

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Marcadores moleculares associados à
resistência/susceptibilidade ao HIV-1 no Distrito
Federal (Brasil)**

Eduardo Lourenço da Silva

Brasília

2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Marcadores moleculares associados à
resistência/susceptibilidade ao HIV-1 no Distrito
Federal (Brasil)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Animal da
Universidade de Brasília como requisito
parcial para obtenção do título de mestre.

Eduardo Lourenço da Silva

Orientadora: Prof. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília
2010

Dissertação de Mestrado

Eduardo Lourenço da Silva

Título:

**“Marcadores Moleculares relacionados à
resistência/susceptibilidade ao HIV-1 no Distrito Federal
(Brasil)”**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Presidente/Orientadora

UnB

*Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes
Almeida Santos*

*Membro Titular Interno Vinculado ao
Programa*

UnB

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

*Membro Titular Interno não Vinculado ao
Programa*

UnB

Profa. Dra. Maria Nazaré Klautau Guimarães

Membro Suplente

Interno Vinculado ao Programa

UnB

Brasília, 26 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Genética da UnB.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal - UnB.

Aos Laboratórios de Imunologia Molecular do Hospital das Clínicas da USP-RP e do Departamento de Genética da FMRP, USP.

Ao apoio financeiro da CAPES e do DPP-UnB.

Aos professores doutores Aguinaldo Luiz Simões e Celso Teixeira Mendes Junior pelo fornecimento e deslocamento dos iniciadores utilizados neste trabalho.

Ao professor doutor Erick da Cruz Castelli pelo auxílio na viabilização do trabalho em Ribeirão Preto.

Ao professor doutor Eduardo Antônio Donadi por permitir a utilização do Laboratório de Imunologia Molecular do Hospital das Clínicas da USP-RP.

À bióloga responsável pelo Laboratório de Imunologia Molecular do Hospital das Clínicas da USP-RP doutora Neifi Hassan Saloum Deghaide pela completa atenção, confiança e prestatividade durante os trabalhos em Ribeirão Preto.

Às professoras doutoras Maria de Fátima Menezes Almeida Santos e Juliana Forte Mazzeu de Araújo pelas contribuições ao trabalho durante a avaliação da banca.

À professora doutora Silviene Fabiana de Oliveira pela ousadia da orientação.

Ao Grupo de Genética de Populações pelo auxílio em diferentes aspectos.

Aos integrantes, frequentadores e visitantes do Laboratório de Genética da UnB pela companhia, festividades, jogos e momentos alegres.

Em especial, quero aqui agradecer ao então doutorando Rodrigo Coutinho de Almeida pelo estímulo, parceria e trabalhos já realizados e ainda a serem realizados e a então mestranda Patrícia Maria Fritsch que demonstrou em atitudes o real significado de palavras como amizade, companheirismo, atenção e amor.

Agradeço a meus pais, Paulo Lourenço da Silva e Maria Marlene Dantas de Oliveira Silva, à minha irmã Paula Lourenço da Silva e ao meu novo irmão Ilvan Martins Cardoso Junior pelo apoio incansável e incondicional. À minha Tia Maria Marly Dantas de Oliveira Silva pela correção e auxílio na reta final e a toda minha família pelos exemplos de vida e convívio.

Impossível neste momento não me lembrar de pessoas como Gabriel Figueiredo, Victor Torres, Cláudio Neves, Thiago Almeida, Fernanda Cademartori, Letícia Santos, Carolina Diniz, Babi Soares e outros tantos companheiros de reuniões éticas, sonoras, filosóficas, existenciais e até burocráticas que, mesmo não listados aqui, sabem que são importantes para mim.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer a Ana Paula Daltoé Inglês por ajudar a lembrar minha vontade de fazer mestrado.

Muito obrigado a todos!

À minha família,
Dedico.

“O mundo é movido por perguntas e não por respostas.”
(Domínio Público)

Resumo

A Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), caracteriza-se por ser uma infecção em que se observa uma alta taxa de mutações na formação das estruturas proteicas de seu agente etiológico, o que dificulta a terapia antibiótica e a resposta imunológica natural do indivíduo infectado. Desta forma, o conhecimento sobre a variabilidade genética humana e a análise da possível resistência deste à infecção pelo HIV é tão importante quanto o estudo da etiologia e dos ciclos biológicos do vírus para a correta aplicação da terapêutica e para a melhor orientação das pesquisas na busca por medicamentos mais eficientes. O presente estudo visou à caracterização genética populacional do hospedeiro do HIV em uma população do Distrito Federal. Para tal, foi realizada uma avaliação da distribuição gênica e genotípica de uma deleção de 32 pares de base no gene CCR5, CCR5*Δ32, e dos marcadores microssatélites TNFc, TNFd e TNFe associados aos genes do fator de necrose tumoral – *TNFα* e *TNFβ* -, que são marcadores genéticos associados à resistência ao HIV, em uma amostra de indivíduos nascidos no Distrito Federal. A frequência para a deleção de 32 pares de base neste estudo foi de 5,5% com a existência de um indivíduo homozigoto para a mutação e nove heterozigotos. O alelo 2 de TNFc foi encontrado com uma frequência de 9%, o que é muito abaixo em relação ao relatado para outras populações brasileiras e em africanos e europeus. TNFd teve o alelo 3 como mais frequente e o marcador TNFe apresentou o alelo 3 como o mais frequente. O haplótipo formado pelos alelos TNFc*1, TNFd*3 e TNFe*3 apresentou-se como o mais comum. Desta forma, o conhecimento da frequência do alelo CCR5*Δ32 no Distrito Federal fortalece a proposta de um gradiente associado com a presença de ancestralidade europeia e corrobora com os dados bibliográficos de que a população do Centro-Oeste é como um resumo da população brasileira. A descrição da distribuição alélica para os *loci* TNFc, d e e contribui para o melhor conhecimento da distribuição desses marcadores no Brasil.

Abstract

AIDS, the Acquired Immune Deficiency Syndrome, caused by the human immunodeficiency virus, HIV, is characterized as an infection where there has been found a high mutation rate in the formation of protein structures of its etiologic agent, troubling the antibiotic therapy and natural immune response of the infected person. Therefore, knowledge of human genetic variability and analysis of the possible resistance of the HIV infection are so important as the study of the etiology and biological cycles of the virus to the correct application of therapy and for better targeting of research for more effective drugs. This study aimed to characterize the population genetics of the HIV's host in Distrito Federal population. By reason of, an assessment of gene and genotypic distribution of a deletion of 32 base pairs in the CCR5 gene, CCR5* Δ 32, and microsatellite markers TNFc, TNFd and TNFe genes associated with tumor necrosis factor - *TNF α* and *TNF β* -, which are genetic markers associated with resistance/susceptibility to HIV in a sample of individuals born in Distrito Federal. The frequency of 32 base pairs deletion in this study was 5.5% with the existence of an individual homozygous for the mutation and nine heterozygotes. The allele 2 of TNFc was found with a frequency of 9%, which is much lower than previously reported for other populations in Brazil and in Africa and Europe. TNFd had the allele 3 as the most frequent and TNFe marker allele 3 showed the most frequent. The haplotype formed by alleles TNFc *1, TNFd *3 and TNFe *3 was the most common. Consequently, knowledge of the frequency of the CCR5 * Δ 32 in the Distrito Federal has supported the proposal of a gradient associated with the presence of European ancestry and corroborates the view that the population of Distrito Federal and also from this geographical region is a brief of the Brazilian population. The description of the distribution of alleles for loci TNFc, TNFd and TNFe contributes to a better understanding of the distribution of these markers in Brazil.

Índice

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 AIDS 1

1.2 HIV 3

1.3 CCR5 8

1.4 Fator de Necrose Tumoral (TNF) 9

1.5 População do Distrito Federal 11

2 OBJETIVOS 13

3 MATERIAIS E MÉTODOS 14

3.1 População amostrada: Distrito Federal 14

3.2 Processamento das amostras e extração de DNA 16

3.3 Seleção dos marcadores genéticos 16

3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 17

3.3.2 Separação Eletroforética dos Produtos Amplificados 18

3.3.3 Nomenclatura Utilizada 19

3.4 Análise dos dados 19

3.4.1 GENEPOP 19

3.4.2 ARLEQUIN 20

3.4.3 PHASE 20

4 RESULTADOS 22

4.1 Caracterização populacional 22

4.2 Reconstrução haplotípica - TNFc, TNFd e TNFe 22

5 DISCUSSÃO 26

5.1 CCR5 27

5.2 TNFs 29

5.3 Haplótipos TNFs 31

6 CONCLUSÃO 32

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

ANEXO 1: Protocolos dos procedimentos laboratoriais. i

ANEXO 2: Pareceres de aprovação do projeto, CEP-FS e CONEP. vi

ANEXO 3: Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado na coleta do material biológico. x

ANEXO 4: Formulário utilizado no momento da coleta do material biológico. xi

Índice de tabelas

Tabela 1. Distribuição dos indivíduos amostrados pelas regiões administrativas.	15
Tabela 2. Descrição das sequências iniciadoras, usadas para amplificar os segmentos de DNA, de cada um dos <i>locus</i> analisados.	17
Tabela 3. Condições para eletroforese dos <i>loci</i> estudados.	19
Tabela 4: Características dos microssatélites (STRs) do gene TNF.	19
Tabela 5. Fenótipos observados, valores de heterozigose observada e esperada, valores de p do teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e respectivos desvios padrões com relação aos quatro marcadores autossômicos analisados para a população do Distrito Federal.	23
Tabela 6. Frequências alélicas de CCR5 e TNF α , d e e na população do Distrito Federal, nas três populações parentais - europeus, africanos e ameríndios - e no Brasil (ND = dado não disponível).	24
Tabela 7. Haplótipos observados na população do Distrito Federal para os marcadores TNF α , TNF β e TNF γ e frequência dos mesmos, com respectivo desvio padrão, estimado a partir da análise com o Phase. A maior frequência observada está marcada com um quadrado.	25

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição de indivíduos infectados por HIV no mundo em 2008 (UNAIDS/OMS, 2009).	2
Figura 2. Disseminação da infecção por HIV nos municípios brasileiros entre 1980-2009 (MS/SVS/ Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2009).	3
Figura 3. Organização do genoma do HIV-1 (adaptado de Watts <i>et al</i> , 2009).	4
Figura 4. Estrutura do HIV Adaptado de (http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/structure.htm).	5
Figura 5. Representação da entrada do HIV na célula alvo (modificado de Marmor, 2006).	5
Figura 6. Processo de infecção pelo HIV (modificado de http://mayoresearch.mayo.edu/pireschla/images/pireschla_banner.jpg).	7
Figura 7. Localização do gene CCR5 no cromossomo 3 (adaptado de Stephens <i>et al</i> , 1998).	8
Figura 8. Representação do MHC no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Em destaque estão os microssatélites da região do gene TNF (modificado de Carvalho, 2004).	11
Figura 9. Regiões Administrativas que compunham o Distrito Federal em 2002 (Fonte: Codeplan, 1997), época da coleta de material biológico.	15
Figura 10. Distribuição da mutação $\Delta 32$ CCR5 no Brasil.	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 AIDS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que se caracteriza por induzir a imunossupressão no indivíduo infectado, o que facilita o aparecimento de infecções oportunistas e patologias raras. O início oficial da pandemia ocorreu em 1981, quando o Sistema de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) notificou o diagnóstico de uma cepa de *Pneumocystis carinii* em cinco homossexuais do sexo masculino (*Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1981). Todavia, existem evidências sorológicas da presença do HIV em imigrantes cubanos antes de 1980 (de Medina *et al*, 1987). *Pneumocystis carinii* foi renomeado como *Pneumocystis jiroveci* por Frenkel em 1999 e essa nomenclatura passou a ser aceita após o *International Workshops on Opportunistic Protists* em Cincinnati, 2001. Outra doença oportunista importante no estudo da AIDS é o Sarcoma de Kaposi, descrito inicialmente em 1872 por Moritz Kaposi (Szajerka *et al*, 2007) que por muito tempo serviu como referência para o diagnóstico indireto da infecção por HIV. A infecção pelo HIV é crônica e a progressão da doença é, geralmente, lenta (Klimas, 2008).

