os soropositivos e o grupo controle, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3** - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo -169 *FASL* (*T>delT*) entre os grupos analisados.

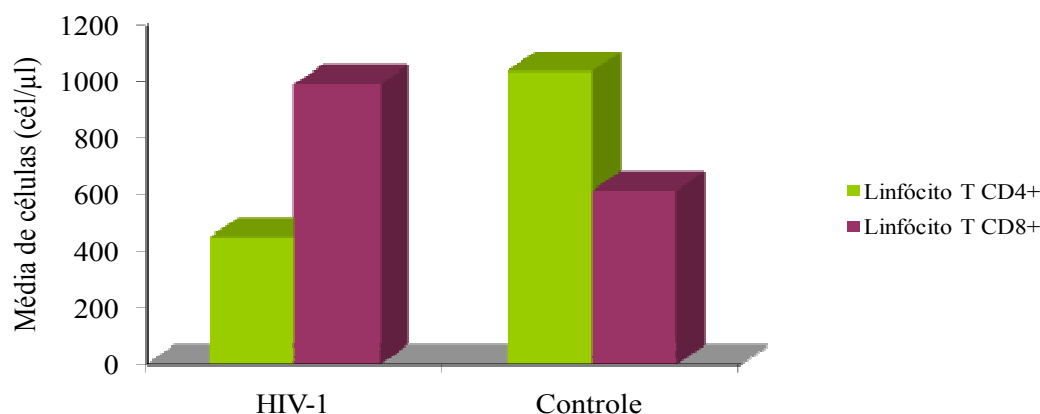
Perfil Genético	HIV-1	Controle	$\chi^2$	P
	n (%)	n (%)		
<i>Alelos</i>				
<i>T</i>	0,91	0,90		
<i>DelT</i>	0,09	0,10	0,422	0,5157
<i>Genótipo</i>				
<i>TT</i>	165 (83,33)	152 (79,58)		
<i>T/delT</i>	31 (15,66)	38 (19,89)		
<i>delT/delT</i>	02 (1,01)	01 (0,52)		
<b>Total</b>	<b>198 (100)</b>	<b>191 (100)</b>	<b>1,451</b>	<b>0,4841</b>

*n*: Número de indivíduos analisados.

### 3.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> E T CD8<sup>+</sup>

Foram realizadas as contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nas 198 amostras dos indivíduos integrantes do grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 e, para efeito de comparação, nas 191 amostras dos indivíduos soronegativos. Nos soropositivos a análise do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> variou de 6 a 1256 células/ $\mu$ L, com média de 451,5 células/ $\mu$ L, em relação ao número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram encontrados valores que variaram de 93 a >2000 células/ $\mu$ L, com média de 991,44 células/ $\mu$ L. Dentre os indivíduos soronegativos, constituintes do grupo controle, a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> variou de 411 a >2000 células/ $\mu$ L, com média de

1037,86 células/ $\mu\text{L}$ . A quantificação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> variou de 162 a 1368 células/ $\mu\text{L}$ , com média de 613,75 células/ $\mu\text{L}$  (Figura 17).



**Figura 16** – Quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1 e controles soronegativos.

Os níveis médios de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram comparados entre os portadores dos diferentes genótipos para os três polimorfismos analisados dentre todos os 198 indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1. A análise também foi efetuada dentre aqueles soropositivos que no momento da primeira dosagem não haviam ainda sido submetido à terapia anti-retroviral (TARV), correspondendo a 49 indivíduos e os 191 controles soronegativos.

Considerando todos os indivíduos infectados pelo HIV-1, independente do tratamento anti-retroviral, a média dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em relação ao polimorfismo -670 *FAS*, foi maior entre os portadores do alelo *G*, seja em homo ou heterozigose, quando comparado àqueles portadores genótipo selvagem *AA*, com valores médios de 470,36 e 345,87 células/ $\mu\text{L}$ , respectivamente, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p$ : 0,0222). Levando em consideração o polimorfismo -124 *FASL* não

houve diferença estatística significativa entre as médias dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e os diferentes genótipos analisados ( $p$ : 0,9795), diferentemente do observado na análise do polimorfismo -169 *FASL*, na qual a média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi maior ( $p$ : 0,0453; Tabela 4) entre os soropositivos portadores do genótipo selvagem *TT* (465,38 células/ $\mu$ L) em relação aos portadores dos genótipos polimórficos *T/delT* e *delT/delT* (382,10 células/ $\mu$ L).

**Tabela 4** – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Perfil Genético</b>	<b>Indivíduos analisados (n)</b>	<b>Média T CD4<sup>+</sup> (células/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Mediana T CD4<sup>+</sup> (células/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Mann-Whitney</b>	<b>p</b>
<b>-670 <i>FAS</i></b>					
<i>AA</i>	30	345,87	342		
<i>AG;GG</i>	168	470,36	430,5	U: 1859,00	0,0222
<b>-124 <i>FASL</i></b>					
<i>AA</i>	162	450,70	411,50		
<i>AG;GG</i>	36	455,11	423	U: 2908,00	0,9795
<b>-169 <i>FASL</i></b>					
<i>TT</i>	165	465,38	421		
<i>T/delT;delT/delT</i>	33	382,10	378	U: 2121,00	0,0453
<b>Total</b>	<b>198</b>	-	-	-	-

Ainda em relação aos soropositivos para a infecção pelo HIV-1, independente de TARV, a análise da média dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os portadores dos diferentes genótipos não revelou diferença estatística significativa para os três polimorfismos analisados, apesar de ter sido observado uma média de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ligeiramente maior entre os portadores dos genótipos polimórficos *T/delT* e *delT/delT* (Tabela 5).

**Tabela 5** – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Perfil Genético</b>	<b>Indivíduos analisados (n)</b>	<b>Média T CD8<sup>+</sup> (células/μL)</b>	<b>Mediana T CD8<sup>+</sup> (células/μL)</b>	<b>Mann-Whitney</b>	<b>P</b>
<b>-670 FAS</b>					
<i>AA</i>	30	974,67	994,35		
<i>AG;GG</i>	168	994,35	903	U: 2371,00	0,6063
<b>-124 FASL</b>					
<i>AA</i>	162	999,59	903		
<i>AG;GG</i>	36	954,72	879	U: 2758,00	0,6125
<b>-169 FASL</b>					
<i>TT</i>	165	967,25	884		
<i>T/delT ; delT/delT</i>	33	1112,36	1004	U: 2197,00	0,0803
<b>Total</b>	<b>198</b>	-	-	-	-

Em relação àqueles 49 indivíduos infectados pelo HIV-1 que não haviam sido submetidos à TARV, considerando o polimorfismo -670 *FAS*, mais uma vez o nível médio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi maior entre os portadores dos genótipos *AG* e *GG* (454,43 células/ $\mu$ L) quando comparado aos portadores do genótipo *AA*, nos quais foi observado um nível médio de 293,43 células/ $\mu$ L. Entretanto, tal diferença não revelou diferença estatística significativa, ainda que o valor de *p* tenha sido observado nos valores críticos de significância (*p*:0,0520). Quando analisado os polimorfismos -124 *FASL* e -169 *FASL* neste mesmo grupo, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os níveis médios de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e os portadores dos diferentes genótipos, com valores de *p* de 0,6849 e 0,9618, respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6** – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1, não submetidos à TARV, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Perfil Genético</b>	<b>Indivíduos analisados (n)</b>	<b>Média T CD4<sup>+</sup> (células/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Mediana T CD4<sup>+</sup> (células/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Mann-Whitney</b>	<b>P</b>
<b>-670 <i>FAS</i></b>					
<i>AA</i>	7	293,43	273,0		
<i>AG;GG</i>	42	454,43	404,0	U: 79,00	0,0520
<b>-124 <i>FASL</i></b>					
<i>AA</i>	41	438,54	378,0		
<i>AG</i>	8	395,0	384,0	U: 149,00	0,6849
<b>-169 <i>FASL</i></b>					
<i>TT</i>	38	441,58	363		
<i>T/delT ; delT/delT</i>	11	396,36	414	U: 207,00	0,9618
<b>Total</b>	<b>49</b>	-	-	-	-



Levando em consideração os níveis médios de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os soropositivos virgens de tratamento anti-retroviral, não foi observada qualquer diferença estatística relevante entre os portadores dos diferentes genótipos analisados. Porém foi observado um valor médio maior entre os portadores do alelo *G* para o polimorfismo -670 *FAS* (1144,02 células/ $\mu$ L) em relação àqueles portadores do genótipo selvagem *AA* (980,57 células/ $\mu$ L), bem como um valor menor na média dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os indivíduos com genótipo *AG* para o polimorfismo -124 *FASL*, nos quais foi observado um valor médio de 895,87 células/ $\mu$ L, sendo que nos indivíduos selvagens *AA* foi encontrado um valor médio de 1164,54 células/ $\mu$ L (Tabela 7).

**Tabela 7** – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 não submetidos à TARV, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Perfil Genético</b>	<b>Indivíduos analisados</b>	<b>Média T CD8<sup>+</sup> (células/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Mediana T CD8<sup>+</sup> (células/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Mann-Whitney</b>	<b>P</b>
<b>-670 <i>FAS</i></b>					
<i>AA</i>	7	980,57	851,0		
<i>AG;GG</i>	42	1144,02	1027,0	U: 109,00	0,2776
<b>-124 <i>FASL</i></b>					
<i>AA</i>	41	1164,54	1084,0		
<i>AG</i>	8	895,87	879,0	U: 100,5	0,0859
<b>-169 <i>FASL</i></b>					
<i>TT</i>	38	1100,42	980,5		
<i>T/delT ; delT/delT</i>	11	1190,64	1084,0	U:195,50	0,7463
<b>Total</b>	<b>49</b>	-	-	-	-

A análise dos níveis médios de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> entre os controles soronegativos, realizada para efeito de comparação entre os dois grupos, não revelou diferença estatística significativa entre os portadores dos diferentes genótipos tanto para o polimorfismo -670 *FAS* ( $p:0,2674$ ;  $p:0,6079$ , respectivamente), -124 *FASL* ( $p:0,3390$ ;  $p:0,3123$ , respectivamente), bem como para o polimorfismo -169 *FASL* ( $p:0,4518$ ;  $p:0,3146$ , respectivamente; Tabelas 8 e 9).

**Tabela 8** – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os indivíduos controles soronegativos, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Perfil Genético</b>	<b>Indivíduos analisados (n)</b>	<b>Média T CD4<sup>+</sup> (células/μL)</b>	<b>Mediana T CD4<sup>+</sup> (células/μL)</b>	<b>Mann-Whitney</b>	<b>P</b>
<b>-670 <i>FAS</i></b>					
<i>AA</i>	36	1095,94	1111,0		
<i>AG;GG</i>	155	1039,65	1019,0	U: 2426,5	0,2674
<b>-124 <i>FASL</i></b>					
<i>AA</i>	158	1061,24	1047,0		
<i>AG;GG</i>	33	999,00	957,0	U: 2301,00	0,3390
<b>-169 <i>FASL</i></b>					
<i>TT</i>	152	1059,15	1047,0		
<i>T/delT ; delT/delT</i>	39	1016,59	987,0	U:2696,00	0,4518
<b>Total</b>	<b>191</b>	-	-	-	-

**Tabela 9** – Comparação dos níveis médios de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os indivíduos controles soronegativos, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Perfil Genético</b>	<b>Indivíduos analisados (n)</b>	<b>Média T CD8<sup>+</sup> (células/μL)</b>	<b>Mediana T CD8<sup>+</sup> (células/μL)</b>	<b>Mann-Whitney</b>	<b>P</b>
<b>-670 FAS</b>					
<i>AA</i>	36	629,08	616,5		
<i>AG;GG</i>	155	624,14	577,0	U:2602,5	0,6079
<b>-124 FASL</b>					
<i>AA</i>	158	634,6	593,5		
<i>AG;GG</i>	33	580,10	512,0	U: 2285,5	0,3123
<b>-169 FASL</b>					
<i>TT</i>	152	636,48	601,0		
<i>T/delT ; delT/delT</i>	39	576,51	545,0	U:2672,0	0,3146
<b>Total</b>	<b>191</b>	-	-	-	-

A quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi ainda analisada de acordo com as frequências genóticas para as regiões gênicas nos 198 indivíduos soropositivos, após o agrupamento de acordo com os níveis dos linfócitos em três categorias: <200 células/μL, entre 200 e 500 células/μL e >500 células/μL. Esses valores foram estabelecidos com base na classificação dos pacientes soropositivos para a infecção pelo HIV em três categorias pelo CDC. Valores inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup> são associados

à imunossupressão, e, desta forma, considerados características e definidoras de Aids (CDC, 1992).