Existem evidências de que o primeiro caso de infecção por HIV surgiu da transmissão de diferentes vírus entre espécies de primatas não humanos e o homem, provavelmente em Camarões no oeste africano (Keele *et al*, 2006). O HIV é o resultado de pelo menos onze eventos de transmissão do vírus da imunodeficiência em símios (SIV) de primatas africanos não humanos para seres humanos (Wertheim e Worobey, 2009). Três transmissões de SIV oriundos de subespécies de chimpanzés da África central (*Pan troglodytes*) deram origem aos grupos M, N e O de HIV tipo 1 (Gao *et al*, 1999). Outros oito eventos de transmissão de SIV de primatas *Cercocebus torquatus* deram origem aos grupos A ao H do HIV tipo 2 (Hirsch *et al*, 1989; Damond *et al*, 2004). Elementos genéticos dos três grupos de HIV tipo 1 somados a elementos dos grupos A e B do HIV tipo 2 estabeleceram a possibilidade de transmissão entre humanos. A contribuição do grupo M do HIV tipo 1 levou ao surgimento dos quadros patológicos e consequentemente à pandemia do HIV/AIDS (Damond *et al*, 2004).

O programa HIV/AIDS da Organização das Nações Unidas (UNAIDS/OMS) estimou que existiam cerca de 33 milhões de pessoas sobrevivendo com HIV até dezembro de 2008 (Kilmarx, 2009). Apesar das políticas de conscientização e educação sexual acerca da necessidade de proteção em relação à infecção, há um aumento contínuo do número de pessoas infectadas por HIV. Isso porque os indivíduos infectados estão tendo uma maior sobrevida com o advento de novas drogas e também devido a novas infecções que, apesar de estarem em número decrescente, ainda são epidemiologicamente importantes no que se refere ao impacto na saúde pública mundial. A UNAIDS estimou em cerca de 3 milhões e 640 mil pessoas infectadas no continente americano, sendo aproximadamente 2 milhões apenas na América Latina, até o ano de 2008 (UNAIDS, 2009). A Figura 1 mostra a distribuição dos indivíduos portadores do vírus pelos continentes.

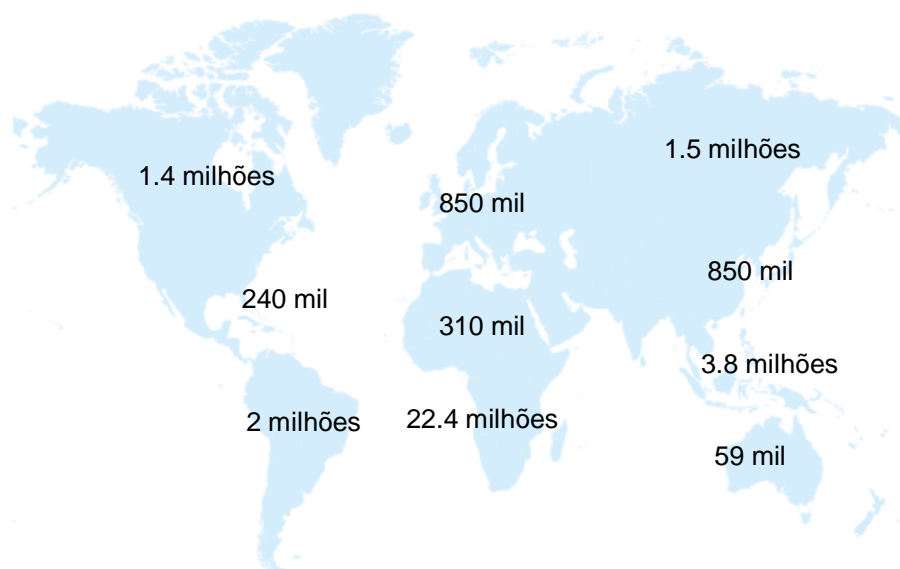


Figura 1: Distribuição de indivíduos infectados por HIV no mundo em 2008 (UNAIDS/OMS, 2009).

No Brasil, o órgão responsável pela notificação e investigação de doenças e agravos que constam na lista nacional de doenças de notificação compulsória, dentre elas a AIDS, é o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Utilizando os dados coletados pelo SINAN, o boletim epidemiológico do Programa DST/AIDS do Ministério da Saúde apontou que no período entre 1980 e junho de 2009 544.846 casos foram notificados de forma direta ou indireta no Brasil. Os infectados majoritariamente são do gênero masculino - 356.430, enquanto 188.396 dos casos

ocorrem no gênero feminino. O número de indivíduos vitimados pela síndrome foi de 217.091 neste período. Neste boletim, foram divulgados 7.047 de casos registrados no Distrito Federal, em uma taxa de incidência de 18,2 casos para 100.000 habitantes, taxa esta maior que a registrada na região Nordeste (11,3) e maior que a observada na região Centro-Oeste como um todo (15,9).

Em 2008, o Ministério da Saúde divulgou no VII Congresso Brasileiro de Prevenção das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) e Aids que aproximadamente 85% dos municípios brasileiros têm pelo menos um caso da síndrome notificado (<http://sistemas.aids.gov.br/congressoprevencao/2008/index.php>, informação acessada em 18/11/2008). A Figura 2 demonstra a disseminação da doença no território brasileiro entre os anos de 1980 e 2009.

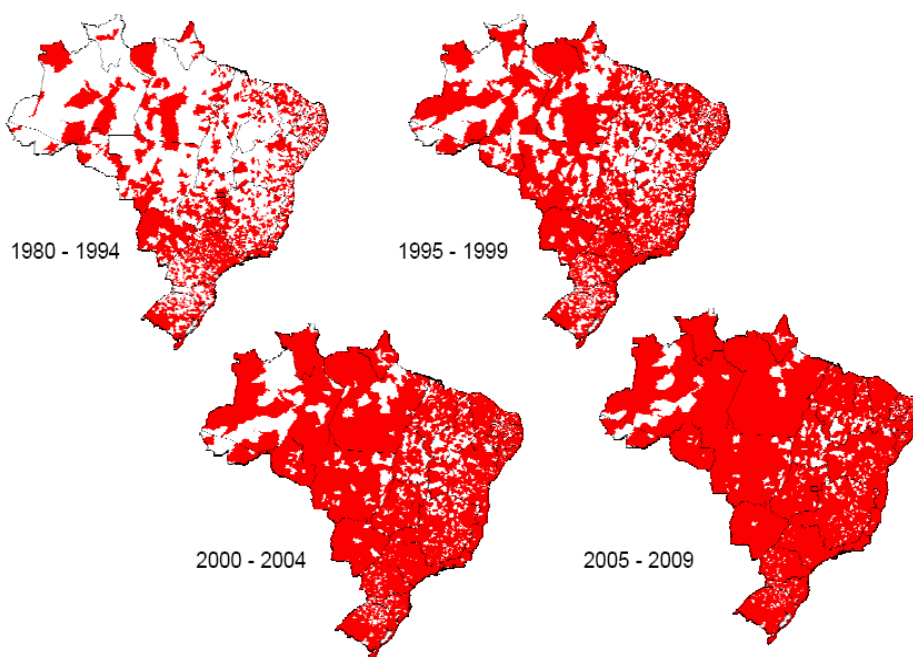


Figura 2: Disseminação da infecção por HIV nos municípios brasileiros entre 1980-2009 (MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2009).

1.2 HIV

O HIV pertence à classe dos retrovírus e ao subgrupo dos lentivírus. A infecção causada por estes vírus é caracterizada por um longo intervalo entre a infecção inicial e o aparecimento dos sintomas (Narayan & Clements 1989). Semelhante a outras viroses, o HIV inicia sua replicação quando dentro de células hospedeiras, utilizando a

maquinaria de replicação do material genético destas. Os retrovírus possuem genes compostos de ácido ribonucleico (RNA) e, dentro das células hospedeiras, utilizam a enzima transcriptase reversa para polimerizar uma molécula de DNA a partir do RNA viral para posterior incorporação ao genoma-alvo (Temin, 1993).

Dentre as classes gênicas existentes no genoma do HIV, observa-se três regiões principais. Duas regiões constituídas pelos genes *Gag* e *Pol* que somadas possuem 9 kilobases (kb) e uma região de 4 kb relativa ao gene *Env* que transcreve para a maior quantidade RNA mensageiro produzido pelo vírus (Watts *et al*, 2009). A Figura 3 apresenta um modelo de como estas regiões estão dispostas.

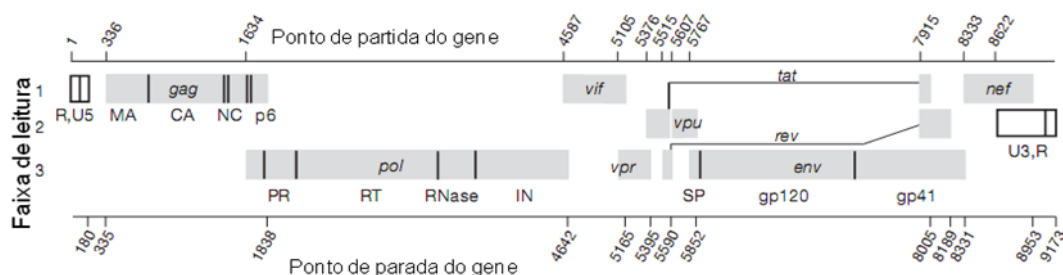


Figura 3: Organização do genoma do HIV-1 (adaptado de Watts *et al*, 2009).

O gene *Gag* (do inglês, group-specific antigen) codifica as proteínas estruturais internas da matriz (p17); proteína do capsídeo (p24); proteína do nucleocapsídeo (p7) entre outras. O gene *Pol* codifica as enzimas de transcriptase reversa (p66/51), integrase (p31) e protease (p11). O gene *Env*, por sua vez, está relacionado à codificação da glicoproteína (gp) 160, precursora das gp120 e gp41, fundamentais no processo de ancoragem à célula alvo (Bieniasz, 2009). Uma representação da estrutura do vírus pode ser observada na Figura 4.

A transmissão do HIV ocorre principalmente pelo contato sexual, pelo uso de seringas e por meio de transfusão de sangue entre indivíduos infectados e saudáveis. Recém-nascidos de mães infectadas podem ser infectados antes ou durante o parto ou através do aleitamento. O HIV pode ser encontrado no suor, lágrimas e saliva de indivíduos infectados, mas não em quantidade suficiente que permita a contaminação (Rothenberg, 2009).

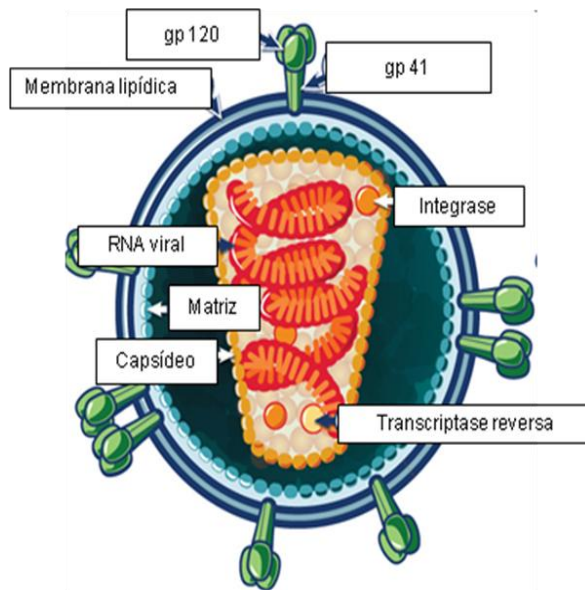


Figura 4: Estrutura do HIV (Adaptado de <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/structure.htm>).

A infecção pelo HIV tem início com a entrada do material genético viral na célula. Esse processo se dá por interações consecutivas entre as glicoproteínas gp120 e gp41 do envelope do vírus e os receptores de membrana das células do tipo CD4. No processo de infecção também estão envolvidos correceptores como CCR5 e CXCR4, que pertencem à família dos receptores de quimiocinas. Na entrada, inicialmente gp120 se liga à molécula de CD4, promovendo mudanças conformacionais nesta glicoproteína, expondo novos sítios de ligação e permitindo a interação de gp120 com o correceptor (CCR5 ou CXCR4). Essas interações promovem mudanças em gp41 e a exposição de uma região hidrofóbica, chamada de peptídeo de fusão, que se insere na membrana celular e permite a fusão da membrana viral com a da célula-alvo (Moore & Doms, 2003). A representação deste processo pode ser observada na Figura 5.

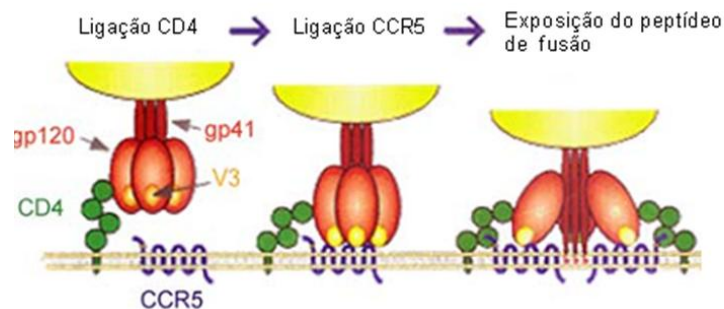


Figura 5: Representação da entrada do HIV na célula alvo (modificado de Marmor, 2006).

Uma vez no citoplasma celular, a transcriptase reversa transcreve o RNA viral em DNA complementar. Uma fita de DNA completa é sintetizada, vindo, posteriormente, a ser degradada em uma porção funcional menor. Esta nova fita é levada ao núcleo da célula, onde a proteína integrase do vírus HIV auxilia na integração ao DNA-hospedeiro. Quando o DNA viral for integrado ao DNA celular – neste momento chamado de provírus – a célula, se ativada, irá iniciar a síntese das proteínas virais (Bieniasz, 2009).

Na patogênese do HIV, observa-se uma resposta imunológica anormal por meio da ativação de linfócitos T do tipo CD4 que são infectados por partículas de HIV, gerando uma resposta imunológica exaustiva. Posteriormente, há um aumento nos níveis de linfócitos T do tipo CD8 e dos anticorpos específicos para o HIV. As células infectadas que sofreram a invasão de partículas de RNA viral transcrito em DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa passam a produzir proteínas virais pela transcrição de cDNA para RNA, sendo este processo controlado tanto pelos genes da célula-alvo quanto pelos genes do vírus. O RNA mensageiro produzido (mRNA) é transportado do núcleo da célula para o citoplasma. No citoplasma, o mRNA viral compete com a mRNA produzido pela célula e domina a maquinaria de tradução da célula hospedeira, iniciando o processo de síntese das proteínas virais (Klimas, 2008).

O mRNA é traduzido, levando a síntese das proteínas do envelope viral e proteínas constitutivas que são submetidas à ação de proteases do vírus para transformação destas partículas em unidades funcionais menores. Quando modificadas pela ação de proteases, as proteínas do envelope viral se unem às proteínas da membrana da célula hospedeira, juntamente com as proteínas constitutivas, RNA viral e enzimas virais dentro desta membrana em formação. Este novo vírus formado se desprende da célula hospedeira e fica disponível para reiniciar o processo. Uma única célula pode produzir milhares de unidades de HIV, levando à morte das células-alvo (Bieniasz, 2009). Na Figura 6 pode ser observado um modelo aproximado do ciclo biológico do vírus.

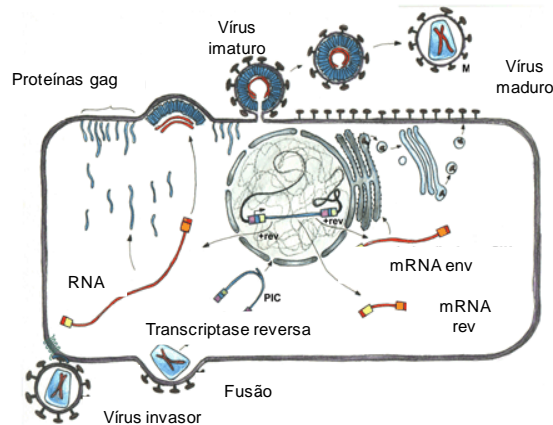


Figura 6: Processo de infecção pelo HIV (modificado de http://mayoresearch.mayo.edu/poeschla/images/poeschla_banner.jpg)

Desde o isolamento do vírus, estudos sobre a biologia do HIV permitiram a elucidação das vias de transmissão, o desenvolvimento de testes para diagnóstico sorológicos e drogas antirretrovirais cruciais no controle da infecção, até que seja possível a obtenção de uma vacina eficaz (Barouch, 2008). O vírus pode ficar quiescente por muitos anos se as células CD4 infectadas não forem ativadas. A habilidade deste de se manter latente em células hospedeiras dificulta as tentativas do organismo de o erradicar (Coleman & Li Wu, 2009). Por esta razão, pacientes soropositivos para HIV devem permanecer em terapia antirretroviral permanente.

Tão importante quanto o mecanismo de infecção do vírus é a resposta imunológica do hospedeiro, que por sua vez está relacionada à constituição genética deste. Fatores genéticos explicam, pelo menos em parte, por que alguns indivíduos são mais resistentes a determinadas infecções do que outros. Alterações drásticas nos genes relacionados com o sistema imune levam a uma vulnerabilidade fatal a agentes patológicos específicos, no entanto as alterações mais comuns não afetam a eficiência das respostas imunes (Kwiatkowski, 2000).

Em alguns casos, estas mudanças podem se apresentar como vantagem adaptativa, sendo observado, por exemplo, o não desenvolvimento da doença por conta destas mutações em alguns indivíduos infectados pelo vírus HIV. Dentre as mutações já descritas que, possivelmente, geram uma resistência ou retardam o desenvolvimento da infecção pelo vírus estão uma deleção de 32 pares de base no gene *CCR5* e mutações encontradas em marcadores relacionados a genes do complexo de histocompatibilidade humana (Novembre *et al.*, 2005; Lipsitch *et al.*, 2003).

1.3 CCR5

A entrada do HIV nas células-alvo é mediada por glicoproteínas presentes no envelope viral e coordenada pela inter-relação do receptor CD4 e dos correceptores CCR5 ou CXCR4, cujos genes estão localizados no braço curto do cromossomo *3p21.3* (Figura 7). Mutações nas sequências dos genes que expressam as proteínas que constituem esses receptores levam a uma ineficiência por parte da célula-alvo de apresentar um correceptor que seja reconhecido pelos ligantes do vírus o que, em alguns casos, impossibilita a inclusão do material genético viral na célula (Gray *et al.*, 2006).

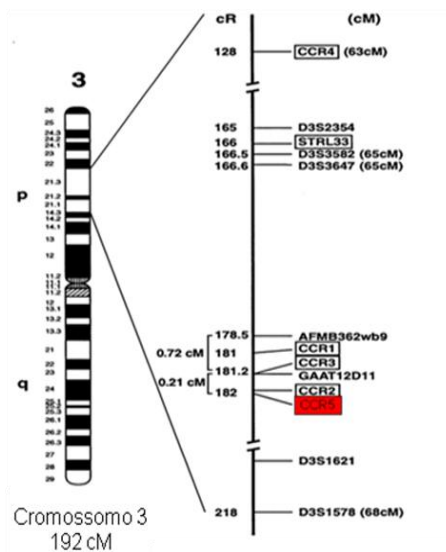


Figura 7: Localização do gene CCR5 no cromossomo 3 (adaptado de Stephens *et al.*, 1998).

São várias as evidências que apontam para o surgimento da mutação de deleção de 32 pares de base oriundo de um evento único e de forma isolada. Mutações com esta extensão possuem uma probabilidade muito baixa de ocorrerem, de forma que uma reincidência deste evento em um período de mil anos é extremamente improvável (Galvani & Novembre, 2005). O modelo mais aceito de dispersão desta mutação aponta para um início no norte da Europa em um claro gradiente norte-sul e ocorrendo em uma época que coincide com as migrações dos Vikings (Lucotte, 2001), com estimativa de aparecimento de cerca de 700 anos atrás (Galvani & Slatkin, 2003).

A atual dispersão do alelo com a deleção pode ser reflexo de uma seleção negativa iniciada com o processo de expansão do império romano (Faure & Royer-Carensi, 2008). É provável que essa mutação estivesse associada à capacidade

adaptativa das populações antepassadas da Europa a infecções por vírus endêmicos como, por exemplo, formas ancestrais de varíola (Novembre *et al.*, 2005).

Com relação à infecção pelo HIV, indivíduos que possuem a deleção em homozigose no gene *CCR5* apresentam uma probabilidade elevada de não desenvolverem a patologia, mesmo sendo portadores e transmissores do vírus (Gray *et al.*, 2006; Oswald-Richter *et al.* 2007). Indivíduos heterozigotos para a mutação, por sua vez, apresentam progressão mais lenta no desenvolvimento da infecção por HIV (Hladik *et al.*, 2005). Em contrapartida, populações que não apresentam esta mutação demonstram uma taxa muito reduzida de não desenvolvimento desta síndrome, sendo este o caso de muitas populações subsaarianas (Lucotte, 1999).

A forte resistência que a mutação em homozigose oferece não é, contudo, absoluta. Um número diminuto de indivíduos nesta condição foi diagnosticado como soropositivo em estudos do tipo caso-controle, sendo que parte considerável desta fração estava contaminada com uma variação do vírus mais propensa a infectar células por meio dos receptores CXCR4 (Oh *et al.*, 2008). Nestes casos, é possível que o vírus infecte monócitos e células dendríticas diferenciadas e permaneçam em latência por longos períodos, usando estas células como reservatórios (Coleman & Wu, 2009).