A análise das frequências genóticas para o polimorfismo -670 *FAS* revelou maior frequência do genótipo *AA* entre os soropositivos com número de células T  $CD4^+ < 200$  células/ $\mu$ L, e maior prevalência do genótipo *AG* entre aqueles com número de células  $>500$  células/ $\mu$ L, já o genótipo *GG* se apresentou bem distribuído entre as três categorias, não revelando assim diferença estatística significativa ( $p: 0,1034$ ) (Tabela 10). Entretanto quando se agrupou os genótipos *AG* e *GG*, levando-se em consideração o estado de portador de alelo *G*, verificou-se que os homocigotos *AA* foram encontrados com maior frequência entre indivíduos com contagem de células T  $CD4^+$  inferior a 200 células/ $\mu$ L, enquanto que os portadores do alelo *G*, seja em homo ou heterocigose, foram encontrados com maior frequência entre aqueles com células T  $CD4^+ > 500$  células/ $\mu$ L (Tabela 11).

A distribuição das frequências genóticas do polimorfismo -124 *FASL* não apresentou diferença significativa ( $p: 0,3175$ ), assim como a distribuição das frequências genóticas do polimorfismo -169 *FASL* ( $p: 0,1152$ ), embora neste tenha sido observado a maior prevalência do genótipo *TT* entre aqueles com  $LTCD4^+ > 500$  células/ $\mu$ L e maior frequência dos genótipos *T/delT* e *delT/delT* entre os indivíduos com contagens de  $LTCD4^+ < 200$  células/ $\mu$ L (Tabela 10).

**Tabela 10** – Distribuição das frequências genóticas dos polimorfismos analisados no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o nível de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

<b>Perfil Genético</b>	<b>LTCD4<sup>+</sup>&lt;200 n(%)</b>	<b>200≤LTCD4<sup>+</sup>≤500 n(%)</b>	<b>LTCD4<sup>+</sup>&gt;500 n(%)</b>	<b>Teste G</b>	<b>P</b>
<b>-670 FAS</b>					
<i>AA</i>	10 (26,32)	14 (15,56)	06 (8,57)		
<i>AG</i>	12 (31,58)	42 (46,67)	37 (52,86)		
<i>GG</i>	16 (42,10)	34 (37,77)	27 (38,57)	7,695	0,1034
<b>-124 FASL</b>					
<i>AA</i>	31 (81,58)	73 (81,11)	58 (82,86)		
<i>AG</i>	07 (18,42)	17 (18,89)	10 (14,28)		
<i>GG</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	02 (2,86)	4,718	0,3175
<b>-169 FASL</b>					
<i>TT</i>	28 (73,68)	73 (81,11)	64 (91,43)		
<i>T/delT</i>	09 (23,68)	16 (17,78)	06 (8,57)		
<i>delT/delT</i>	01 (2,63)	01 (1,11)	0 (0,00)	7,422	0,1152
<b>Total</b>	<b>38 (100)</b>	<b>90 (100)</b>	<b>70 (100)</b>	-	-

*n*: Numero de indivíduos analisados.

**Tabela 11** – Distribuição das frequências genóticas do polimorfismo -670 *Fas* analisados no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o nível de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

<b>Perfil Genético</b>	<b>LTCD4<sup>+</sup>&lt;200 n(%)</b>	<b>200≤LTCD4<sup>+</sup>≤500 n(%)</b>	<b>LTCD4<sup>+</sup>&gt;500 n(%)</b>	<b>Teste G</b>	<b>P</b>
<b>-670 FAS</b>					
<i>AA</i>	10 (26,32)	14 (15,56)	06 (8,57)		
<i>AG;GG</i>	28 (73,38)	76 (84,44)	64 (91,43)	11,466	0,0032
<b>Total</b>	<b>38 (100)</b>	<b>90 (100)</b>	<b>70 (100)</b>	-	-

*n*: Numero de indivíduos analisados.

### 3.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA DO HIV-1

A quantificação da carga viral plasmática do HIV-1 foi realizada em todas as 198 amostras dos indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1 constituintes do grupo de infectados, e as médias aritméticas dos valores obtidos foram comparadas entre os portadores dos diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

A análise comparativa das médias de carga viral plasmática entre os portadores dos diferentes genótipos para o polimorfismo -670 *FAS* não evidenciou nenhuma diferença significativa ( $p$ : 0,8709), o que também foi observado na análise dos polimorfismos -124 *FASL* ( $p$ : 0,8044) e -169 *FASL* ( $p$ :0,1019). Entretanto, na análise do polimorfismo -169 *FASL*, ainda que não tenha sido evidenciada diferença significativa, observamos um maior valor médio de carga viral entre os portadores do alelo polimórfico, em homo ou heterozigose, bem como o valor maior da mediana dos valores de carga viral entre estes indivíduos (Tabela 12).

**Tabela 12** – Comparação dos níveis médios de carga viral plasmática entre os indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV-1 portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Média Carga Viral (cópias/mL)</b>	<b>Mediana Carga Viral (cópias/mL)</b>	<b><i>Mann-Whitney</i></b>	<b><i>p</i></b>
<b>-670 <i>FAS</i></b>				
<i>AA</i>	8389,52	66		
<i>AG;GG</i>	15223,30	51,5	U: 2473,00	0,8709
<b>-124 <i>FASL</i></b>				
<i>AA</i>	15693,64	60		
<i>AG;GG</i>	7180,67	51,5	U: 2839,00	0,8044
<b>-169 <i>FASL</i></b>				
<i>TT</i>	12442,200	50		
<i>T/delT ; delT/delT</i>	22663,97	442,0	U: 2231,00	0,1019

Dentre os 198 soropositivos para a infecção pelo HIV-1, 49 não haviam sido submetido à TARV, sendo a média da carga viral plasmática destes analisada em comparação aos diferentes genótipos para os três polimorfismos estudados. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi evidenciada para qualquer um dos polimorfismos, conforme distribuído na Tabela 13.



**Tabela 13** – Comparação dos níveis médios de carga viral plasmática entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 não submetidos à TARV, portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Média Carga Viral (cópias/mL)</b>	<b>Mediana Carga Viral (cópias/mL)</b>	<b>Mann-Whitney</b>	<b><i>P</i></b>
<b>-670 <i>FAS</i></b>				
<i>AA</i>	89921,0	29624,0		
<i>AG;GG</i>	38499,95	11823,5	U: 100,00	0,1793
<b>-124 <i>FASL</i></b>				
<i>AA</i>	51452,56	12740,0		
<i>AG</i>	17111,25	11823,0	U: 159,00	0,8924
<b>-169 <i>FASL</i></b>				
<i>TT</i>	40811,26	11823,5		
<i>T/delT ; delT/delT</i>	63237,91	15368,0	U: 208,5	0,9904

A análise da quantificação da carga viral plasmática do HIV-1 entre os indivíduos infectados independente da terapia anti-retroviral, foi ainda realizada entre os portadores de diferentes genótipos para os polimorfismos investigados, agrupados em cinco categorias de acordo com o nível de carga viral plasmática, não sendo observada nenhuma diferença estatística significativa entre as frequências genotípicas e o nível de carga viral plasmática (Tabela 14).

**Tabela 14** – Distribuição das frequências genotípicas no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 agrupados de acordo com o nível de carga viral plasmática.

<b>Perfil</b>	<b>CV&lt;50</b>	<b>50≤CV≤1000</b>	<b>1000≤CV≤10000</b>	<b>10000≤CV≤50000</b>	<b>CV&gt;50000</b>
<b>Genético</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>
<b>-670</b>					
<b>FAS</b>					
<i>AA</i>	14(14,28)	05 (15,15)	05 (18,52)	04 (15,39)	02(14,29)
<i>AG</i>	47(47,96)	16 (48,49)	10 (37,04)	10 (38,46)	08(57,14)
<i>GG</i>	37(37,76)	12 (36,36)	12 (44,44)	12 (46,15)	04(28,57)
<b>-124FASL</b>					
<i>AA</i>	80(81,63)	26 (78,79)	23 (85,18)	21 (80,77)	12(85,71)
<i>AG</i>	16(16,33)	07 (21,21)	04 (14,82)	05 (19,23)	02(14,29)
<i>GG</i>	02(2,04)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<b>-169FASL</b>					
<i>TT</i>	86(87,76)	26 (78,79)	22 (81,48)	20 (76,92)	11(78,57)
<i>T/delT</i>	1(12,24)	07 (21,21)	04 (14,82)	06 (23,08)	02(14,29)
<i>delT/delT</i>	0(0,00)	0 (0,00)	01 (3,70)	0 (0,00)	01 (7,14)
<b>Total</b>	<b>98 (100)</b>	<b>33 (100)</b>	<b>27 (100)</b>	<b>26 (100)</b>	<b>14 (100)</b>

*n*: numero de indivíduos analisados; CV: Carga viral plasmática; -670 FAS (Teste G: 2,615; *p*: 0,9562); -124FASL (Teste G: 3,4757; *p*: 0,9011); -169FASL (Teste G:9,2012; *p*: 0,3256).

#### 4 DISCUSSÃO

A distribuição das formas alélicas dos polimorfismos -670 do gene *FAS*, -124 e -169 do gene *FASL*, observadas no presente estudo, tanto nos indivíduos infectados pelo HIV-1, quanto no grupo controle, apresentaram-se de maneira semelhante com as frequências de outros estudos descritos na literatura.

Considerando o polimorfismo -670 *FAS*, um estudo realizado em 1999, conduzido por Huang e colaboradores, relatou frequências dos alelos *A* e *G* de 0,49 e 0,51, respectivamente, em três grupos populacionais analisados, pacientes com artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e indivíduos saudáveis, todos constituídos por australianos de origem caucasóide (Huang *et al.*, 1999). Frequências de 0,54 e 0,46 e 0,58 e 0,42 foram observadas para os mesmos alelos em pacientes com Alzheimer e controles saudáveis, respectivamente, em um estudo escocês desenvolvido por Feuk em 2000 (Feuk *et al.*, 2000). Niino *et al.*, em 2002, observaram em japoneses com esclerose múltipla frequências de 0,51 e 0,49 para os alelos *A* e *G* do mesmo polimorfismo, respectivamente, e em controles saudáveis frequências de 0,53 e 0,47 respectivamente (Niino *et al.*, 2002). Uma pesquisa brasileira desenvolvida recentemente relatou frequências de 0,52, 0,41 e 0,36 para o alelo *A* do polimorfismo -670 *FAS* em pacientes HTLV-1 positivos com Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (LLcTA), HTLV-1 assintomáticos e em controles soronegativos, respectivamente (Farre *et al.*, 2008). Frequências similares são observadas em americanos, portugueses e chineses (Sun *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Crew *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008).

Em indivíduos infectados pelo HIV-1, as frequências dos alelos *A* e *G* do polimorfismo -670 *FAS* tem sido encontradas em 0,51 e 0,49, em franceses (Vasilescu

*et al.*, 2004 ), 0,52 e 0,48 em italianos (Nasi *et al.*, 2005) e 0,56 e 0,44 em italianos soropositivos com lipodistrofia, respectivamente (Zanone Poma *et al.*, 2008).

Em relação aos polimorfismos -124 e -169 do gene *FASL*, ainda são poucos os estudos relacionados às suas freqüência (Bolstad *et al.*, 2000). Pinti *et al.* (2002), ao estudarem um grupo de centenários italianos, observaram os alelos *A* e *G* do polimorfismo -124 *FASL* com freqüências de 0,87 e 0,13, respectivamente, e 0,81 e 0,19 em controles jovens; neste mesmo estudo os alelos *T* e *delT* do polimorfismo -169 *FASL* foram identificados com freqüências de 0,87 e 0,13 em centenários, e 0,82 e 0,18 em jovens, respectivamente (Pinti *et al.*, 2002). Outro estudo, desenvolvido em 2006 com americanos portadores de câncer, relatou freqüências dos alelos *A* e *G* do polimorfismo -124 *FASL* de 0,86 e 0,14, respectivamente; e nos indivíduos saudáveis foram observados freqüências de 0,85 e 0,15, respectivamente (Zhang *et al.*, 2006).