1.4 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano é composto por um conjunto de cerca de 200 *loci* situados no cromossomo *6p21.3* (Robinson *et al.*, 2003). Dentre esses genes, estão os genes dos antígenos leucocitários humanos, conhecidos como HLA, que apresentam especificidade e diversidade à interpretação molecular às infecções. Em determinados genes do HLA de classe I e de classe III, cujos produtos são elementos fundamentais na infecção e na sobrevivência do vírus no organismo infectado, mutações podem conferir um prognóstico desfavorável. Isso implica que os alelos de HLA destas classes modulam o processo infeccioso, influenciando na evolução do HIV, motivo pelo qual este grupo de genes vem sendo amplamente estudado (Kaslow *et al.*, 2001).

Entre a região de HLA de classe III e o HLA-B de classe I estão dois *loci* do fator de necrose tumoral humano (*TNF α* e *β*). Alelos do *TNF* estão em desequilíbrio de ligação com alelos do HLA de classe I e II, o que amplia as repercussões de estudos

envolvendo esses genes (Makhatadze, 1998). Foram descritos microssatélites situados dentro dos genes *TNF* que não afetam a regulação ou a estrutura destes (Jongeneel *et al*, 1991; Udalova *et al*, 1993). Estes microssatélites estão sendo vastamente utilizados para a análise do envolvimento dos TNFs nas patologias associadas ao MHC, assim como nos estudos de genética de populações (Oliveira, 2007; Deghaide *et al*, 2009).

O TNF- α e TNF- β são citocinas que estão envolvidas nas reações imunitárias celulares e inflamatórias. Foram identificados vários polimorfismos dentro ou ao redor do *locus TNF* e estudos indicam que estes polimorfismos têm relação com a produção da citocina TNF, que por sua vez apresenta mediação importante na resposta inflamatória (Hajeer & Hutchinson, 2000). Estas citocinas são produzidas por macrófagos e linfócitos ativados (Lund & Randall, 2010) e possuem função biológica complexa, relacionada com a concentração e duração da exposição ao TNF (Hajeer & Hutchinson, 2000). Em situação aguda, a produção local de TNF aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, permitindo que células imunes cheguem aos locais de inflamação e dano tecidual (Lund & Randall, 2010).

Os microssatélites, também identificados como sequências de repetições pequenas em tandem (do inglês STR), são marcadores genéticos caracterizados por um número não maior que seis pares de base que se repetem sequencialmente por um número reduzido de vezes, que devido a sua expressiva variedade alélica representam ferramentas importantes para o estudo em genética (Goldstein & Schlötterer, 2001). Por estas razões, o amplo espectro de informações que estes marcadores podem revelar, associado ao fato de não serem funcionais e, por isso, estarem menos sujeitos à seleção, posiciona os microssatélites como alvos importantes para o estudo em genética, identificação humana, construção de mapas genéticos, estudos populacionais e em análises de ligação.

Dentre os microssatélites descritos por Jongeneel *et al* (1991) e Udalova *et al* (1993), foram selecionados três, TNFc, TNFd e TNFe, para o presente trabalho (Figura 8).

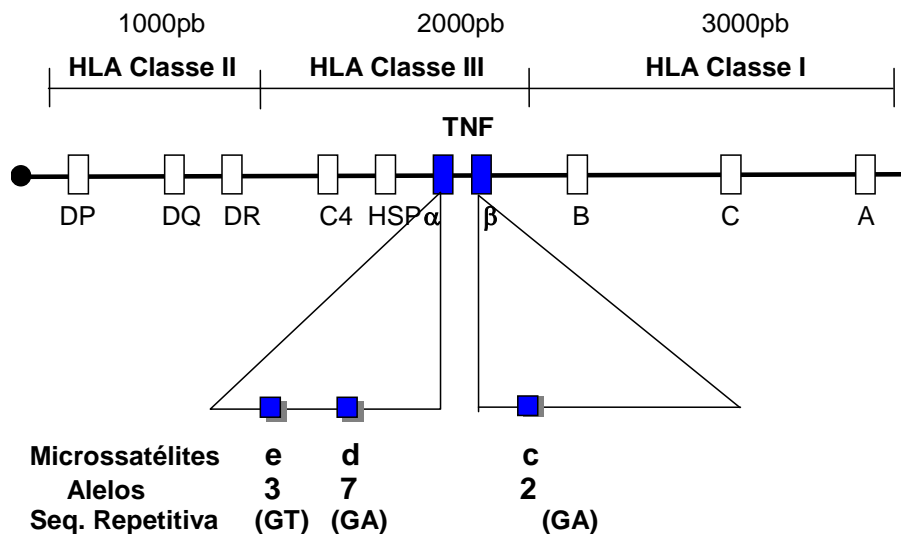


Figura 8: Representação do MHC no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Em destaque estão os microssatélites da região do gene TNF (modificado de Carvalho, 2004).

1.5 População do Distrito Federal

A República Federativa do Brasil possui 27 unidades federativas, dentre elas o Distrito Federal. Desde a conquista territorial da região política reconhecida como Brasil, povos de origens diversas ainda formam as identidades da população brasileira, advindos majoritariamente da Europa e da África, com contribuições importantes de povos ameríndios que aqui residiam e dos povos asiáticos (IBGE, 2000).

A rica história da atual população brasileira não necessariamente respeita os limites político-administrativos do Brasil contemporâneo, mas certamente guarda elementos valiosos para a compreensão de fatores genéticos importantes. Neste processo, a compreensão dos aspectos linguísticos, históricos, socioantropológicos na formação do povo brasileiro, juntamente com o conhecimento da constituição genética da população brasileira nos dá elementos para entender o processo de ocupação populacional das diferentes unidades federativas do país (Pena *et al*, 2002).

A história do povoamento e colonização do Distrito Federal inicia com os movimentos migratórios promovidos pelo governo à época da construção de Brasília. Como grande parte dos indivíduos que vieram trabalhar nos canteiros de obra instalados na nova capital era oriunda das regiões Nordeste e Sudeste, e visto que estes indivíduos já apresentavam miscigenação entre origens ancestrais de europeus e africanos – e em

menor proporção – de ameríndios, o processo de mistura se apresentou ainda mais complexo do que o observado em outras regiões do país (Palacín *et al*, 1995).

Embora a fundação do Distrito Federal seja recente, e de ainda se observar um intenso fluxo migratório para outros estados da região Centro-Oeste, sugere-se que não é possível se observar subestruturação populacional quando comparada a outras regiões do país (Godinho, 2008). Apesar da riqueza de formação da região Centro-Oeste brasileira, estudos envolvendo marcadores genéticos não neutros, como os marcadores relacionados à resistência a infecção pelo HIV-1, na população dessa região são ainda inexistentes.

2 OBJETIVOS

Em face dos problemas de saúde pública gerados pelo HIV, faz-se necessário o estudo, não apenas do processo etiológico da doença ou dos ciclos biológicos do vírus, mas também da variabilidade genética do hospedeiro e da potencial resistência do mesmo à infecção por este patógeno. Assim, para uma maior compreensão de como essa síndrome pode ser abordada, entende-se que pesquisas devem ser direcionadas para a avaliação da constituição genética da população em estudo.

Até o momento desse trabalho não existiam trabalhos de caracterização genética e genotípica para a região Centro-Oeste do Brasil sobre a frequência da mutação no gene *CCR5* e dos alelos e genótipos de marcadores genéticos associados ao HLA, *loci* esses descritos como associados à resistência ao HIV-1. O levantamento do perfil populacional quanto a estes marcadores é a primeira etapa para avaliação da associação entre estes marcadores e a resistência ao HIV-1 na população dessa região.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo a caracterização da população do Distrito Federal quanto à marcadores genéticos associados à resistência à infecção pelo vírus HIV-1.

Com base neste objetivo geral, teve-se por objetivos específicos:

- Avaliar a frequência gênica e genotípica da deleção de 32 pares de base no gene *CCR5*;
- Avaliação da frequência gênica e genotípica de três marcadores genéticos do tipo STR nos genes *TNFs* – TNFc, TNFd e TNFe;
- Produção e avaliação de haplótipo formado pelos marcadores do tipo STR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População amostrada: Distrito Federal

O Distrito Federal localiza-se no Planalto Central do Brasil e sua fundação foi em 21 de abril de 1960. Estima-se que sua população tenha alcançado 2.606.885 indivíduos em 2009 (IBGE, censo demográfico da população em 2000 e estimativas da população para 2009, disponível em www.ibge.gov.br, acessado em 18/11/2009). Ainda de acordo com o IBGE, estima-se que cerca de 50% dos habitantes nasceram na região Centro-Oeste e os demais são pessoas advindas de todas regiões do Brasil.

Administrativamente, na data da produção deste trabalho, é composto por 27 regiões (RAs), considerando-se o Lago Sul e o Lago Norte como regiões distintas. Entretanto, à época da coleta das amostras aqui analisadas, eram 19 regiões sendo que oito foram criadas desde então: Águas Claras (2003), Varjão (2003), Sudoeste/Octogonal (2003), Park Way (2003), Setor Complementar de Indústria e Abastecimento (2004), Sobradinho II (2004), Jardim Botânico (2004) e Itapoã (2005) (sítio da Companhia de Planejamento do Distrito Federal, <http://www.codeplan.df.gov.br/>, acessado em 18/11/2009).

Foram amostradas 10 das 19 regiões existentes em 2002, ano de coleta das amostras, conforme demonstrado na Tabela 1. A informação relativa à região administrativa onde habitavam os pais dos indivíduos amostrados por este estudo na época da coleta foi obtida durante a entrevista, dado esse que permitiu o agrupamento dos indivíduos por regiões. Seis indivíduos não forneceram a informação, principalmente por desconhecimento, ao passo que sete não souberam precisar a região exata e responderam apenas Brasília. Por outro lado, seis regiões não amostradas não existiam e não eram povoadas antes de 1986, época do nascimento dos indivíduos aqui amostrados, como Samambaia, (oficialmente fundada em 1989) e 1993, como Paranoá, Recanto das Emas, Riacho Fundo, Santa Maria e São Sebastião. Com relação a Brazlândia, essa é a região administrativa mais distante do Plano Piloto e não foi amostrada no presente trabalho. Candangolândia é a região administrativa menos povoada, representando aproximadamente 0,7% da população e também não contribuiu

com amostras para o presente estudo. A Figura 9 representa as regiões administrativas existentes à época da coleta.



Figura 9. Regiões Administrativas que compunham o Distrito Federal em 2002 (Fonte: <http://www.codeplan.df.gov.br>).

Tabela 1: Distribuição dos indivíduos amostrados pelas RAs.

Região administrativa	Número de indivíduos
Brasília	49
Ceilândia	04
Gama	03
Guará	09
Lago Norte	06
Lago Sul	01
Núcleo Bandeirante	02
Planaltina	08
Sobradinho	07
Taguatinga	10
Não informaram	06
Total	105

As amostras avaliadas neste projeto foram coletadas no Distrito Federal e a coleta e utilização do material foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília (registro 028/2001) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (registro 2932), conforme demonstrado no Anexo 2. Foi utilizado sangue venoso como material biológico, coletado com sistema a vácuo com EDTA como anticoagulante.

Foram analisadas 105 amostras, respeitando os critérios de: aleatoriedade, idade acima de 18 (dezoito) anos e não-parentesco. Todos os doadores foram voluntários e assinaram um termo de consentimento livre-esclarecido (TCLE, Anexo 3). A metodologia de amostragem foi realizada de forma estatisticamente representativa da população distribuída no Distrito Federal.

As amostras de material biológico e os dados foram coletados no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília e no curso preparatório para o vestibular “Alunos da UnB” (ALUB) no ano de 2002. Paralelamente à coleta de material biológico, foi feito um levantamento de dados demográficos utilizando um questionário (Anexo 4) respondido por todos os indivíduos que tiveram seu sangue coletado. O objetivo do questionário foi obter informações referentes a sexo, idade, ancestralidade, incluindo no mínimo uma geração ascendente, dentre outras.

3.2 Processamento das amostras e extração de DNA

As amostras de sangue venoso foram processadas e preparadas para estocagem logo após a coleta. O processamento é baseado em sucessivos processos de centrifugação e lavagem com solução salina com o objetivo de separar em três frações: plasma, fração leucocitária e hemácias. Em seguida, parte da fração leucocitária foi retirada e estocada. Todo o material foi devidamente identificado e conservado em freezer a 20°C negativos até o momento de uso.

A extração de DNA foi efetuada com a utilização do kit comercial GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit adquirido da *Amersham Pharmacia Biotech Inc* de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

3.3 Seleção dos marcadores genéticos

Foram selecionados marcadores com descrição na literatura de associação com resistência/susceptibilidade ao HIV-1. Os marcadores selecionados foram uma deleção de 32 pares de base no *locus CCR5* e dois microssatélites situados no *TNF α* , TNFe e TNFd, e um no *TNF β* , o TNFc (Figura 8). A variação em pares de base do tamanho dos fragmentos obtidos bem como as sequências iniciadoras utilizadas para amplificar os fragmentos de DNA para cada *locus* analisado estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição das sequências iniciadoras, usadas para amplificar os segmentos de DNA, dos *loci* analisados.

<i>Locus</i>	Sequências iniciadoras	Fragmentos em pb	Referências
CCR5	5'-ATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCCTC-3' 5'-AGTAGCAGATGACCATGACAAGCAGCGGCAG-3'	-	1
TNFC	5'-GGTTTCTCTGACTGCATCTTGTCC-3' 5'-TCATGGGGAGAACCTGCAGAGAA-3'	159-161pb	2
TNFd	5'-AGATCCTCCCTGTGAGTTCTGCT-3' 5'-CATAGTGGGACTCTGTCTCCAAAG-3'	124-136	2
TNFe	5'-GTGCCTGGTTCTGGAGCCTCTC-3' 5'-TGAGACAGAGGATAGGAGAGACAG-3'	98-102	2

(1) Martinson *et al.*, 1997; (2) Udalova *et al.*, 1993

3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os fragmentos de interesse foram amplificados via PCR por meio da utilização de iniciadores específicos. As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 13 µl para cada marcador. A cada conjunto de reações, foi incluído controle negativo, isto é, no lugar da amostra de DNA foi acrescentada água mili-Q. As concentrações dos reagentes utilizadas encontram-se no Anexo 1.

Os microssatélites de TNF (TNFC, TNFd, TNFe) foram amplificados no termociclador PTC – 100TM da MJ Research, Inc. O *locus* CCR5 foi amplificado no termociclador My CyclexTM thermal cyclex da Biorad. Para os *loci* TNFd e TNFe foi utilizado o mesmo programa. Para TNFC, após observado um baixo rendimento da PCR e seguindo orientação da empresa que produziu os iniciadores deste marcador, foi realizada uma adaptação, alterando de 61°C para 59°C a temperatura de pareamento, com o intuito de se obter um melhor desempenho da reação. Para o *locus* CCR5 foi utilizado um terceiro programa específico. As etapas de cada um destes programas estão descritas a seguir:

TNFD e TNFE

Etapa 1: 94°C por 5 minutos;
Etapa 2 (28 ciclos): 94°C por 1 minuto; 61°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto;
Etapa 3: 72°C por 10 minutos.

TNFe

Etapa 1: 94°C por 5 minutos;
Etapa 2 (28 ciclos): 94°C por 1 minuto; 59°C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto;
Etapa 3: 72°C por 10 minutos.

CCR5

Etapa 1: 94°C por 4 minutos;
Etapa 2 (30 ciclos): 94°C por 1 minuto; 70°C por 30 segundos, aumentando 1 segundo por ciclo;
Etapa 3: 72°C por 10 minutos.

3.3.2 Separação Eletroforética dos Produtos Amplificados

Em razão da pequena distância entre os diferentes alelos observados nos microssatélites, estes foram separados por eletroforese em condições desnaturantes. Para tanto, as amostras foram submetidas a um tratamento prévio, que consistiu na mistura de 5µl da amostra a ser analisada com 7µl de Tampão de Amostra, descrito no Anexo 1 contendo formamida 75%. Os microtubos contendo esta mistura foram aquecidos a 94°C por 10 minutos em termociclador. Após esta etapa, os tubos foram colocados em banho de gelo e as amostras imediatamente aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante 12%.

Os produtos da amplificação do *locus CCR5* foram submetidos à eletroforese não desnaturante e para tanto 5µl da amplificação de *CCR5* foram misturadas com 5µl do Tampão de Amostra e aplicados diretamente em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante, sem necessidade de tratamento prévio. Os géis de poliacrilamida desnaturantes 12% e não desnaturantes 10% foram preparados de acordo com o descrito no anexo 1.

As amostras e os padrões foram aplicados nos poços e as cubas foram ligadas às fontes de alta voltagem, com mili amperagem constante e tempo determinado para cada marcador. As condições específicas para a eletroforese dos produtos de cada um dos *locus* analisados estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Condições para eletroforese dos *loci* estudados.

<i>Locus</i>	Concentração do Gel (%)	Tamanho (cm)	Corrente (mA)	Tempo (h)
CCR5	10*	10	20	3:00
TNF-c	12**	10	20	3:00
TNF-d	12**	12	20	3:30
TNF-e	12**	10	20	3:00

*não desnaturante; **desnaturante

3.3.3 Nomenclatura Utilizada

Os alelos dos STRs de TNF e CCR5 foram designados segundo Udalova *et al* (1993) e Martinson *et al* (1997), respectivamente, de acordo com o número de repetições da subunidade presente, representado na Tabela 4:

Tabela 4: Características dos microsatélites (STRs) do gene TNF.

Marcador	CCR5*	TNFc**	TNFd**	TNFe**
Sequência Repetitiva	Deleção [#]	(GA) _n	(GA) _n	(GA) _n
Tamanho dos Fragmentos	Δ32	159-161	124-136	98-102
Número de alelos	2	2	7	3

*Martinson *et al.* **Udalova *et al.*, 1993. #Marcador inserção/deleção.

3.4 Análise dos dados

Os resultados obtidos foram organizados em tabelas e submetidos a análises estatístico-computadoriais com o uso de diferentes programas.

3.4.1 GENEPOP

Um dos aplicativos do GENEPOP permite analisar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, que é uma ferramenta importante nos estudos de genética de populações no que se aplica às análises de fatores evolutivos como mutações, seleção natural, deriva

genética e fluxo gênico de populações ou apenas a frequência genotípica pelo aumento da homozigose (Beiguelman, 2008).

Para se estabelecer a lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg é preciso imaginar uma situação teórica em que a população não esteja susceptível às variações dos diferentes fatores evolutivos ou fatores externos e internos que possam alterar o padrão de transferência gênica/genotípica. Assim, essa população teórica deve obedecer às seguintes premissas:

1. A população é infinita;
2. Existe o mesmo número de homens e mulheres na população;
3. A população está em panmixia, ou seja, todos casam de forma aleatória;
4. Todos os casais são igualmente férteis e geram o mesmo número de filhos;
5. Não existe a sobreposição de gerações na população;
6. Os genes da população não sofrem mutação;
7. A população não está sob pressão de seleção natural;
8. A população não recebe nem emite um fluxo gênico capaz de alterar a sua composição gênica original.

3.4.2 ARLEQUIN

O programa Arlequin, versão 3.1, é utilizado em genética de populações, oferecendo acesso a uma série de testes estatísticos partindo de um arquivo simples de banco de dados. Pode ser utilizado para métodos de estudos intra ou interpopulacional, partindo de dados genotípicos ou haplotípicos (Excoffier *et al*, 2006). O Arlequin foi utilizado para estimar a heterozigose dos *loci* estudados por meio do cálculo:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$$

3.4.3 PHASE

O programa PHASE implementa uma metodologia de estatística Bayesiana que possibilita a reconstrução de haplótipos a partir de dados genotípicos de uma população.

O programa foi desenvolvido para trabalhar com mutações pontuais (SNP), microssatélites e outros *loci* multi alélicos como, por exemplo, os de TNF.

Alelos de *loci* polimórficos que estão ligados fisicamente, ocupando pequena extensão cromossômica, formam haplótipos úteis para a inferência de histórias populacionais, bem como para estudos de associação com doenças. Este é o caso dos microssatélites autossômicos localizados no genes *TNF* (Udalova *et al.* 1993). Todavia, a técnica empregada para a análise laboratorial no presente trabalho impossibilita a determinação da fase em que os alelos se encontram, exceto nos casos em que os haplótipos possam ser reconstruídos automaticamente, isto é, quando os indivíduos se apresentam homozigotos em todos os *locus* ou heterozigotos em apenas 1 dos três *loci*. Sendo assim, aqueles que se apresentam heterozigotos em 2 ou mais *loci*, podem ter seus haplótipos reconstruídos apenas por outras formas de análise laboratorial ou computacional, através de modelos probabilísticos.

Para se determinar a constituição dos haplótipos de cada um dos 105 indivíduos, foi utilizado o método computacional Bayesiano implementado no software PHASE (Stephens *et al.* 2001). Este método de reconstrução da fase dos alelos genotipados utiliza-se de “*Gibbs sampling*”, que é um tipo de algoritmo MCMC (Cadeia de Markov - Monte Carlo), para se obter uma amostra aproximada a partir da distribuição posterior de haplótipos dado os genótipos $\Pr(H | G)$ (Stephens *et al.*, 2001).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização populacional

Para o *locus* *CCR5*, foi observado o alelo ancestral, identificado como *CCR5**1, e o derivado, identificado como *CCR5** Δ 32. Para os *loci* *TNF*, foram identificados dois alelos para *TNFC*, seis para *TNFd* e três para o *TNFe*, na população do Distrito Federal. O alelo 7 do *locus* *TNFd*, descrito na literatura, não foi observado nesta população. Não foram observados alelos novos e/ou raros para os marcadores analisados. As frequências alélicas e genotípicas obtidas da análise dos quatro marcadores estão listadas nas Tabelas 5 e 6.

As proporções fenotípicas observadas e esperadas demonstraram que todos os *loci* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Os valores das heterozigose esperadas e observadas para os marcadores em análise podem ser encontrados na Tabela 5. O p-valor, que representa a probabilidade de que a amostra poderia ter sido retirada de uma população assumindo que a hipótese nula seja verdadeira, onde quão mais próximo do valor 0 maior a chance de que a hipótese nula seja falsa, para os marcadores analisados estão presentes na tabela 5. *TNFd* foi o marcador que apresentou a maior heterozigose enquanto *CCR5* apresentou a menor heterozigose observada e esperada. Na Tabela 5 estão apresentadas também as frequências alélicas para as populações parentais – europeus, africanos e ameríndios – para efeito de comparação com a população aqui descrita. Não foram encontradas na literatura frequências para os *loci* *TNFC* em ameríndio, *TNFd* em africanos e *TNFe* em africanos e ameríndios.