Em portadores da infecção pelo HIV-1, Vasilescu e colaboradores observaram freqüências dos alelos *A* e *G* do polimorfismo -124 *FASL* de 0,83 e 0,17 em assintomáticos e 0,84 e 0,16 naqueles sintomáticos com rápida progressão para AIDS, bem como nos controles soronegativos, respectivamente (Vasilescu *et al.*, 2004). Os mesmos alelos foram encontrados com freqüências de 0,87 e 0,13 em soropositivos e 0,83 e 0,17 em controles soronegativos, respectivamente, em estudo italiano, no qual também observou-se os alelos *T* e *delT* do polimorfismos -169 *FASL* com freqüências de 0,91 e 0,09 nos infectados e 0,84 e 0,16 nos controles, respectivamente (Nasi *et al.*, 2005).

No presente estudo, as freqüências alélicas e genotípicas dos três polimorfismos analisados, as quais se encontram distribuídas de acordo com a literatura, não apresentaram qualquer diferença estatística significativa quando comparadas entre o

grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 e controles soronegativos, não evidenciando assim, qualquer associação entre os polimorfismos estudados e a suscetibilidade a infecção pelo HIV-1. Tais resultados corroboram os achados anteriores de Vasilescu e Nasi em relação aos polimorfismos -670 *FAS* e -124 *FASL*, os quais não apresentaram diferenças significativas entre soropositivos e soronegativos nos dois estudos. Entretanto, discorda de resultados observados por Nasi em relação ao polimorfismo -169 *FASL*, no qual o alelo *delT* foi encontrado com maior frequência entre os controles quando comparado aos infectados pelo HIV-1, sendo esta diferença significativa, diferente do encontrado no nosso estudo, onde os alelos apresentaram-se bem distribuídos entre infectados e soronegativos (Vasilescu *et al.*, 2004; Nasi *et al.*, 2005).

Tais polimorfismos têm sido freqüentemente estudados, principalmente naquelas patologias em que se observa uma execução fisiologicamente anormal da apoptose, tais como cânceres, doenças auto-imunes, neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, entre outras (Huang *et al.*, 1999; Feuk *et al.*, 2000; Niino *et al.*, 2002; Sibley *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004; Crew *et al.*, 2007; Farre *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008). Na infecção pelo HIV-1, a apoptose via FAS/FASL, está diretamente associada ao mecanismo de depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Badley *et al.*, 2000; Cossarizza, 2008), desta maneira, polimorfismos nos genes que codificam o receptor e ligante desta via de ativação, podem estar associados às variações individuais deste marcador laboratorial de valor prognóstico na infecção pelo HIV-1.

Na literatura há dois estudos, realizados em 2004 e 2005, que buscam este tipo de associação. Vasilescu *et al.* (2004) analisaram diferentes polimorfismos dos genes *FAS* e *FASL*, incluindo -670 *FAS* e -124 *FASL*, com o objetivo de esclarecer o quanto as variações destes genes relacionados à apoptose podem influenciar na

progressão da AIDS, não sendo observado nenhuma associação significativa (Vasilescu *et al.*, 2004). Nasi *et al.* (2005), ao estudarem os polimorfismos nestes genes, incluindo os três analisados no presente estudo, não observaram associação quando os polimorfismos foram analisados separadamente, entretanto quando tais polimorfismos foram combinados entre si foi observado que os genótipos *T/delT* e *AA* do gene *FASL*, quando combinados, parece estar associado a uma melhor resposta terapêutica, em relação à combinação *T/delT* e *AG*; da mesma maneira, quando os polimorfismos -670 e -1377 do gene *FAS* foram combinados observou-se uma melhor resposta terapêutica, tanto em relação ao aumento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto à diminuição da carga viral plasmática, entre aqueles portadores dos genótipos heterozigotos combinados para os dois polimorfismos, contudo tais associações precisam ainda ser confirmadas por outros estudos (Nasi *et al.*, 2005).

No presente trabalho, foi observada uma associação estatística significativa ( $p$ : 0,0222) entre a média dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e o perfil genético do polimorfismo -670 *FAS*, onde foi identificada uma média de LTCD4<sup>+</sup> maior entre os infectados portadores do alelo polimórfico *G*, seja em homo ou heterozigose em relação aos portadores do genótipo selvagem *AA*. A substituição de A para G na posição -670 da região promotora do gene *FAS* altera o sítio de ligação do fator de transcrição nuclear STAT-1, assim, este polimorfismo possivelmente influencia na função ou expressão do gene *FAS* (Shuai, 1994; Huang *et al.*, 1997; Sibley *et al.*, 2003).

Nossos achados confirmam esta possível influência, uma vez que, o alelo polimórfico *G*, alterando o sítio de ligação do fator de transcrição STAT-1 e, seja diminuindo a expressão do gene ou alterando a sua função, estará desta forma diminuindo o potencial apoptótico do receptor FAS. Na infecção pelo HIV-1, já foi

muito bem descrito que o receptor FAS encontra-se aumentado nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, com conseqüente aumento da apoptose nestes (Estaquier *et al.*, 1996; Bohler *et al.*, 1997; Sloand *et al.*, 1997), assim se nos indivíduos infectados pelos HIV-1 há uma deficiência na expressão ou função do gene, conseqüentemente espera-se que ocorra nestes uma diminuição na apoptose dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em comparação aos infectados com expressão e função do gene normais. Os dados do presente estudo sugerem então que a presença do alelo *G* nos indivíduos portadores da infecção pelo HIV-1 possa ser um fator de proteção a depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, devido a média maior destes entre os portadores do alelo polimórfico *G* com diferença estatística significativa.

Tal sugestão é reafirmada na análise da média dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os infectados pelo HIV-1 não submetidos à TARV, na qual também foi observado a maior média dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os portadores do alelos *G* (genótipos *AG* e *GG*). Pelo fato de estes indivíduos não terem sido submetidos à TARV, a contagem destas células reflete somente o potencial imunogenético do hospedeiro, não tendo qualquer interferência de drogas anti-retrovirais, sendo assim, o perfil genético do hospedeiro relacionado ao polimorfismo -670 *FAS* pode contribuir nos níveis dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos infectados pelo HIV-1, pois ainda que a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, o valor de *p* nesta análise se apresentou nos valores críticos de significância (*p*: 0,052), o que pode ser explicado pelo número reduzido de pacientes não submetidos à TARV.

Quando realizada a análise dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os controles soronegativos portadores os diferentes genótipos, não foi observada qualquer diferença significativa, o que nos leva a sugerir que não somente o polimorfismo influencie na

apoptose dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e sim quando associado à infecção pelo HIV-1, possivelmente devido ao fato de que na infecção por este retrovírus seja observado um aumento da expressão dos receptor FAS nestas células (Silvestris *et al.*, 1996; Sloand *et al.*, 1997; Bohler *et al.*, 1997).

Considerando os polimorfismos intrônicos do gene *FASL*, foi observada uma diferença significativa devido ao maior valor da média dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 portadores do genótipo *TT* do polimorfismo -169 *FASL*, o que discorda dos achados de Nasi *et al.* (2005), onde foi observado que o genótipo heterozigoto *T/delT*, quando combinado com o genótipo *AA* do polimorfismo -124 *FASL*, estaria associado a contagem maior de linfócitos TCD4<sup>+</sup> quando comparado aos portadores do genótipo *TT*, seja combinado com qualquer genótipo do polimorfismo -124 *FASL* (Nasi *et al.*, 2005). No presente estudo esta mesma análise, quando realizada entre os infectados, virgens de TARV, e soronegativos não revelou nenhuma diferença significativa. Os achados aqui apresentados e aqueles obtidos por Nasi *et al.* (2005), único estudo na literatura que busca este tipo de associação com o polimorfismo -169 *FASL*, além de discordantes são muito prematuros para se fazer qualquer tipo de inferência acerca da influência deste polimorfismo na infecção pelo HIV-1, além disso, não se sabe, até o momento, se esta variabilidade genômica altera a expressão gênica.

Em relação ao polimorfismo -124 *FASL* não foi encontrado nenhuma diferença significativa na contagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> quando comparado os portadores de diferentes genótipos, similar ao observado por Vasilescu *et al.* (2004), entretanto os achados de Nasi *et al.* (2005) sugerem que a presença do alelo *G*, quando associado ao genótipo selvagem *TT* do polimorfismo -169 *FASL*, estaria associado a uma resposta terapêutica insuficiente. Entretanto, estes resultados não são suficientes



para se chegar a qualquer conclusão acerca do papel deste polimorfismo na infecção pelo HIV-1, pelas mesmas razões em relação ao polimorfismo -169 *FASL*. Além disso, pelo fato destes dois polimorfismos se localizarem em introns, é pouco provável que exista algum tipo de associação, uma vez que pouco se sabe sobre o significado biológico desta estrutura genômica (Snustad & Simmons, 2008). Entretanto, como há uma especulação de que estas regiões possam ter um papel na regulação da expressão gênica, para descartar tal hipótese, faz-se necessário a quantificação do mRNA do gene *FASL* nos indivíduos portadores de diferentes genótipos, a fim de que se possa esclarecer se há ou não alteração da expressão gênica devido a estes polimorfismos, ou ainda, investigar o quanto estes polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação com outros genes que possam ter um papel na infecção pelo HIV-1.

Quando realizada a quantificação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não foi observada associação entre os polimorfismos analisados e a contagem destas células. Nos indivíduos infectados pelo HIV-1 observa-se um aumento significativo destas células, quando comparado aos indivíduos normais, não sendo evidenciado apoptose nestas células no curso da infecção, apesar de já ter sido demonstrada que as células TCD8<sup>+</sup> HIV-1 específicas são mais sensíveis à apoptose estimulada por FAS do que às específicas ao CMV (Mueller *et al.*, 2001). Portanto nada ainda se pode concluir a respeito destes polimorfismos na contagem dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no curso da infecção por este vírus.

O controle da replicação viral na infecção pelo HIV-1 é controlada principalmente pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, através das vias das perforinas e granzimas ou através da via FAS/FASL, uma vez que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressam o ligante de FAS e desencadeiam a apoptose na célula-alvo onde o receptor FAS está expresso,

sendo que na infecção, o FASL encontra-se com expressão aumentada nas células T CD8<sup>+</sup> (Sloand *et al.*, 1997; Petrovas *et al.*, 2004). No presente estudo não foi encontrada associação significativa entre os polimorfismos analisados e carga viral plasmática do HIV-1 nos indivíduos estudados, o que sugere que as variantes alélicas analisadas não influenciem na expressão ou função do ligante de FAS nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, de modo que não interfira no controle da replicação viral, e conseqüentemente, nos níveis de carga viral plasmática nos portadores da infecção, corroborando estudo anterior que não observou alteração na quantificação da carga viral plasmática do HIV-1 em relação aos polimorfismos do gene *FASL* (Nasi *et al.*, 2005).

Baseado nos resultados obtidos sugere-se que os polimorfismos analisados, em particular o -670 do gene *FAS*, influenciem na apoptose dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no curso da infecção pelo HIV-1, assim, faz-se necessário estudos posteriores visando confirmar ou não esta associação, uma vez que a identificação desse polimorfismo pode ser, no futuro, uma importante ferramenta a ser utilizada no acompanhamento da infecção usando, por exemplo, a genotipagem para o polimorfismo -670 *FAS* como o marcador prognóstico da infecção, podendo ser utilizada uma terapia diferenciada para aqueles homocigotos *AA*, os quais, de acordo com o resultado do presente estudo, são mais susceptíveis a apoptose dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>.