4.2 Reconstrução haplotípica - *TNFC*, *TNFd* e *TNFe*

A reconstrução haplotípica a partir dos dados dos microssatélites *TNFC*, *TNFd* e *TNFe*, via programa PHASE, estimou em 22 haplótipos distintos para os 105 indivíduos do Distrito Federal analisados. A Tabela 7 apresenta os haplótipos e a frequência dos mesmos na população. O haplótipo 8 (1.3.3) se apresentou como o mais frequente, seguido pelo haplótipo 11.

Tabela 5: Fenótipos observados, valores de heterozigose observada e esperada, valores de p do teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg e respectivos desvios padrões com relação aos quatro marcadores autossômicos analisados para a população do Distrito Federal.

Fenótipos	Marcadores genéticos			
	CCR5	TNFC	TNFD	TNFE
1-1	95	87	-	-
1-2	9	17	1	2
2-2	1	1	2	-
1-3			3	17
2-3			9	5
3-3			20	81
1-4			3	
2-4			8	
3-4			30	
4-4			12	
2-5			1	
3-5			5	
4-5			9	
5-5			1	
4-6			1	
n	105	105	105	105
Heterozigose Obs.	0,0857	0,1619	0,6667	0,2286
Heterozigose Esp.	0,0997	0,1654	0,6844	0,2241
p-valor	0,2446	0,5938	0,8950	0,2458
Desvio padrão	0,0017	0,0023	0,0071	0,0035

Tabela 6: Frequências alélicas de CCR5 e TNFc, d e e na população do Distrito Federal, nas três populações parentais - europeus, africanos e ameríndios - e no Brasil.

Populações	Marcadores				Referências
	CCR5	TNFC	TNFd	TNF _e	
Distrito Federal					
<i>f</i> *1	0,9476	0,9095	0,0333	0,0905	Presente estudo
<i>f</i> *2	0,0524	0,0905	0,1095	0,0333	
<i>f</i> *3			0,4143	0,8762	
<i>f</i> *4			0,3571		
<i>f</i> *5			0,0810		
<i>f</i> *6			0,0048		
<i>f</i> *7			-		
N	105	105	105	105	
Europeus					
<i>f</i> *1	0,9319	0,6800	0,0440	0,1300	Libert <i>et al</i> , 1998; Freitas <i>et al</i> , 2006; Faure <i>et al</i> , 2008 Canedo <i>et al</i> , 2008
<i>f</i> *2	0,0681	0,3160	0,0470	0,0470	
<i>f</i> *3			0,1240	0,8220	
<i>f</i> *4			0,4320		
<i>f</i> *5			0,2780		
<i>f</i> *6			0,0560		
<i>f</i> *7			0,0180		
N	514	713	713	713	
Africanos					
<i>f</i> *1	0,9984	0,6428	ND	ND	Martinson <i>et al</i> , 1997 Tang <i>et al</i> , 2001
<i>f</i> *2	0,0016	0,3433			
N	598	604			
Ameríndios					
<i>f</i> *1	1	ND	0,0014	ND	Leboute <i>et al</i> , 1999 Oliveira, 2008 Hunemeier <i>et al</i> , 2005
<i>f</i> *2	-		0,0035		
<i>f</i> *3			0,5509		
<i>f</i> *4			0,1507		
<i>f</i> *5			0,2935		
<i>f</i> *6			-		
<i>f</i> *7			-		
N	888		713		
Brasil					
<i>f</i> *1	0,9666	0,6628	0,0747	0,1509	Grimaldi <i>et al</i> , 2002 Muxel <i>et al</i> , 2008 Vargas <i>et al</i> , 2006 Passos <i>et al</i> , 1998 Souza <i>et al</i> , 2006 Carvalhoes 1999 Biral <i>et al</i> , 2006 Deghaide <i>et al</i> , 2009 Rassi <i>et al</i> , 2006
<i>f</i> *2	0,0334	0,3372	0,0435	0,0148	
<i>f</i> *3			0,4262	0,8327	
<i>f</i> *4			0,3140		
<i>f</i> *5			0,1190		
<i>f</i> *6			0,0191		
<i>f</i> *7			0,0018		
N	1366	513	513	513	

(ND = dado não disponível).

Tabela 7: Haplótipos observados na população do Distrito Federal para os marcadores TNFc, TNFd e TNFe e frequência dos mesmos, com respectivo desvio padrão, estimado a partir da análise com o PHASE. A maior frequência observada está marcada com um retângulo.

Haplótipo	Alelos		Frequência	Desvio padrão
	TNFc, TNFd, TNFe			
1	1 1 1		0,004588	0,003452
2	1 1 3		0,028745	0,003452
3	1 2 1		0,013317	0,004584
4	1 2 2		0,002517	0,002377
5	1 2 3		0,093145	0,005326
6	1 3 1		0,031663	0,007450
7	1 3 2		0,004849	0,003418
8	1 3 3		0,348457	0,008651
9	1 4 1		0,026930	0,007063
10	1 4 2		0,020502	0,005767
11	1 4 3		0,256281	0,008898
12	1 5 1		0,004823	0,003287
13	1 5 2		0,003201	0,002881
14	1 5 3		0,065742	0,005953
15	1 6 3		0,004762	0,000000
16	2 2 1		0,001385	0,002163
17	2 2 3		0,003921	0,003365
18	2 3 1		0,003875	0,003883
19	2 3 3		0,030203	0,005515
20	2 4 1		0,003894	0,003580
21	2 4 2		0,001379	0,002160
22	2 4 3		0,029109	0,005702
23	2 5 2		0,000885	0,001852
24	2 5 3		0,015825	0,005373

5 DISCUSSÃO

As estratégias de terapias medicamentosas atuais contribuíram para um aumento na expectativa de vida de indivíduos com HIV. Em relatório divulgado pela UNAIDS em 2009 foi demonstrado que as terapias antirretrovirais salvaram cerca de 2,9 milhões de vidas desde que começaram a ser implementadas. Desde que o Brasil começou a financiar a distribuição dos medicamentos da terapia anti-HIV, por meio da política de licenciamento compulsório da patente de medicamentos antirretrovirais a partir de 1996, a epidemia sofreu uma redução progressiva na mortalidade embora a incidência continue aumentando (Dourado *et al*, 2006). A política de acesso universal à terapia estabelecida no Brasil garante que todos adquiram os fármacos anti-HIV, situação que, embora reconhecida pela OMS como referência no enfrentamento das consequências da pandemia, ainda encontra resistência para a implementação por envolver interesses econômicos importantes das indústrias farmacêuticas (Galvão, 2002). Existem mais de 30 milhões de indivíduos sobrevivendo com a AIDS no mundo, e a maioria não possui qualquer assistência farmacológica (UNAIDS, 2009).

A análise dos motivos pelos quais indivíduos respondem de formas diferentes no que diz respeito à infecção pelo HIV-1 é uma linha importante de estudos na compreensão desta síndrome. Mesmo que raros, quadros críticos de indivíduos que sobrevivem poucos anos com a patologia se contrapõem a situações em que indivíduos resistem por mais de 20 anos, mesmo que sem o auxílio de estratégias medicamentosas. É possível encontrar também indivíduos que foram expostos ao vírus e que mesmo depois de longos períodos não evoluíram para um quadro patológico agressivo, desenvolvendo uma sobrevida tranquila e semelhante em muitos aspectos a de um indivíduo não infectado pelo HIV-1. Porém, mesmo com a possibilidade de uma sobrevida maior, estas pessoas possuem uma carga viral relevante e, exatamente pela ausência dos sintomas relacionados à síndrome, acabam contribuindo para dispersão do vírus.

São diversas as correlações já realizadas entre fatores ambientais e genéticos no que diz respeito ao binômio vírus – indivíduo infectado. Dentre as abordagens encontram-se o estudo das moléculas responsáveis pela entrada do vírus na célula-alvo bem como a análise de marcadores relacionados à variabilidade da resposta imune do

hospedeiro. Neste trabalho, foi realizada análise das frequências gênicas e genotípicas dos *locus CCR5*, TNFc, TNFd e TNFe com intuito de determinar as frequências de seus alelos em uma amostra da população geral no Distrito Federal, isso é, não testada para a presença de HIV-1.

5.1 CCR5

O Brasil é um dos países com população mais heterogênea em termos de mistura genética. Em decorrência disso, alelos das mais diversas origens podem ser aqui encontrados. No caso da deleção no gene *CCR5*, de origem europeia, diversos estudos suportam a existência de um gradiente crescente na direção nortel/sul para o aumento da frequência desta mutação.

Na análise de trabalhos realizados em populações urbanas, é possível verificar uma frequência alélica para a deleção de 32 pares de base no gene *CCR5* de 6,57% para a deleção em Santa Catarina na região Sul do país (Grimaldi *et al*, 2002), valor próximo à frequência de 5,6% e 5,42% observada em dois estudos para população do Paraná (Reichi *et al*, 2008; Muxel *et al*, 2008). Ainda na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul, é possível encontrar uma frequência entre 6,6% e 6,4% em indivíduos que se declaram brancos ou morenos, respectivamente, diferente da frequência de 0,7% e 1,9% em indivíduos que se declaram negros nesse estado (Vargas *et al*, 2006). Em estudo realizado em uma população da região Sudeste, observou-se uma frequência de 3,5% para o alelo mutado (Passos *et al.*, 1998), próxima à encontrada em um estudo na mesma região que demonstrou uma frequência aproximada a 4,4% para a mutação (Carvalho, 2004). Análises em uma população de Salvador-BA, na região Nordeste, propõem uma frequência de 2,65% para a deleção (Grimaldi *et al*, 2002), valor semelhante aos 2,41% dispostos em trabalho com população de Recife-PE (Souza *et al*, 2006).

Em populações brasileiras com ancestralidade distinta a das regiões urbanas, a frequência se mostrou, em geral, inferior. Estudos com populações afro-derivadas (remanescentes de quilombo Rio das Rãs, Mocambo e São Gonçalo) do Nordeste brasileiro mostraram frequências de 2,46%, para a deleção (Carvalho *et al*, 2004). Populações ameríndias brasileiras apresentam ausência da mutação (Leboute *et al*, 1999; Martinson *et al*, 1997). Análise da tribo kaingang revelou uma frequência de 3%

do alelo CCR5* Δ 32, porém a presença desse alelo em tribos indígenas brasileiras deve ser em decorrência de uma miscigenação com europeus e/ou euro-descendentes (Hünemeier *et al*, 2005).

A análise destes trabalhos propõem a distribuição crescente do alelo mutado seguindo um gradiente norte-sul entre as populações urbanas, o que é coerente com a constituição genética da população brasileira, demonstrado na Figura 10.

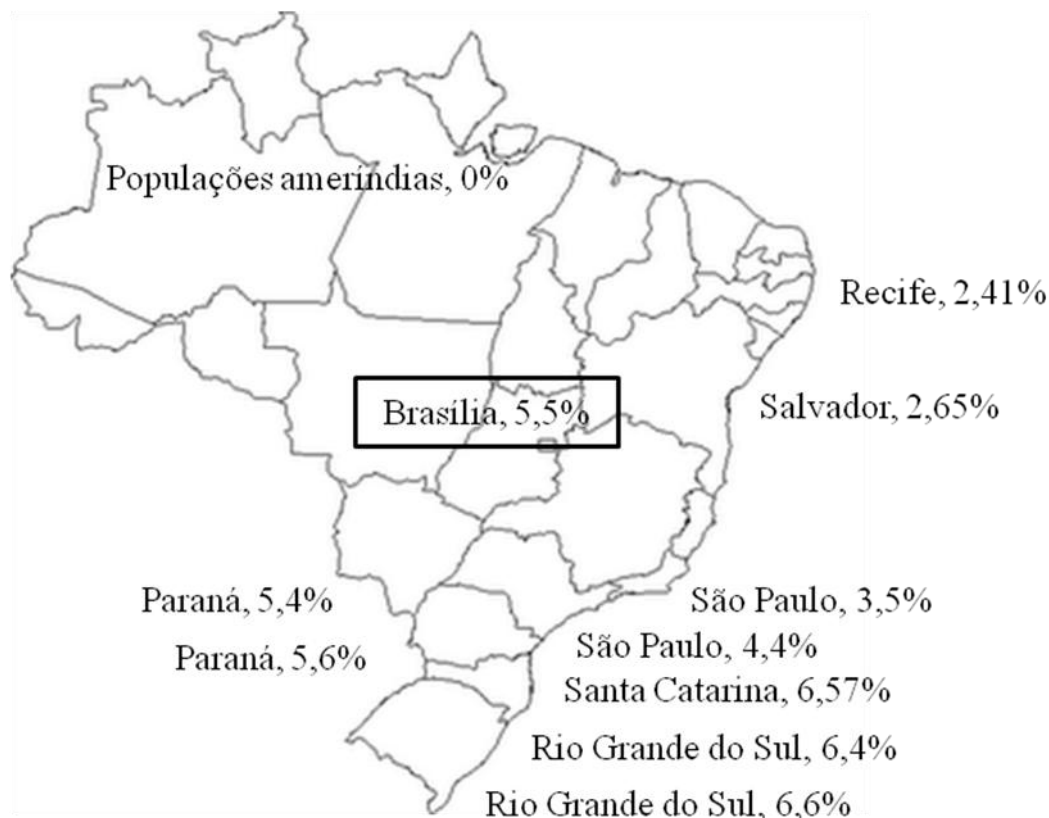


Figura 10: Distribuição de Δ 32 CCR5 no Brasil.

Os dados referentes à formação da população brasileira (IBGE, 2000) e os dados gerados sobre a miscigenação da população do Distrito Federal (Godinho, 2008) apresentam uma distribuição crescente de indivíduos euro-descendentes em uma frequência que aumenta no sentido norte – sul. No presente estudo, encontrou-se um indivíduo homocigoto para a deleção de 32 pares de base, nove heterocigotos para a mutação e 95 homocigotos para a condição selvagem do alelo, apresentando uma frequência de 5,5% para a mutação.

Desta forma, pode-se observar que a deleção de 32 pares de base do gene *CCR5* se apresenta como um bom marcador de ancestralidade, uma vez que sua distribuição é condizente com a distribuição dos indivíduos euro-descendentes pelo país e com o surgimento da mutação no norte da Europa, e é compatível com a visão de que a população do Centro-Oeste é como um resumo da população brasileira.

5.2 *TNFs*

O fator de necrose tumoral tem a função de aumentar a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e citocinas, de forma que células imune, como por exemplo neutrófilos e macrófagos, possam chegar aos locais de inflamação e do dano tecidual. Em situação de infecção aguda por HIV, este mecanismo de defesa indispensável em diversas condições patológicas arregimenta células do sistema imune que são alvo para o processo de infecção e ciclo celular do vírus. Portanto, uma forte resposta imunológica do organismo em um curto tempo acelera a produção de replicação do HIV, levando o indivíduo a um quadro infeccioso agudo. O polimorfismo em marcadores associados aos genes que expressam para citocinas pode modificar a velocidade e a intensidade da resposta imunológica, representando um possível fator de proteção ou susceptibilidade.

Estudos apontam para associação do alelo 2 de *TNFC* com uma progressão mais lenta para o processo infeccioso, uma vez que 60,9% dos indivíduos progressores lentos possuíam esse alelo em contraposição a 15% dos progressores rápidos portadores desta característica (Koo *et al*, 1997). Em estudo realizado com soropositivos e soronegativos africanos observou-se que o alelo 2 em homozigose era mais frequente tanto em indivíduos soronegativos de Ruanda quanto de Zâmbia, quando comparados com amostras de indivíduos soropositivos daqueles países (Tang *et al*, 2001). Em pesquisa realizada em São Paulo não foi observada uma diferença significativa na frequência do alelo 2 entre indivíduos soropositivos e soronegativos (Carvalho, 2004).

O presente estudo encontrou uma frequência para o alelo 2 de 9%, frequência essa menor do que os mais de 30% observados em populações africanas, europeias e do Sudeste brasileiro. A baixa frequência desse alelo no Centro-Oeste nos leva a propor que essa observação pode estar relacionada a maior contribuição ameríndia na constituição da população do Centro-Oeste em comparação com populações do Sudeste,

de acordo com os resultados obtidos em estudo com marcadores de ancestralidade para população do Centro-Oeste realizados por Godinho (2008). Todavia, a confirmação esta proposição só será possível com a obtenção de dados destes marcadores em populações ameríndias. A baixa frequência desse alelo pode ter como consequência uma maior probabilidade de susceptibilidade a uma infecção mais rápida na região. Esta relação só poderá ser confirmada realizando um estudo com este marcador para uma população soropositiva no Distrito Federal.

Com relação ao TNFd, as frequências observadas são semelhantes às descritas para população brasileira (Tabela 6). O alelo mais frequente na população do Distrito Federal, assim como nos estudos previamente realizados no Brasil (Deghaide *et al*, 2009), é o 3, que é também o mais frequente em ameríndios (Oliveira, 2007). O alelo 4, segundo mais frequente, é o mais frequente em europeus (Canedo, 2008). Não há dados desse marcador em populações africanas. Diferente de TNFc, não há um alelo descrito que confira maior resistência ou suscetibilidade à infecção. O alelo 7 não foi encontrado para a população do Distrito Federal, assim como não foi possível observá-lo para as populações ameríndias, seguindo a tendência deste alelo de ser o menos frequente nas populações parentais e nos resultados obtidos no Brasil comparados a este estudo.

O marcador TNFe apresentou o alelo 3 como o mais frequente. Esse alelo vem sendo descrito como o mais comum em todas as populações já analisadas até o momento (Tabela 6). Isoladamente, esse marcador também não é informativo.

Como já comentado, não foram encontradas na literatura frequências para os *loci* TNFc em ameríndio, TNFd em africanos e TNFe em africanos e ameríndios. Por esta razão não foi possível estimar a contribuição das populações parentais europeias, africanas e ameríndias na formação do Distrito Federal o que iria possibilitar a comparação dessas estimativas com outras previamente obtidas com outros marcadores genéticos. Essa comparação permitiria avaliar a utilidade desses marcadores para este tipo de estimativa de ancestralidade.

Todavia, os marcadores TNFd e TNFe, marcadores menos informativos quanto a resistência/susceptibilidade ao HIV-1 quando analisados isoladamente, são relevantes em estudos de associação com outras patologias. Os alelos 3 de TNFd e TNFe são citados na literatura como associados à proteção à artrite reumatoide (Mulcahy *et al*, 1996) e doença cardíaca em pacientes com doença de Chagas (Campelo *et al*, 2007).

5.3 Haplótipos TNFs

No presente trabalho, o haplótipo 8 (TNFc1, TNFd3, TNFe3) apresentou-se como o mais comum (Tabela 7), sendo observado em 34% das projeções estatísticas realizadas. Esse é o haplótipo mais comum já descrito e está relacionado com suscetibilidade à infecção pelo HIV-1. Em estudo realizado em grupos soropositivos e soronegativos em São Paulo (Carvalho, 2004) foi observado que o haplótipo TNFc1, TNFd3 e TNFe3 não confere resistência, mas sim, susceptibilidade ao HIV/AIDS. Considerando que os alelos que conferem resistência são menos frequentes do que os que não conferem, já era esperado que o haplótipo que não confere resistência fosse o mais comum. O segundo haplótipo mais frequente é o formado por TNFc1, TNFd4, TNFe3, presente em 25% das projeções realizadas e, significativamente, diferente da proporção em que se encontra o haplótipo mais frequente, considerando os desvios-padrão de 0,86% para o haplótipo mais frequente e 0,88% para o segundo mais frequente observados.

Os microssatélites de TNF são informativos no estudo de uma série de patologias. Biral *et al* (2006) analisou o polimorfismo destes marcadores associado ao desenvolvimento de *psoriasis vulgaris*, Rassi *et al* (2006) desenvolveu um estudo de associação destes marcadores com Diabetes Mellitus tipo 1 e um estudo sobre associação destes com AIDS e retinite causada por citomegalovirus em indivíduos soropositivos foi desenvolvido por Deghaide *et al* (2009). A lista de estudos de associação se estende também por doenças autoimunes (Lipsitch *et al*, 2003).

Para melhor compreensão da possível associação dos marcadores abordados neste trabalho com estas patologias e com a infecção pelo HIV é necessário o estudo destes marcadores em grupos de indivíduos que possuam estas patologias no Distrito Federal.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este trabalho e a comparação com a literatura possibilita concluir:

1. A frequência da deleção de 32 pares de base no gene *CCR5*, associada à resistência a infecção pelo HIV-1, encontrada na população do Distrito Federal acompanha a distribuição desta mutação no Brasil, o que reforça a utilização deste como marcador de ancestralidade.
2. O alelo 1 de TNFc descrito como associado à maior susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 foi encontrado em maior frequência na população do Distrito Federal, sendo essa a maior frequência descrita até o momento para esse alelo.
3. O haplótipo descrito como relacionado a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento mais rápido da infecção pelo HIV-1, formado por TNFc*1, TNFd*3 e TNFe*3, foi encontrado em maior frequência no Distrito Federal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, AK; Lichtman, AH. (2005) **Cellular and molecular immunology**. Ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Barouch, DH. (2008) **Challenges in the development of an HIV-1 vaccine**. *Nature*, 455, 613-619.
- Beiguelman, B. (2008) **Genética de populações humanas**. Ed. SBG, Ribeirão Preto - SP.
- Bieniasz, PD. (2009) **The Cell Biology of HIV-1 Virion Genesis**. *Cell Host & Microbe*, Vol. 5, 550-558.
- Biral, AC; Magalhães, RF; Wastowski, IJ; Simões, R; Donadi, EA; Simões, AL; Mendes-Júnior, CT; Tanaka, AM; Kraemer, MHS. **Association of HLA-A, -B, -C genes and TNF microsatellite polymorphism with psoriasis vulgaris: a study of genetic risk in Brazilian patients**. *Eur J Dermatol* 16 (5): 523-9.
- Bonfim, TF. (2008) **Ancestralidade genômica em uma amostra de portadores do HIV-1 do Estado da Bahia**. Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ - BA
- Carrington, M; O'Brien, SJ. (2003) **The influence of HLA genotype on aids**. *Annual Review of Medicine*, Vol. 54: 535-551.
- Campelo, C; Dantas, RO; Simões, RT; Mendes-Junior, CT; Sousa, SMB; Simões, AL; Donadi, EA (2007) **TNF Microsatellite Alleles in Brazilian Chagasic Patients**. *Dig Dis Sci* 52:3334–3339.
- Canedo, P; Durães, C; Pereira, F; Regalo, G; Lunet, N; Barros, H; Carneiro, F; Seruca, R; Rocha, J; Machado, J. (2008) **Tumour Necrosis Factor Alpha Extended Haplotypes and Risk of Gastric Carcinoma**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(9) 2416-2420.
- Carvalhoes, FALP; Carvalho, MIM; Guerreiro JF. (1999) **A mutação CCR5-delta 32 em populações humanas da Amazônia**. 45º Congresso Nacional de Genética, Gramado-RS, Brasil.
- Carvalho, MWP; (2004) **Polimorfismos Genéticos em Indivíduos Infectados e não Infectados por HIV-1 em uma Amostra da População Brasileira**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP.