## 5 CONCLUSÕES

(i) As análises das distribuições das frequências alélicas e genóticas dos genes *FAS* e *FASL* nas populações estudadas não mostraram diferenças estatisticamente significativas, o que sugere a ausência de associação entre os polimorfismos analisados nestes genes e a suscetibilidade à infecção pelo HIV-1;

(ii) A análise da quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo -670 *FAS* sugere que o estado de portador do alelo G, em homo ou heterozigose, nos indivíduos infectados pelo HIV-1 possa ser um fator de proteção a depleção destas células no curso da infecção pelo HIV-1;

(iii) Os resultados da análise das quantificações dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação aos polimorfismos -124 e -169 do gene *FASL* são muito prematuros para se fazer qualquer tipo de inferência acerca da influência destes polimorfismos na infecção pelo HIV-1;

(iv) A análise da quantificação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os portadores dos diferentes genótipos para os três polimorfismos analisados no presente estudo não revelou associação significativa, portanto não há evidências de que estes polimorfismos influenciem na contagem destas células nos indivíduos infectados pelo HIV-1;

(v) A análise das médias na quantificação da carga viral plasmática nos indivíduos infectados pelo HIV-1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação às variantes genotípicas para os três polimorfismos estudados, sugerindo que estes polimorfismos não influenciem na viremia destes indivíduos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASA-CHAPMAN, M.M., HAYMAN, A., NEWTON, P., CORNFORTH, D., WILLIAMS, I., BORROW, P., BALFE, P., MCKNIGHT, A. Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. **AIDS**, **18**: 71-81, 2004.
- ALCAMÍ, J. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, **22**: 486-496, 2004.
- ALDERSON, M.R., TOUGH, T.W., DAVIS-SMITH, T., BRADDY, S., FALK, B., SCHOOLEY, K.A., GOODWIN, R.G., SMITH, C.A., RAMSDELL, F., LYNCH, D.H. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, **181**: 71-77, 1995.
- ALIMONTI, J.B., BALL, T.B., FOWKE, K.R. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **The Journal of General Virology**, **84**: 1649-1661, 2003.
- ALNEMRI, E.S., LIVINGSTON, D.J., NICHOLSON, D.W., SALVESEN, G., THORNBERRY, N.A., WONG, W.W., YUAN, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell**, **87**: 171, 1996.
- ANAZETTI, M.C. & MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, **1**: 37-58, 2007.
- AMEISEN, J.C. Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer. **AIDS**, **8**: 1197-1213, 1994.
- AMEISEN, J.C. & CAPRON, A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. **Immunology Today**, **12**: 102-105, 1991.

- AQUARO, S., CALIO, R., BALZARINI, J., BELLOCCHI, M.C., GARACI, E., PERNO, C.F. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. **Antiviral Research**, **55**: 209-225, 2002.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, **281**: 1305–1308, 1998.
- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq**, 2007.
- BARRÉ-SINOUSSE, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VÉZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W., ONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, **220**: 868-871, 1983.
- BADLEY, A.D., DOCKRELL, D.H., ALGECIRAS, A., ZIESMER, S., LANDAY, A., LEDERMAN, M.M., CONNICK, E., KESSLER, H., KURITZKES, D., LYNCH, D.H., ROCHE, P., YAGITA, H., PAYA, C.V. In vivo analysis of Fas/FasL interactions in HIV-infected patients. **The Journal of Clinical Investigation**, **102**: 79-87, 1998.
- BADLEY, A.D., DOCKRELL, D., SIMPSON, M., SCHUT, R., LYNCH, D.H., LEIBSON, P., PAYA, C.V. Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. **The Journal of Experimental Medicine**, **185**: 55-64, 1997.
- BADLEY, A.D., MCELHINNY, J.A., LEIBSON, P.J., LYNCH, D.H., ALDERSON, M.R., PAYA, C.V. Upregulation of Fas ligand expression by human

- immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. **Journal of Virology**, **70**: 199-206, 1996.
- BADLEY, A.D., PILON, A.A., LANDAY, A., LYNCH, D.H. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. **Blood**, **96**: 2951-2964, 2000.
- BANGHAM, C.R. **CTL quality and the control of human retroviral infections.** European Journal of Immunology, 39: **1700-1712**, **2009**.
- BAUER, P.G., BARTH, O.M. & PEREIRA, M.S. Endocytosis of the human immunodeficiency virus in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **82**: 449-450, 1987.
- BENTWICH, Z., KALINKOVICH, A., WEISMAN, Z., GROSSMAN, Z. Immune activation in the context of HIV infection. **Clinical and Experimental Immunology**, **111**: 1-2, 1998.
- BENTWICH, Z., MAARTENS, G., TORTEN, D., LAL, A.A., LAL, R.B. Concurrent infections and HIV pathogenesis. **AIDS**, **14**: 2071-2081, 2000.
- BERGER, E.A. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. **AIDS**, **11**: 3-16, 1997.
- BEHRMANN, I., WALCZAK, H., KRAMMER, P.H. Structure of the human APO-1 gene. **European Journal of Immunology**, **24**: 3057-3062, 1994.
- BioAgency Biotecnologia Ltda.** Disponível em <[http://www.bioagency.com.br/catalogos/09\\_apoptose\\_2004.pdf](http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose_2004.pdf)> Acesso em 09/02/2008.
- BLUE, C.E., SPILLER, O.B., BLACKBOURN, D.J. The relevance of complement to virus biology. **Virology**, **319**: 176-184, 2004.
- BOBKOV, A.F., KAKENNOVA, E.V., SUKHANOVA, A.L., BOBKOVA, M.R., POKROVSKY, V.V., ZEMAN, V.V., KOVTUNENKO, N.G., ERASILOVA, I.B. An

- HIV type 1 subtype A outbreak among injecting drug users in Kazakhstan. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **20**: 1134-1136, 2004.
- BÖHLER, T., BÄUMLER, C., HERR, I., GROLL, A., KURZ, M., DEBATIN, K.M. Activation of the CD95 system increases with disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, **16**: 754-759, 1997.
- BOISE, L.H., MINN, A.J., THOMPSON, C.B. Receptors that regulate T-cell susceptibility to apoptotic cell death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **766**: 70-80, 1995.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - AIDS E DST**. Ministério da Saúde. Ano IV, nº 1 - 27<sup>a</sup> à 52<sup>a</sup> semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2006; 01<sup>a</sup> à 26<sup>a</sup> semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2007, dezembro 2007.
- BOLSTAD, A.I., WARGELIUS, A., NAKKEN, B., HAGA, H.J., JONSSON, R. Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. **The Journal of Rheumatology**, **27**: 2397-2405, 2000.
- BONNAL, S., MARTÍNEZ, C., FÖRCH, P., BACHI, A., WILM, M., VALCÁRCEL, J. RBM5/Luca-15/H37 regulates Fas alternative splice site pairing after exon definition. **Molecular Cell**, **10**: 81-95, 2008.
- BORROW, P., LEWICKI, H., WEI, X., HORWITZ, M.S., PEFFER, N., MEYERS, H., NELSON, J.A., GAIRIN, J.E., HAHN, B.H., OLDSTONE, M.B., SHAW, G.M. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. **Nature Medicine**, **3**: 205-211, 1997.



- BRODIE, S.J., LEWINSOHN, D.A., PATTERSON, B.K., JIYAMAPA, D., KRIEGER, J., COREY, L., GREENBERG, P.D. & RIDDELL, S.R. *In vivo* migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. **Nature Medicine**, **5**: 34-41, 1999.
- BRYSON, Y.J. Perinatal HIV-1 transmission: recent advances and therapeutic interventions. **AIDS**, **10**: S33-42, 1996.
- BUDIHARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X., WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, **15**: 269-290, 1999.
- BURTON, D.R., DESROSIERS, R.C., DOMS, R.W., KOFF, W.C., KWONG, P.D., MOORE, J.P., NABEL, G.J., SODROSKI, J., WILSON, I.A., WYATT, R.T. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. **Nature Immunology**, **5**: 233-236, 2004.
- CAO, Y., QIN, L., ZHANG, L., SAFRIT, J., HO, D.D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. **The New England Journal of Medicine**, **332**: 201-208, 1995.
- CARNE, C.A., TEDDER, R.S., SMITH, A., SUTHERLAND, S., ELKINGTON, S.G., DALY, H.M., PRESTON, F.E., CRASKE, J. Acute encephalopathy coincident with seroconversion for anti-HTLV-III. **Lancet**, **2**: 1206-1208, 1985.
- CASCINO, I., BALLERINI, C., AUDINO, S., ROMBOLÀ, G., MASSACESI, L., COLOMBO, G., SCORZA SMERALDI, R., D'ALFONSO, S., MOMIGLIANO RICHIARDI, P., TOSI, R., RUBERTI, G. Fas gene polymorphisms are not associated with systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis and HIV infection. **Disease Markers**, **13**: 221-225, 1998.

CASCINO, I., PAPOFF, G., ERAMO, A., RUBERTI, G. Soluble Fas/Apo-1 splicing variants and apoptosis. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, **1**: 12-18, 1996.

CASPER, C.H., CLEVESTIG, P., CARLENOR, E., LEITNER, T., ANZÉN, B., LIDMAN, K., BELFRAGE, E., ALBERT, J., BOHLIN, A.B., NAVÉR, L., LINDGREN, S., FENYÖ, E.M., EHRNST, A.C. Link between the X4 phenotype in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers and their children, despite the early presence of R5 in the child. **The Journal of Infectious Disease**, **186**: 914-921, 2002.

**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. Dezembro, 1992.

**CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC**. HIV and it's Transmission, July 1999.

CHAISSON, R.E., STERLING, T.R., GALLANT, J.E. General clinical manifestations of Human immunodeficiency virus infection (Including oral, cutaneous, renal, ocular and cardiac diseases). In: **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Douglas, R.G. (eds) Florida, USA: Churchill Livingstone, Inc, 2000. p. 1398-1415.

CHAN, D.C. & KIM, P.S. HIV entry and its inhibition. **Cell**, **93**: 681-684, 1998.

**Chemistry at Wellesley College**. Disponível em <<http://www.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/hiv/t-hiv.GIF>> Acesso em: 19/01/2008.

CHAVES, M.M. & KALLAS, E.G. Cell cycle distribution of CD4+ lymphocytes in HIV-1-infected subjects. **Cytometry**, **62**: 46-51, 2004.

- CHEN, J.Y., WANG, C.M., MA, C.C., CHOW, Y.H., LUO, S.F. The -844C/T polymorphism in the Fas ligand promoter associates with Taiwanese SLE. **Genes and Immunity, 6:** 123-128, 2005.
- CHICHEPORTICHE, Y., BOURDON, P.R., XU, H., HSU, Y.M., SCOTT, H., HESSION, C., GARCIA, I., BROWNING, J.L. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry, 272:** 32401–32410, 1997.
- CHINNAIYAN, A.M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. **Neoplasia,1:** 5–15, 1999.
- CHOWDHURY, I., THARAKAN, B., BHAT, G.K. Caspases – an update. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, 151:** 10-27, 2008.
- CLAPHAM, P.R. HIV and chemokines: ligands sharing cell-surface receptors. **Trends in Cell Biology, 7:** 264-268, 1997.
- CLAVEL, F., GUYADER, M., GUETARD, D., SALLE, M., MONTAGNIER, L., ALIZON, M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. **Nature, 324:** 691-695, 1986.
- COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J.A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., TEMIN, H., TOYOSHIMA, K., VARMUS, H., VOGT, P., WEISS, R.A. What to call the AIDS virus? **Nature, 321:** 10-10, 1986.
- COFFIN, J.M. Genetic diversity and evolution of retrovirus. In: **Levy, J.A. The Retroviridae.** New York , Plenum Press, p. 19-45, 1993.

- COHEN, E.A., SUBBRAMANIAN, R.A. & GÖTTLINGER, H.G. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **214**: 219-235, 1996.
- COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **The Biochemical Journal**, **326**: 1-16, 1997.
- CONNOR, R.I., MOHRI, H., CAO, Y., HO, D.D. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. **Journal of Virology**, **67**: 1772-1777, 1993.
- CONNOR, R.I., SHERIDAN, K.E., CERADINI, D., CHOE, S., LANDAU, N.R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. **The Journal of Experimental Medicine**, **185**: 621-628, 1997.
- COOPER, D.A., GOLD, J., MACLEAN, P., DONOVAN, B., FINLAYSON, R., BARNES, T.G., MICHELMORE, H.M., BROOKE, P., PENNY, R. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. **Lancet**, **1(8428)**: 537-540, 1985.
- COSSARIZZA, A. Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes. **Current Pharmaceutical Design**, **14**: 237-244, 2008.
- COSSARIZA, A., STENT, G., MUSSINI, C., PAGANELLI, R., BORGHI, V., NUZZO, C., PINTI, M., PEDRAZZI, J., BENATTI, F., ESPOSITO, R., RØSOK, B., NAGATA, S., VELLA, S., FRANCESCHI, C., DE RIENZO, B. Deregulation of the CD95/CD95L system in lymphocytes from patients with primary acute HIV infection. **AIDS**, **14**: 345-355, 2000.

- CREW, K.D., GAMMON, M.D., TERRY, M.B., ZHANG, F.F., AGRAWAL, M., ENG, S.M., SAGIV, S.K., TEITELBAUM, S.L., NEUGUT, A.I., SANTELLA, R.M. Genetic polymorphisms in the apoptosis-associated genes FAS and FASL and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, **28**: 2548-51, 2007.
- CULLEN, B.R. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. **Microbiological Reviews**, **56**: 375-394, 1992.
- DABIS, F., NEWELL, M.L., FRANSEN, L., SABA, J., LEPAJE, P., LEROY, V. Prevention of mother-to-child transmission of HIV in developing countries: recommendations for practice. **Health Policy Planning**, **15**: 34-42, 2000.
- DEBATIN, K., FAHRIG-FAISSNER, A., ENENKEL-STOODT, S., KREUZ, W., BENNER, A., KRAMMER, P. High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus infected children. **Blood**, **83**: 3101–3103, 1994.
- DEL-REY, M., RUIZ-CONTRERAS, J., BOSQUE, A., CALLEJA, S., GOMEZ-RIAL, J., ROLDAN, E., MORALES, P., SERRANO, A., ANEL, A., PAZ-ARTAL, E., ALLENDE, L.M. A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. **Blood**, **108**: 1306-1312, 2006.
- DELWART, E.L., MULLINS, J.I., GUPTA, P., JR, L.G.H., HOLODNIY, M., KATZENSTEIN, D., WALKER, B.D., SINGH, M.K. Human immunodeficiency virus type 1 in blood and semen. **Journal of Virology**, **72**: 617-23, 2000.
- DENNING, D.W., ANDERSON, J., RUDGE, P., SMITH, H. Acute myelopathy associated with primary infection with human immunodeficiency virus. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, **294**: 143-144, 1987.
- DIGIUSEPPE, J.A., LEBEAU, P., AUGENBRAUN, J., BOROWITZ, M.J. Multiparameter flow-cytometric analysis of bcl-2 and Fas expression in normal and

- neoplastic hematopoiesis. **American Journal of Clinical Pathology**, **106**: 345-351, 1996.
- DOCKRELL, D.H., BADLEY, A.D., VILLACIAN, J.S., HEPPELMANN, C.J., ALGECIRAS, A., ZIESMER, S., YAGITA, H., LYNCH, D.H., ROCHE, P.C., LEIBSON, P.J., PAYA, C.V. The expression of Fas Ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. **The Journal of Clinical Investigation**, **101**: 2394-2405, 1998.
- EIKEN, H.G., ODLAND, E., BOMAN, H., SKJELKVÅLE, L., ENGEBRETSEN, L.F., APOLD, J. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. **Nucleic Acids Research**, **19**: 1427-1430, 1991.
- ELDER, G., DALAKAS, M., PEZESHKPOUR, G., SEVER, J. Ataxic neuropathy due to ganglioneuronitis after probable acute human immunodeficiency virus infection. **Lancet**, **2**: 1275-1276, 1986.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, **35**: 495-516, 2007.
- EMBRETSON, J., ZUPANCIC, M., RIBAS, J.L., BURKE, A., RACZ, P., TENNER-RACZ, K., HAASE, A.T. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. **Nature**, **362**: 359-362, 1993.
- ESTAQUIER, J., TANAKA, M., SUDA, T., NAGATA, S., GOLSTEIN, P., AMEISEN, J.C. Fas-mediated apoptosis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: Differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. **Blood**, **87**: 4959-4966, 1996.

- FAHEY, J.L. Cytokines, plasma immune activation markers, and clinically relevant surrogate markers in human immunodeficiency virus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **5**: 597-603, 1998.
- FAN, T.J., HAN, L.H., CONG, R.S., LIANG, J. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, **37**: 719-727, 2005.
- FARRE, L., BITTENCOURT, A.L., SILVA-SANTOS, G., ALMEIDA, A., SILVA, A.C., DECANINE, D., SOARES, G.M., ALCANTARA, L.C. JR, VAN DOOREN, S., GALVÃO-CASTRO, B., VANDAMME, A.M., VAN WEYENBERGH, J. Fas 670 promoter polymorphism is associated to susceptibility, clinical presentation, and survival in adult T cell leukemia. **Journal of Leukocyte Biology**, **83**: 220-222, 2008.
- FAUCI, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. **Nature**, **384**: 529-534, 1996.
- FEIG, C., TCHIKOV, V., SCHÜTZE, S., PETER, M.E. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. **The EMBO Journal**, **26**: 221-231, 2007.
- FERGUSON, T.A. & GRIFFITH, T.S. A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. **Immunological Reviews**, **213**: 228-238, 2006.
- FEUK, L., PRINCE, J.A., BREEN, G., EMAHAZION, T., CAROTHERS, A., ST CLAIR, D., BROOKES, A.J. Apolipoprotein-E dependent role for the FAS receptor in early onset Alzheimer's disease: finding of a positive association for a polymorphism in the TNFRSF6 gene. **Human Genetics**, **107**: 391-396, 2000.
- FRANKEL, A.D. & YOUNG, J.A.T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, **67**:1-25,1998.

- FULLER, G.N., JACOBS, J.M., GUILOFF, R.J. Nature and incidence of peripheral nerve syndromes in HIV infection. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, **56**: 372-381, 1993.
- FUSADE, T., LIONY, C., JOLY, P., PAOLETTI, C., METAYER, J., LAURET, P. Ulcerative esophagitis during primary HIV infection. **The American Journal of Gastroenterology**, **87**: 1523-1524, 1992.
- GALLO, R. C., SALAHUDDIN, S. Z., POPOVIC, M., SHEARER, G. M., KAPLAN, M., HAYNES, B. F., PALKER, T. J., REDFIELD, R., OLESKE, J., SAFAI, B., WHITE, G., FOSTER, P., MARKHAM, P. D. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, **224**: 500-503, 1984.
- GALVÃO, M.T.G, CERQUEIRA, A .T., MARCONDES-MACHADO, J. Medidas contraceptivas e de proteção da transmissão do HIV por mulheres com HIV/AIDS. **Revista de Saúde Pública**, **138**: 194-200, 2004.
- GELEZIUNAS, R., XU, W., TAKEDA, K., ICHIJO, H., GREENE, W.C. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. **Nature**, **410**: 834-838, 2001.
- GONÇALVES, K.I., SOUZA, E.M., MODESTO, L.S., FONSECA, A.F. ALCÂNTARA, K.C. Soroprevalência de HIV-1/2 entre doadores de sangue de Goiânia-Goiás. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **38**: 263-266, 2006.
- GOUGEON, M. L. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. **Nature Reviews Immunology**, **3**: 392-404, 2003.
- GOUGEON, M.L. & MONTAGNIER, L. Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active



- anti-retroviral therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **887**: 199-212, 1999.
- GOULDER, P.J., BRANDER, C., TANG, Y., TREMBLAY, C., COLBERT, R.A., ADDO, M.M., ROSENBERG, E.S., NGUYEN, T., ALLEN, R., TROCHA, A., ALTFELD, M., HE, S., BUNCE, M., FUNKHOUSER, R., PELTON, S.I., BURCHETT, S.K., MCINTOSH, K., KORBER, B.T., WALKER, B.D. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. **Nature**, **412**: 334-338, 2001.
- GRAZIOSI, C., SOUDEYNS, H., RIZZARDI, G.P., BART, P.A., CHAPUIS, A., PANTALEO, G. Immunopathogenesis of HIV infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **14**: 135-142, 1998.
- GREEN, D.R. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. **Immunological Reviews**, **193**: 5-9, 2003.
- GREEN, D.R. & FERGUSON, T.A. The role of Fas ligand in immune privilege. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, **2**: 917-924, 2001.
- GREENE, W.C. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine**, **324**: 308-317, 1991.
- GREGORY, C.D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. **Current Opinion in Immunology**; **12**: 27-34, 2000.
- GRIMM, S., STANGER, B.Z., LEDER, P. RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **93**: 10923-10927, 1996.

- GROSS, A., McDONNELL, J.M., KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, **13**: 1899-1911, 1999.
- GÜRTLER, L.G., HAUSER, P.H., EBERLE, J., BRUNN, A VON, KNAPP, S., ZEKENG, L., TSAGUE, J.M., KAPTUE, L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. **Journal of Virology**, **68**: 1581-1585, 1994.
- HAGBERG, L., MALMVALL, B.E., SVENNERHOLM, L., ALESTIG, K., NORKRANS, G. Guillain-Barré syndrome as an early manifestation of HIV central nervous system infection. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, **18**: 591-592, 1986.
- HAHN, B.H., SHAW G.M., DE COCK, K.M., SHARP, P.M. AIDS as zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, **287**: 607-614, 2000.
- HALE, A.J., SMITH, C.A., SUTHERLAND, L.C., STONEMAN, V.E., LONGTHORNE, V., CULHANE, A.C., WILLIAMS, G.T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **European Journal of Biochemistry**, **236**: 1-26, 1996.
- HANGARTNER, L., ZELLWEGER, R.M., GIOBBI, M., WEBER, J., ESCHLI, B., MCCOY, K.D., HARRIS, N., RECHER, M., ZINKERNAGEL, R.M., HENGARTNER, H. Nonneutralizing antibodies binding to the surface glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus reduce early virus spread. **The Journal of Experimental Medicine**, **203**: 2033-2042, 2006.
- HASELTINE, W.A. & WONG-STAAAL, F. The molecular biology of the AIDS virus. **Scientific American**, **259**: 52-62, 1988.
- HAZENBERG, M.D., COHEN STUART, J.W., OTTO, S.A., BORLEFFS, J.C., BOUCHER, C.A., DE BOER, R.J., MIEDEMA, F., HAMANN, D. T-cell division in

- HIV- 1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). **Blood**, **95**: 249-255, 2000.
- HILL, M.C. & LUNEC, J. The TNF-ligand and receptor superfamilies: controllers of immunity and the Trojan Horses of autoimmune disease? **Molecular Aspects of Medicine**, **17**: 455-509, 1996.
- HILL, M.M., ADRAIN, C., DURIEZ, P.J., CREAGH, E.M., MARTIN, S.J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. **The EMBO Journal**, **23**: 2134–2145, 2004.
- HO, D.D., NEUMANN, A.U., PERELSON, A.S., CHEN, W., LEONARD, J.M., MARKOWITZ, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, **373**: 123-126, 1995.
- HO, D.D., SARNGADHARAN, M.G., RESNICK, L., DIMARZOVERONESE, F., ROTA, T.R., HIRSCH, M.S. Primary human T-lymphotropic virus type III infection. **Annals of Internal Medicine**, **103**: 880-883, 1985.
- HORIUCHI, T., NISHIZAWA, S.Y., HIGUCHI, M., TUSKAMOTO, H., HAYASHI, K., NAGASAWA, K. Association of Fas/Apo-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese. **Rheumatology**, **38**: 516-520, 1999.
- HSU, H., XIONG, J., GOEDDEL, D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF kappa B activation. **Cell**, **81**: 495–504, 1995.
- HUANG, Q.R., DANIS, V., LASSERE, M., EDMONDS, J., MANOLIOS, N. Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology (Oxford, England)**, **38**: 645-651, 1999.

- HUANG, Q.R. & MANOLIOS, N. Investigation of the -1377 polymorphism on the Apo-1/Fas promoter in systemic lupus erythematosus patients using allele-specific amplification. **Pathology**, **32**: 126-130, 2000.
- HUANG, Q.R., MORRIS, D., MANOLIOS, N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. **Molecular Immunology**, **34**: 577-582, 1997.
- HUANG, Q.R., TEUTSCH, S.M., BUHLER, M.M., BENNETTS, B.H., HEARD, R.N., MANOLIOS, N., STEWART, G.J. Evaluation of the apo-1/Fas promoter mva I polymorphism in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, **6**: 14-18, 2000.
- HUBER, M. & TRKOLA, A. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. **Journal of Internal Medicine**, **262**: 5-25, 2007.
- HUGHES, D.P.M. & CRISPE, I.N. A Naturally Occurring Soluble Isoform of Murine Fas Generated by Alternative Splicing. **Journal of Experimental Medicine**, **182**: 1395-1401, 1995.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTVdB - The Universal Virus Database, 2006.** Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>>. Acesso em 09/04/2008.
- INAZAWA, J., ITOH, N., ABE, T., NAGATA, S. Assignment of the Fas antigen gene (FAS) to 10q.24.1. **Genomics**, **14**: 821-822, 1992.
- ITOH, N.; YONEHARA, S.; ISHII, A.; YONEHARA, M.; MIZUSHIMA, S.; SAMESHIMA, M.; HASE, A.; SETO, Y.; NAGATA, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell**, **66**: 233-243, 1991.