- Carvalho, MWP; Leboutte, AOM; Oliveira, SF; Souza, SMB; Klautau-Guimarães, MN; Simões, AL. (2004) **CCR5D32 mutation in three Brazilian population of predominantly Sub-Saharan African ancestry.** *Genetics and Molecular Biology*, Vol 27, 321-325.
- Centers for Disease Control. (1981) **Pneumocystis pneumonia.** Los Angeles, *MMWR*, 30:1-3
- Chakraborty R. (1986) **Gene admixture in human populations: Models and predictions.** *Am J Phys Anthropol.* 29: 1-5.
- Chies, JAB; Hutz, MH. (2003) **High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* Vol 36: 71-75.
- Coleman, M; Wu, L. (2009) **HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs.** *Retrovirology*, 6:51.
- De Medina, M; Fletcher, MA, Valledor, MD; Ashman, M; Gordon, AM, Schiff, ER. (1987) **Serological evidence for HIV infection in Cuban immigrant in 1980.** *Lancet* 18;2(8551):166.
- Damond, F; Worobey, M; Campa, P; Farfara, I; Colin, G; *et al.* (2004) **Identifications of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification.** *AIDS Research Human Retroviruses* 20:666-672.
- Deghaide, NHS; Rodrigues, MLV; Castelli, EC; Mendes-Júnior, CT; Figueiredo, JFC; Donadi, EA. (2009) **Tumor necrosis factor region polymorphisms are associated with AIDS and with cytomegalovirus rinitis.** *Aids*, 23: 1641-1647.
- Dourado, I; Veras, MA; Barreira, D. (2006) **Tendências da epidemia de AIDS no Brasil após a terapia anti-retroviral.** *Revista de Saúde Pública*, Vol 40, 9-17.
- Excoffier, L; Laval, G; Schneider, S. (2006). **Arlequin ver 3.1 An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis.** *Computational and Molecular Population Genetics Lab*, University of Berne Bern – Switzerland.
- Faure, E; Royer-Carenzi, M. (2008) **Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?** *Infection, Genetics and Evolution* 8: 864-874.
- Freitas, T; Brehm, A; Fernandes, AT. (2006) **Frequency of the CCR5-Δ32 Mutation in the Atlantic Island Populations of Madeira, the Azores, Cabo Verde, and São Tomé e Príncipe.** *Human Biology* *Biology* 78 (6) 697-703.

- Frenkel, JK. (1999) **Pneumocystis pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview.** *J Eukaryot Microbiol*; 46:89S-92S.
- Galvani, AP; Novembre, J (2005) **The evolutionary history of the CCR5-D32 HIV-resistance mutation.** *Microbes and Infection* 7:302-309.
- Galvani, AP; Slatkin, M. (2003) **Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5-Δ32 HIV-resistance allele.** *PNAS* 100(25), 15276–15279.
- Galvão, J. (2002) **A política brasileira de distribuição e produção de medicamentos anti-retrovirais: privilégio ou um direito?** *Cadernos de Saúde Pública*, 18 213-219.
- Gao, F; Bailes, E; Robertson, DL; Chen, Y; Rodenburg, CM; *et al.* (1999) **Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*.** *Nature* 397:436-441.
- Godinho, NMO. (2008) **O Impacto das Migrações na Constituição Genética de Populações Latino-Americanas.** Tese de doutorado. Universidade de Brasília. Brasília, DF.
- Goldstein, DB; Schlötterer. (2001) **Microsatellites: Evolution and Applications.** Ed. Oxford University press, Oxford.
- Gray, L; Churchill, MJ; Keane, N; Sterjovski, J; Ellett, AM; Purcell, DFJ; Pombourios, P; Kol, C; Wang, B; Saksena, NK; Wesselingh, SL; Price, P; French, M. (2006) **Genetic and Functional Analysis of R5X4 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins Derived from Two Individuals Homozygous for the CCR5_32 Allele.** *Journal of Virology*, p. 3684–3691.
- Grimaldi, R; Shido, N; Acosta, AX; Dourado, I; Brites, C; Carvalho, OM; Brito, I; Bou-Habib, DC; Galvão-Castro, B. (2002) **Prevalence of CCR5 Δ32 mutation in Brazilian population and cell susceptibility to HIV-1 infection.** *Hum Genet* 111: 102-104.
- Hajeer, AH.; Hutchinson, IV. (2002) **TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications.** *Microsc Res Tech*, v. 50, n. 3, p. 216-228, 2000.
- Higuchi, R; Erlich, H. (1989) **Simple and rapid preparation of samples for PCR.** **In PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Ed. New York: Stockton Press, 31-38.**

- Hirsch, VM; Olmsted, RA; Murphy-Corb, M; Purcell, RH; Johnson, PR. (1989) **An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2.** *Nature* 339:389-392.
- Hladik, F; Liu, H; Speelman, E; Livingston-Rosanoff, D; Wilson, S; Sakchalathorn, P; Hwangbo, Y; Greene, B; Zhu, T; McElrath, MJ. (2005) **Combined Effect of CCR5-Delta 32 Heterozygosity and the CCR5 Promoter Polymorphism 2459 A/G on CCR5 Expression and Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission,** *Journal of Virology*, 79(18), 11677-11684.
- Hünemeier, T; Neves, AG; Nornberg, I; Hill, K; Hurtado, AM; Carnese AR, FR; Goicoechea, AS; Hutz, MH; Salzano, FM; Chies, JAB. (2006). **T-Cell and Chemokine Receptor Variation in South Amerindian Populations.** *American Journal of Human Biology* Vol 17:515–518.
- IBGE (2000) **Brasil: 500 anos de povoamento.** *CDDI*, Rio de Janeiro-RJ.
- Jongeneel, CV; Briant, L; Udalova, IA; Sevini, A; Nedospasov, SA; Thomsen, AC. (1991) **Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 88, pp. 9717-972.
- Kaslow, RA; Rivers, C; Tang, J; Bender, TJ; Goepfert, PA; Habibi, RE; Weinhold, K; Mulligan, MJ. (2001) **Polymorphisms in HLA Class I Genes Associated with both Favorable Prognosis of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Infection and Positive Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to ALVAC-HIV Recombinant Canarypox Vaccines,** *Journal of Virology*, 75(18), 8681-8689.
- Keele BF; Van Heuverswyn F; Li Y; Bailes E; Takehisa J; Santiago ML; Bibollet-Ruche F; Chen Y; Wain LV; Liegeois F; Loul S; Ngole EM; Bienvenue Y; Delaporte E; Brookfield JF; Sharp PM; Shaw GM; Peeters M; Hahn BH. (2006) **Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.** *Science*; 28:313:523–6.
- Klimas, K; Koneru; AO; Fletcher, MA. (2008) **Overview of HIV.** *Psychosomatic Medicine.* 70:523–530.
- Kilmarx PH. (2009) **Global epidemiology of HIV.** *Curr Opin HIV AIDS* 4(4):240-6.
- Khoo, SH; Pepper, L; Sowden, N; Hajeer, AH; Vallely, P; Wilkins, EGL; Mandal, BK; Ollier, WER. (1997) **Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression.** *AIDS*, 11:423-428.

- Kwiatkowski, D. (2000) Susceptibility to infection. *BMJ*, 2000, 321:1061–5. Libert, F; Cochaux, P; Beckman, G; Samson, M; Aksenova, M; Cao, A; Czeizel, A; Claustres, M; Rúa, C; Ferrari, M; Ferrec, C; Glover, G; Grinde, B; Güran, S; Kucinskas, V; Lavinha, J; Mercier, B; Ogur, G; Peltonen, L; Rosatelli, C; Schwartz, M; Spitsyn, V; Timar, L; Beckman, L; Parmentier, M; Vassart, G. (1998) **The Δ ccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe.** *Human Molecular Genetics* Vol 7(3) 399-406.
- Leboute, APM; Carvalho, MWP; Simões, AL. (1999) **Absence of the Δ ccr5 mutation in the indigenous population of the Brazilian Amazon.** *Human Genetic* 105: 442-443.
- Lipsitch, M; Bergstrom, CT and Antia, R. (2003) **Effect of human leukocyte antigen heterozygosity on infectious disease outcome: The need for allele-specific measures.** *BMC Medical Genetics*, 4:2 doi:10.1186/1471-2350-4-2.
- Lucotte, G. (2001) **Distribution of the CCR5 Gene 32-Basepair Deletion in West Europe. A Hypothesis About the Possible Dispersion of the Mutation by the Vikings in Historical Times.** *Human Immunology* 62, 933–936.
- Lucotte, G. (1999) **Frequencies of the CC chemokine receptor 5 Δ 32 allele in various populations of defined racial background.** *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 51(10), 469-473.
- Lund, FE; Randall; TD. (2010) **Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity.** *Nature Reviews Immunology* doi: 10.1038/nri2729
- Makhatadze, NJ; (1998) **Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications.** *Hum Immunol* 59(9):571-9.
- Marmor, M; Hertzmark, K; Thomas, SM; Halkitis, PN; Vogler, M. (2006) **Resistance to HIV Infection.** *Journal of Urban Health*, Vol. 83 10.1007.
- Martinson, JJ; Chapman, NH; Rees, DC; Liu, YT; Clegg, JB. (1997) **Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion.** *Nat Genet* 16(1):100-103.
- Moore, JP; Doms, RW. (2003) **The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine.** *Proc Natl Acad Sci.* 16; 100(19): 10598–10602.
- Muxel, SM; Borelli, SB; Amarante, MK; Voltarelli, JC; Aoki, MN; Oliveira, CEC; Watanabe, AE. (2008) **Association Study of CCR5 Delta 32 Polymorphism Among the HLA-DRB1 Caucasian Population in Northern Pará, Brazil.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 22: 229-233.

- Narayan, O; Clemens, JE. (1989) **Biology and Pathogenesis of Lentiviruses** *J. gen. Virol*, Vol. 70, 1617-1639.
- Novembre, J; Galvani, AP; Slatkin, M. (2005) **The geographic spread of the CCR5 D32 HIV-resistance allele.** *PLoS Biol*; 3(11): e339.
- Oh, D-Y; Jessen, H; Kücherer, C; Neumann, K; Oh N, *et al.* (2008) **CCR5D32 Genotypes in a German HIV-1 Seroconverter Cohort and Report of HIV-1 Infection in a CCR5D32 Homozygous Individual.** *PLoS ONE* 3(7): e2747.
- Oliveira, LA. (2007) **