- JACOCOT, E., RAVAGNAN, L., LOEFFLER, M., FERRI, K.F., VIEIRA, H.L., ZAMZAMI, N., COSTANTINI, P., DRUILLENNEC, S., HOEBEKE, J., BRIAND, J.P., IRINOPOULOU, T., DAUGAS, E., SUSIN, S.A., COINTE, D., XIE, Z.H., REED, J.C., ROQUES, B.P., KROEMER, G. The HIV-1 protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. **The Journal of Experimental Medicine**, **191**: 33-46, 2000.
- JIANG, S., LIN, K., ZHANG, L. & DEBNATH, A.K. A screening assay for antiviral compounds targeted to the HIV-1 gp41 core structure using a conformation-specific monoclonal antibody. **Journal of Virological Methods**, **80**: 85-96, 1999.
- JOHNSON, R.P. & WALKER, B.D. Cytotoxic T lymphocytes in human immunodeficiency virus infection: responses to structural proteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **189**: 35-63, 1994.
- KANG, S., DONG, S.M., SEO, S.S., KIM, J.W., PARK, S.Y. FAS -1377 G/A polymorphism and the risk of lymph node metastasis in cervical cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, **180**: 1-5, 2008.
- KAPLAN, A.H., MANCHESTER, M. & SWANSTROM, R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. **Journal of Virology**, **68**: 6782-6786, 1994.
- KASHUBA, A.D.M., DYER, J.R., KRAMER, L.M., RAASCH, R.H., ERON, J.J., COHEN, M.S. Antiretroviral-drug concentrations in semen: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43**: 1817-1826, 1999.

- KATSIKIS, P.D., WUNDERLICH, E.S., SMITH, C.A., HERZENBERG, L.A., HERZENBERG, L.A. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. **Journal of Experimental Medicine**, **181**: 2029-2036, 1995.
- KATZ, R.A. & SKALKA, A.M. The retroviral enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, **63**: 133-173, 1994.
- KAYAGAKI, N., KAWASAKI, A., EBATA, T., OHMOTO, H., IKEDA, S., INOUE, S., YOSHINO, K., OKUMURA, K., YAGITA, H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. **The Journal of Experimental Medicine**, **182**: 1777-1783, 1995.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, **26**: 239-257, 1972.
- KISCHKEL, F.C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P.H., PETER, M.E. Cytotoxicity dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO Journal**, **14**: 5579-5588, 1995.
- KLATZMANN, D., CHAMPAGNE, E., CJAMARET, S. GRUEST, J., GUETARD, D., HERCEND, T., GLUCKMAN, J.D. & MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. **Nature**, **312**: 767-768, 1984.
- KOHL, S., STRYNADKA, N.C., HODGES, R.S., PEREIRA, L. Analysis of the role of antibody-dependent cellular cytotoxic antibody activity in murine neonatal herpes simplex virus infection with antibodies to synthetic peptides of glycoprotein D and

- monoclonal antibodies to glycoprotein B. **The Journal of Clinical Investigation**, **86**: 273–8, 1990.
- KOSHKINA, N.V., KLEINERMAN, E.S., LI, G., ZHAO, C.C., WEI, Q., STURGIS, E.M. Exploratory analysis of Fas gene polymorphisms in pediatric osteosarcoma patients. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, **29**: 815-21, 2007.
- KOWALSKI, M., POTZ, J., BASIRIPOUR, L., DORFMAN, T., GOH, W.C., TERWILLIGER, E., DAYTON, A., ROSEN, C., HASELTINE, W. & SODROSKI, J. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. **Science**, **237**: 1351-1355, 1987.
- KRAUSSLICH, H.G., FACKE, M., HEUSER, A.M., KONVALINKA, J., & ZENTGRAF, H. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. **Journal of Virology**, **69**: 3407–3419, 1995.
- KRUEGER, A., FAS, S.C., BAUMANN, S., KRAMMER, P.H. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. **Immunological Reviews**, **193**: 58-69, 2003.
- KUROSAKA, K., TAKAHASHI, M., WATANABE, N., KOBAYASHI, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **Journal of Immunology**, **171**: 4672–4679, 2003.
- KURTZBERG J, FRIEDMAN HS, KINNEY TR, CHAFFEE S, STINE K, FALLETTA JM, WEINHOLD KJ. Management of human immunodeficiency virus-associated thrombocytopenia with intravenous gamma globulin. **The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, **9**: 299-301, 1987.

- KUWANA, T., MACKEY, M.R., PERKINS, G., ELLISMAN, M.H., LATTERICH, M., SCHNEITER, R., GREEN, D.R., NEWMAYER, D.D. BID, BAX, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. **Cell**, **111**: 331-342, 2002.
- KWONG, P.D., DOYLE, M.L., CASPER, D.J., CICALA, C., LEAVITT, S.A., MAJEED, S., STEENBEKE, T.D., VENTURI, M., CHAIKEN, I., FUNG, M., KATINGER, H., PARREN, P.W., ROBINSON, J., VAN RYK, D., WANG, L., BURTON, D.R., FREIRE, E., WYATT, R., SODROSKI, J., HENDRICKSON, W.A., ARTHOS, J. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. **Nature**, **420**: 678-682, 2002.
- LASKY, L.A., NAKAMURA, G., SMITH, D.H., FENNIE, C., SHIMASAKI, C., PATZER, E., BERMAN, P., GREGORY, T. & CAPON, D.J. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. **Cell**, **50**: 975-985, 1987.
- LAUNAY, S., HERMINE, O., FONTENAY, M., KROEMER, G., SOLARY, E., GARRIDO, C. Vital functions for lethal caspases. **Oncogene**, **24**: 5137-5148, 2005.
- LEITHAUSER, F., DHEIN, J., MECHTERSHEIMER, G., KORETZ, K., BRUDERLEIN, S., HENNE, C., SCHMIDT, A., DEBATIN, K. M., KRAMMER, P. H., MOLLER, P. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. **Laboratory Investigation**, **69**: 415-429, 1993.
- LEVY, J.A., HOFFMAN, A.D., KRAMER, S.M., LANDIS, J.A., SHIMABUKURO, J.M., OSHIRO, L.S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, **225**: 840-842, 1984.



- LIEBERMAN, J., SHANKAR, P., MANJUNATH, N., ANDERSSON, J. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. **Blood**, **98**: 1667-1677, 2001.
- LIFSON, J.D., FEINBERG, M.R., REYES, G.R., RABIN, L., BASIRIPOUR, B., CHAKBARTI, S., MOSS, B., WONG-STAAAL, F., STEIMER, K.S. & ENGLEMAN, E.G. Induction of CD4-dependent cell fusion by HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. **Nature**, **323**: 725-728, 1986.
- LIMA, L., MORAIS, A., LOBO, F., CALAIS-DA-SILVA, F.M., CALAIS-DA-SILVA, F.E., MEDEIROS, R. Association between FAS polymorphism and prostate cancer development. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, **11**: 94-98, 2008.
- LIMA, R.G., VAN WEYENBERGH, J., SARAIVA, E.M., BARRAL-NETTO, M., GALVAO-CASTRO, B., BOU-HABIB, D.C. The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. **The Journal Infectious Disease**, **185**: 1561-1566, 2002.
- LOCKSLEY, R.M., KILLEEN, N., LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, **104**: 487-501, 2001.
- LOGVINOFF, C., MAJOR, M.E., OLDACH, D., HEYWARD, S., TALAL, A., BALFE, P., FEINSTONE, S.M., ALTER, H., RICE, C.M., MCKEATING, J.A. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101**: 10149-10154, 2004.
- LIU, S.L., SCHACKER, T., MUSEY, L., SHRINER, D., MCELRATH, M.J., COREY, L., MULLINS, J.I. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the

same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses.

**Journal of Virology**, **71**: 4284 – 4295, 1997.

LU, M. & KIM, P.S. A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, **15**: 465-471, 1997.

MACHADO, A.C., COSTA, J.C., GIR, E., MORIYA, T.M., FIGUEREDO, J.F.C. Risco de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em profissionais de saúde. **Revista de Saúde Pública**, **26**: 54-56, 1992.

MARIANI, S.M., MATIBA, B., BAUMLER, C., KRAMMER, P.H. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. **European Journal of Immunology**, **25**: 2303-2307, 1995.

MASCOLA, J.R., STIEGLER, G., VANCOTT, T.C., KATINGER, H., CARPENTER, C.B., HANSON, C.E., BEARY, H., HAYES, D., FRANKEL, S.S., BIRX, D.L., LEWIS, M.G. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. **Nature Medicine**, **6**: 207-210, 2000.

McCLOSKEY, T.W., OYAIZU, N., KAPLAN, M., PAHWA, S. Expression of the Fas antigen in patients infected with human immunodeficiency virus. **Citometry**, **22**: 111-114, 1995.

McCUNE, J.M. The dynamics of CD4+ T cell depletion in HIV disease. **Nature**, **410**: 974-979, 2001.

MCMICHAEL, A.J. & ROWLAND-JONES, S.L. Cellular immune responses to HIV. **Nature**, **410**: 980-987, 2001.

- MILLER, M.D., FARNET, C.M. & BUSHMAN, F.D. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. **Journal Virology**, **71**: 5382-5390, 1997.
- MORGAN, D. The cell cycle and programmed cell death. In: **Molecular Biology of the Cell**. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Roff, M., Roberts, K. Walter, P. (eds) New York: Garland Science Publishing, 2002. p. 1007-1008.
- MUELLER, Y.M., DE ROSA, S.C., HUTTON, J.A., WITEK, J., ROEDERER, M., ALTMAN, J.D., KATSIKIS, P.D. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells. **Immunity**, **15**: 871-882, 2001.
- MURO-CACHO, C.A., PANTALEO, G., FAUCI, A.S. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. **Journal of Immunology**, **154**: 5555-5566, 1999.
- NABEL, G.J. & SULLIVAN, J. Antibodies and resistance to natural HIV infection. **New England Journal of Medicine**, **343**: 17-19, 2000.
- NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, **88**: 355-365, 1997.
- NAGATA, S. Fas ligand-induced apoptosis. **Annual Reviews of Genetics**, **33**: 29-55, 1999.
- NAGATA, S., & GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, **267**: 1449-1456, 1995.
- NASI, M., PINTI, M., BUGARINI, R., TROIANO, L., LUGLI, E., BELLODI, C., MUSSINI, C., BORGHI, V., TRENTI, T., BALLI, F., ESPOSITO, R., COSSARIZZA, A. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and Fas ligand (CD178) influence the rise in CD4+ T cell count after antiretroviral therapy in drug-naïve HIV-positive patients. **Immunogenetics**, **57**: 628-635, 2005.

- NAVIA, B.A., CHO, E.S., PETITO, C.K., PRICE, R.W. The AIDS dementia complex: II. Neuropathology. **Annals of Neurology**, **19**: 525-535, 1986.
- NAVIA, B.A., JORDAN, B.D., PRICE, R.W. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. **Annals of Neurology**, **19**: 517-524, 1986.
- NCBI Reference Sequence**. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>> Acesso em 10/03/2009.
- NICHOLSON, D.W. & THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, **22**: 299-306, 1997.
- NIINO, M., KIKUCHI, S., FUKAZAWA, T., MIYAGISHI, R., YABE, I., TASHIRO, K. An examination of the Apo-1/Fas promoter Mva I polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. **BMC Neurology**, **21**: 2-8, 2002.
- NIU, M.T., STEIN, D.S., SCHNITTMAN, S.M. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. **The Journal of Infectious Diseases**, **168**: 1490-1501, 1993.
- NUNEZ, G., BENEDICT, M.A., HU, Y., INOHARA, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene**, **17**: 3237-3245, 1998.
- OEHM, A., BEHRMANN, I., FALK, W., PAWLITA, M., MAIER, G., KLAS, C., LIWEBER, M., RICHARDS, S., DHEIN, J., TRAUTH, B.C., PONSTINGL, H., KRAMMER, P.H. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. **The Journal of Biological Chemistry**, **267**: 10709-10715, 1992.

- ORLLOF, S.L., SIMONDS, R.J., STEKETEE, R.W., LOUIS, M.E. Determinants of perinatal hiv-1 transmission. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, **39**: 386-395, 1996.
- 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. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **28**: 184-190, 2002.
- OYAIZU, N., MCCLOSKEY, T.W., THAN, S., HU, R., PAHWA, S. Mechanisms of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of HIV infected patients. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **374**: 101-114, 1995.
- PANTALEO, G. & FAUCI, A.S. Immunopathogenesis of HIV infection. **Annual Review of Microbiology**, **50**: 825 – 854, 1996.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., DEMAREST, J.F., BUTINI, L., MONTRONI, M., FOX, C.H., ORENSTEIN, J.M., KOTLER, D.P., FAUCI, A.S. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. **Nature**, **362**: 355-358, 1993.
- PAO, D., FISHER, M., HUÉ, S., DEAN, G., MURPHY, G., CANE, P.A., SABIN, C.A., PILLAY, D. Transmission of HIV-1 during primary infection: relationship to sexual risk and sexually transmitted infections. **AIDS**, **19**: 85-90, 2005.
- PARANJAPE, R.S. Immunopathogenesis of HIV infection. **The Indian Journal of Medical Research**, **121**: 240-255, 2005.

- PARREN, P.W., MOORE, J.P., BURTON, D.R., SATTENTAU, Q.J. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. **AIDS**, **13**: 137–162, 1999.
- PELLEGRIN, I., LEGRAND, E., NEAU, D., BONOT, P., MASQUELIER, B., PELLEGRIN, J.L., RAGNAUD, J.M., BERNARD, N., FLEURY, H.J. Kinetics of appearance of neutralizing antibodies in 12 patients with primary or recent HIV-1 infection and relationship with plasma and cellular viral loads. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association**, **11**: 438-447, 1996.
- PETER, M.E. & KRAMMER, P.H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis. **Current Opinion in Immunology**, **10**: 545–551, 1998.
- PETROVAS, C., MUELLER, Y.M., KATSIKIS, P.D. HIV-specific CD8+ T cells: serial killers condemned to die? **Current HIV Research**, **2**: 153-162, 2004.
- PETTIT, S.C., MOODY, M.D., WEHBIE, R.S., KAPLAN, A.H., NANTERMET, P.V., KLEIN, C.A., & SWANSTROM, R. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. **Journal of Virology**, **68**: 8017–8027, 1994.
- PHAIR, J., JACOBSON, L., DETELS, R., RINALDO, C., SAAH, A., SCHRAGER, L., MUÑOZ, A. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: the Multicenter AIDS Cohort Study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **5**: 490-496, 1992.
- PHELPS, R., ROBBINS, K., LIBERTI, T., MACHUCA, A., LEPARC, G., CHAMBERLAND, M., KALISH, M., HEWLETT, I., FOLKS, T., LEE, L.M.,

- MCKENNA, M. Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. **Transfusion**, **44**: 929-933, 2004.
- PINTI, M., TROIANO, L., NASI, M., MORETTI, L., MONTERASTELLI, E., MAZZACANI, A., MUSSI, C., VENTURA, P., OLIVIERI, F., FRANCESCHI, C., SALVIOLI, G., COSSARIZZA, A. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and FasL (CD178) in human longevity: studies on centenarians. **Cell Death and Differentiation**, **9**: 431-438, 2002.
- RENEHAN, A.G., BOOTH, C., POTTEN, C.S. What is apoptosis, and why is it important? **BMJ**, **322**: 1536-1538, 2001.
- RICHMAN, D.D., WRIN, T., LITTLE, S.J., PETROPOULOS, C.J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **100**: 4144-4149, 2003.
- RIEUX-LAUCAT, F., LE DEIST, F., HIVROZ, C., ROBERTS, I.A., DEBATIN, K.M., FISCHER, A., DE VILLARTAY, J.P. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. **Science**, **268**: 1347-1349, 1995.
- ROBINSON, H.L., MONTEFIORI, D.C., JOHNSON, R.P., MANSON, K.H., KALISH, M.L., LIFSON, J.D., RIZVI, T.A., LU, S., HU, S.L., MAZZARA, G.P., PANICALI, D.L., HERNDON, J.G., GLICKMAN, R., CANDIDO, M.A., LYDY, S.L., WYAND, M.S., McCLURE, H.M. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. **Nature Medicine**, **5**: 526-534, 1999.
- ROSEN, A. & CASCIOLA-ROSEN, L. Macromolecular substrates for the ICE-like protease during apoptosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, **64**: 50-54, 1997.

- ROSENBERG, E.S., ALTFELD, M., POON, S.H., PHILLIPS, M.N., WILKES, B.M., ELDRIDGE, R.L., ROBBINS, G.K., D'AQUILA, R.T., GOULDER, P.J., WALKER, B.D. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. **Nature**, **407**: 523-526, 2000.
- ROSENBERG, E.S., BILLINGSLEY, J.M., CALIENDO, A.M., BOSWELL, S.L., SAX, P.E., KALAMS, S.A., WALKER, B.D. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science**, **278**: 1447-1450, 1997.
- ROSHAL, M., ZHU, Y., PLANELLES, V. Apoptosis in AIDS. **Apoptosis**, **6**: 103-116, 2001.
- RUIZ-LAIGLESIA, F.J., TORRUBIA-PÉREZ, C.B., PÉREZ-CALVO, J.I. Ulcerative esophagitis during primary HIV infection. **Archives of Internal Medicine**, **156**: 1115-1115, 1996.
- SAESENS, X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G., VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, **23**: 2861–2874, 2004.
- SALLES, N.A., SABINO, E.C., BARRETO, C.C., BARRETO, A.M.E., OTANI, M.M., CHAMONE, D.F. The discarding of blood units and the prevalence of infectious diseases in donors at the Pro-Blood Foundation/Blood Center of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. **Pan American Journal of Public Health**, **13**: 111-116, 2003.
- SALMON, M., PILLING, D., BORTHWICK, N.J., VINER, N., JANOSSY, G., BACON, P.A., AKBAR, A.N. The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. **European Journal of Immunology**, **24**: 892-899, 1994.
- SALVESEN, G.S. Caspase 8: Igniting the death machine. **Structure**, **7**: 225-229, 1999.



- SAVILL, J. & FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, **407**: 784–788, 2000.
- SCHELLEKENS, P.T., TERSMETTE, M., ROOS, M.T., KEET, R.P., DE WOLF, F., COUTINHO, R.A., MIEDEMA, F. Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype. **AIDS**, **6**: 665-669, 1992.
- SCHUITEMAKER, H., KOOT, M., KOOTSTRA, N.A., DERCKSEN, M.W., DE GOEDE, R.E., VAN STEENWIJK, R.P., LANGE, J.M., SCHATTEK, J.K., MIEDEMA, F., TERSMETTE, M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. **Journal of Virology**, **66**: 1354-1360, 1992.
- SCHWARZ, M., ANDRADE-NAVARRO, M.A., GROSS, A. Mitochondrial carriers and pores: Key regulators of the mitochondrial apoptotic program? **Apoptosis**, **12**: 869-876, 2007.
- SHEPPARD, H.W., LANG, W., ASCHER, M.S., VITTINGHOFF, E., WINKELSTEIN, W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. **AIDS**, **7**: 1159-1166, 1993.
- SHERMAN, M. & GREENE, W.C. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. **Microbes and Infection**, **4**: 67-73, 2002.
- SHUAI, K. Interferon-activated signal transduction to the nucleus. **Current Opinions in Cell Biology**, **6**: 253-259, 1994.
- SIBLEY, K., ROLLINSON, S., ALLAN, J.M., SMITH, A.G., LAW, G.R., RODDAM, P.L., SKIBOLA, C.F., SMITH, M.T., MORGAN, G.J. Functional *FAS* Promoter

- Polymorphisms are Associated with Increased Risk of Acute Myeloid Leukemia. **Cancer Research**, **63**: 4327–4330, 2003.
- SILVESTRIS, F., CAFFORIO, P., FRASSANITO, M.A., TUCCI, M., ROMITO, A., NAGATA, S., DAMMACCO, F. Overexpression of Fas antigen on T cells in advanced HIV-1 infection: differential ligation constantly induces apoptosis. **AIDS**, **10**: 131–141, 1996.
- SIMON, F.; MAUCLÈRE, P., ROQUES, P., LOUSSERT-AJAKA, I., MÜLLER-TRUTWIN, M.C., SARAGOSTI, S., GEORGES-COURBOT, M.C., BARRÉ-SINOSSI, F., BRUN-VÉZINET, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Medicine**, **4**: 1032-1037, 1998.
- SINCLAIR, A.L., HABESHAW, J.A., MUIR, L., CHANDLER, P., FORSTER, S., CRUICKSHANK, K., DALGLEISH, A.G. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: comparison between HTLV-I and HIV-1 assays. **AIDS**, **2**: 465-472, 1988.
- SLEE, E.A., ADRAIN, C., MARTIN, S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, **276**: 7320–7326, 2001.
- SLOAND, E.M., YOUNG, N.S., KUMAR, P., WEICHHOLD, F.F., SATO, T., MACIEJEWSKI, J.P. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. **Blood**, **89**: 1357-1363, 1997.

- SMITH, C. A., FARRAH, T., GOODWIN, R. G. The TNF.receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation and death. **Cell**, **76**: 959, 1994.
- SNUSTAD D.P., & SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genetica**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. 903p.
- SREBEL, K. & BOUR, S. Molecular interactions of HIV with host factors. **AIDS**, **13**: 13-24, 1999.
- SUBBRAMANIAN, R.A. & COHEN, E.A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. **Journal of Virology**, **68**: 6831-6835, 1994.
- SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GOLSTEIN, P.; NAGATA, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell** **75**: 1169-1178, 1993.
- SUDA, T. & NAGATA, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, **179**: 873-879, 1994.
- SULIMAN, A., LAM, A., DATTA, R., SRIVASTAVA, R.K. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. **Oncogene**, **20**: 2122–2133, 2001.
- SUN, M., AMES, K.T., SUZUKI, I., FINK, P.J. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. **Journal of Immunology**, **177**: 1481-1491, 2006.
- SUN, T., MIAO, X., ZHANG, X., TAN, W., XIONG, P., LIN, D. Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, **96**: 1030-1036, 2004.

- SWANSTROM, R. & WILLS, J.W. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: **Retroviruses**. Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H.E. (eds). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1997. p. 263–334.
- TAKAHASHI, T., TANAKA, M., INAZAWA, J., ABE, T., SUDA, T., NAGATA, S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. **International Immunology**, **6**: 1567-1574, 1994.
- TEIXEIRA, S.L.M., BASTOS, F.I., TELLES, P.R., HACKER, M.A., BRIGIDO, L.F., OLIVEIRA, C.A.F., BONGERTZ, V., MORGADO, M.G. HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity. **Journal Clinical Virology**, **31**: 221-226, 2004.
- THORBURN, A. Death receptor-induced cell killing. **Cellular Signaling**, **16**: 139-144, 2004.
- THORNBERRY, N.A. Caspases: key mediators of apoptosis. **Chemistry & Biology**, **5**: 97-103, 1998.
- TRAUTH, B.C., KLAS, C., PETERS, A.M., MATZKU, S., MÖLLER, P., FALK, W., DEBATIN, K.M., KRAMMER, P.H. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. **Science**, **245**: 301-305, 1989.
- TRUMP, B.F., BEREZESKY, I.K., CHANG, S.H., PHELPS, P.C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicologic Pathologic**, **25**: 82–88, 1997.
- TURNER, B.G. & SUMMERS, M.F. Structural Biology of HIV. **Journal of Molecular Biology**, **285**: 1-32, 1999.
- UNAIDS/WHO. Aids epidemic update: December 2006. Geneva, 2006.
- UNAIDS/WHO. Aids epidemic update: December 2007. Geneva, 2007.

- VAISHNAV, Y.N. & WONG-STAAAL, F. The Biochemistry of Aids. **Annual Review of Biochemistry**, **60**: 577-630, 1991.
- VARELA-ROHENA, A., MOLLOY, P.E., DUNN, S.M., LI, Y., SUHOSKI, M.M., CARROLL, R.G., MILICIC, A., MAHON, T., SUTTON, D.H., LAUGEL, B., MOYSEY, R., CAMERON, B.J., VUIDEPOT, A., PURBHOO, M.A., COLE, D.K., PHILLIPS, R.E., JUNE, C.H., JAKOBSEN, B.K., SEWELL, A.K., RILEY, J.L. Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. **Nature Medicine**, **14**: 1390-1395, 2008.
- VASILESCU, A., HEATH, S.C., DIOP, G., DO, H., HIRTZIG, T., HENDEL, H., BERTIN-MAGHIT, S., RAPPAPORT, J., THERWATH, A., LATHROP, G.M., MATSUDA, F., ZAGURY, J.F. Genomic analysis of Fas and FasL genes and absence of correlation with disease progression in AIDS. **Immunogenetics**, **56**: 56-60, 2004.
- VERGIS, E.N. & MELLORS, J.W. Natural history of HIV-1 infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, **14**: 809-825, 2000.
- VOGT, V.M. Retroviral virions and genomes. In: **Retroviruses**. Coffin, J.M., Hughes, S.H. & Varmus, H.E. (eds). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1997. p. 27-70.
- WAINBERG, M.A ; KENDALL, O.; GILMORE, N. Vaccine and antiviral strategies against infections caused by Human Immunodeficiency Virus. **AIDS UPDATE**, **138**: 797-854, 1988.
- WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, **296**: 1635-1636, 2002.
- WALKER, B.D. & PLATA, F. Cytotoxic T lymphocytes against HIV. **AIDS**, **4**: 177-184, 1990.

- WALKER, C.M., MOODY, D.J., STITES, D.P., LEVY, J.A. CD8<sup>+</sup> lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. **Science**, **234**: 1563–1566, 1986.
- WANG, W.K., CHEN, M.Y., CHUANG, C.Y., JEANG, K.T. & HUANG, L.M. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, **33**: 131-40, 2000.
- WEI, X., DECKER, J.M., WANG, S., HUI, H., KAPPES, J.C., WU, X., SALAZAR-GONZALEZ, J.F., SALAZAR, M.G., KILBY, J.M., SAAG, M.S., KOMAROVA, N.L., NOWAK, M.A., HAHN, B.H., KWONG, P.D., SHAW, G.M. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, **422**: 307-312, 2003.
- WEI, X., GUOSH, S.J., TAYLOR, M.E., JOHNSON, V.A., EMINI, E.A., DEUTSCH, P., LIFSON, J.D., BONHOEFFER, S., NOWAK, M.A., HAHN, B.H., SAAG, M.S., SHAW, G.M. Viral dynamics in Human Immunodeficiency virus type 1 infection. **Nature**, **373**: 117-122, 1995.
- WESTENDORP, M.O., FRANK, R., OCHSENBAUER, C., STRICKER, K., DHEIN, J., WALCZAK, H., DEBATIN, K.M., KRAMMER, P.H. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. **Nature**, **375**: 497-500, 1995.
- WIEGERS, K., RUTTER, G., KOTTLER, H., TESSMER, U., HOHENBERG, H., & KRAUSSLICH, H.G. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. **Journal of Virology**, **72**: 2846–2854, 1998.
- WILLEY, R.L., MALDARELLI, F., MARTIN, M.A., STREBEL, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. **Journal of Virology**, **66**: 7193-7200, 1992.

- WILLS, J. W., & CRAVEN, R. C. Form, function, and use of retroviral Gag proteins. **AIDS**, **5**: 639–654, 1991.
- WOO, M., HAKEM, R., SOENGAS, M.S., DUNCAN, G.S., SHAHINIAN, A., KAGI, D., HAKEM, A., MCCURRACH, M., KHOO, W., KAUFMAN, S.A., SENALDI, G., HOWARD, T., LOWE, S.W., MAK, T.W. Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. **Genes & Development**, **12**: 806-819, 1998.
- WU, J., METZ, C., XU, X., ABE, R., GIBSON, A.W., EDBERG, J.C., COOKE, J., XIE, F., COOPER, G.S., KIMBERLY, R.P. A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. **Journal of Immunology**, **170**: 132-138, 2003.
- WYATT, R. & SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, **280**: 1884–8, 1998.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F.R., CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, **68**: 251-306, 1980.
- YONEHARA, S., ISHII, A., YONEHARA, M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. **The Journal of Experimental Medicine**, **169**: 1747-1756, 1989.
- YUAN, J. & HORVITZ, H.R. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. **Development**, **116**: 309-320, 1992.

- YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H.M., HORVITZ, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell**, **75**: 641-652, 1993.
- ZANONE POMA, B., RIVA, A., NASI, M., CICONI, P., BROGGINI, V., LEPRI, A.C., MOLOGNI, D., MAZZOTTA, F., MONFORTE, A.D., MUSSINI, C., COSSARIZZA, A., GALLI, M., ICONA FOUNDATION STUDY GROUP. Genetic polymorphisms differently influencing the emergence of atrophy and fat accumulation in HIV-related lipodystrophy. **AIDS**, **22**: 1769-1778, 2008.
- ZHANG, Z., WANG, L.E., STURGIS, E.M., EL-NAGGAR, A.K., HONG, W.K., AMOS, C.I., SPITZ, M.R., WEI, Q. Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes involved in the death pathway and risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, **12**: 5596-5602, 2006.



**ANEXO 01****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Estou sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre “**Avaliação clínico-epidemiológica de fatores de natureza viral e de cunho infeccioso (co-infecções virais e bacterianas) que influenciam o curso da doença em indivíduos infectados pelo Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1**” que está sendo desenvolvida pelo Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:

- O título do projeto é: “**Avaliação clínico-epidemiológica de fatores de natureza viral e de cunho infeccioso (co-infecções virais e bacterianas) que influenciam o curso da doença em indivíduos infectados pelo Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1**”.
- O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Ricardo Ishak, Biomédico, Professor Titular da Universidade Federal do Pará.
- O objetivo da pesquisa é aumentar o conhecimento vigente acerca da infecção pelo HIV, monitorando o aparecimento de novas cepas circulantes na região e correlacionando com os quadros clínicos, com as co-infecções por vírus e bactérias e com marcadores genéticos do hospedeiro.
- Durante a pesquisa o paciente deverá responder a um questionário, depois será submetido a uma coleta de sangue para exame de laboratório.
- Essa pesquisa não oferece riscos, porque as práticas são de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de sangue (5mL) será coletada para a detecção de co-infecções, marcadores genéticos do vírus e do hospedeiro.
- Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como agulhas e seringas, não oferecendo risco para a pessoa.
- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
- Esta pesquisa não oferece qualquer possibilidade de ajuda financeira aos voluntários que participaram.
- O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, ou não, é possibilitar um melhor entendimento sobre os subtipos do HIV-1 circulantes em nossa região, as possíveis associações com marcadores genéticos de resistência e o impacto das co-infecções na progressão para SIDA/AIDS.
- A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador responsável

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido (a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Prontuário: \_\_\_\_\_

Protocolo: \_\_\_\_\_

Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia, Laboratório de Virologia, Fone/fax: (91) 32017587/ e-mail: rishak@ufpa.br

**ANEXO 02**

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

**PROJETO: HIV-UREDIPE****QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

1. Prontuário n°: \_\_\_\_\_ Protocolo n°: \_\_\_\_\_ Data da coleta de dados: \_\_\_\_\_  
 2. Nome do Paciente: \_\_\_\_\_  
 3. Data da coleta de amostra - 1ª coleta: \_\_\_\_\_ 2ª coleta: \_\_\_\_\_ 3ª coleta: \_\_\_\_\_

**Dados epidemiológicos**

4. Sexo A. Masculino B. Feminino  
 5. Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ anos  
 6. Estado Civil: A. Casado B. Solteiro C. Separado D. Viúvo  
 7. Naturalidade: \_\_\_\_\_  
 8. Bairro: \_\_\_\_\_  
 9. Município: \_\_\_\_\_ 11. CEP: \_\_\_\_\_  
 10. Município de residência anterior (se reside há menos de 05 anos no endereço atual): \_\_\_\_\_  
 11. Data da última sorologia negativa: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data da primeira sorologia positiva: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 12. Idade da 1ª relação sexual: \_\_\_\_\_  
 13. Escolaridade  
 A. Não alfabetizado D. 1º grau completo G. 3º grau incompleto  
 B. Alfabetizado E. 2º grau incompleto H. 3º grau completo  
 C. 1º grau incompleto F. 2º grau completo  
 14. Renda familiar (salários): a) < 1 b) 1-3 c) 4-6 d) 7-10 e) > 10  
 15. Categoria de exposição:  
 A. Homossexual E. Usuário de droga não-EV? 1. Álcool 2. Cigarro 3. Maconha 4. Outra: \_\_\_\_\_  
 B. Bissexual F. Hemofílico  
 C. Heterossexual G. Transfusão de sangue (após 1980) Local:  
 D. Usuários de drogas EV H. Outros, quais \_\_\_\_\_  
 I. \_\_\_\_\_  
 16. Uso de droga endovenosa alguma vez  
 A. Sim, mas não quer comentar B. Sim C. Não D. Não quer comentar  
 17. Há quanto tempo faz uso de drogas endovenosas \_\_\_\_\_ Anos  
 18. Parou?  Sim  Não \_\_\_\_\_ Ano do último uso.  
 19. Como você costumava fazer uso de seringa e agulha (antes do diagnóstico de HIV)  
 A. sempre sozinho B. dividia com uma pessoa fixa C. dividia com mais de uma pessoa  
 20. Você já fez uso de drogas injetáveis com seringas ou agulhas compartilhadas com:  
 A) pessoas que são de, ou, normalmente viajam para outros estados?  
 1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, quais estados: \_\_\_\_\_  
 B) pessoas que são de, ou, normalmente viajam para outros países?  
 1. Sim 2. Não 3. Não sabe Se sim, de onde: \_\_\_\_\_

## 21. Comportamento sexual

- |                          |   |                          |   |
|--------------------------|---|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | 1. Com homens                                       | <input type="checkbox"/> | 6. com múltiplos(a) parceiros(a)          |
| <input type="checkbox"/> | 2. Com mulheres                                     | <input type="checkbox"/> | 7. com parceiro(a) transfundido           |
| <input type="checkbox"/> | 3. Com homens e mulheres                            | <input type="checkbox"/> | 8. com parceiro hemofílico                |
| <input type="checkbox"/> | 4. com parceiro(a) usuário de drogas não-injetáveis | <input type="checkbox"/> | 9. com parceiro(a) portador de HIV        |
| <input type="checkbox"/> | 5. com parceiro(a) usuário de drogas EV             | <input type="checkbox"/> | 10. com parceiro(a) portador de SIDA/AIDS |

## 22. Seleção de Parceiros

- Antes do HIV: Fixo  Não Fixo  Quantos por semana? \_\_\_\_\_
- Depois do HIV: Fixo  Não Fixo  Quantos por semana? \_\_\_\_\_

## 23. Parceiro(s) de (ou em) outro(s) estado(s)?

1. Sim      2. Não      3. Não sabe      Se sim, quais Estados: \_\_\_\_\_

## 24. Parceiro(s) de (ou em) outro(s) país(es)?

1. Sim      2. Não      3. Não sabe      Se sim, quais países: \_\_\_\_\_

25. Sexo anal:  Ativo     Passivo     Nunca     Não se aplica

## 26. Sexo com prostituta(o)      1.Sim      2. Não      3. Não sabe

## 27. Uso de preservativo:

Antes do HIV?      1. Sempre      2. Nunca      3. Às vezes

Depois do HIV?      1. Sempre      2. Nunca      3. Às vezes

## 29. Preservativo na última relação sexual?      1.Sim      2. Não

## 30. Preservativo em relação sexual eventual?      1.Sim      2. Não

31. História de DST:  Sim       Não

Frequência:  01     01 a 05     Mais de 05

Quais lembra: \_\_\_\_\_

Diagnóstico Clínico:  Sim       Não

Diagnóstico Laboratorial:  Sim     Não

## 32. Foi vacinado contra hepatite B?      1.Sim      2. Não      3. Não sabe

## 33. Já teve hepatite? 1.Sim      2. Não      Qual? 1.HAV 2.HBV 3.HCV 4. Não sabe

Diagnóstico Clínico:  Sim       Não

Diagnóstico Laboratorial:  Sim     Não

## 34. Uso de antiretroviral: 1. Não      2. Sim

Quais: \_\_\_\_\_

Data de início da terapia: \_\_\_\_\_

Alguma vez abandonou o tratamento? a) Sim    Quantas vezes? \_\_\_\_\_

b) Não

Hora da coleta: \_\_\_\_\_

Último uso (medicamento):

Hora:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**ANEXO 03**

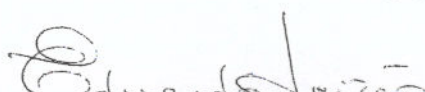
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



## TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação clínico-epidemiológico de fatores de natureza viral e de cunho infeccioso (co-infecções virais e bacterianas), que influenciam o curso da progressão da doença no indivíduo infectado pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1”**, protocolo nº 2092/05, sob a responsabilidade dos pesquisadores, *Luiz Fernando Almeida Machado, Antonio Carlos Rosário Vallinoto, José Alexandre Rodrigues de Lemos, Maria Helena Pessoa Chaves, Rosimar Neris Martins, Vânia Nakauth Azevedo, Isaura Maria Cayres Vallinoto e Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak* e Coordenação do *Prof. Dr. Ricardo Ishak*, obtendo **APROVAÇÃO** na reunião do dia 20/02/2006, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 20 de fevereiro de 2006

  
**Dr. Eduardo Leitão Maia**

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFGA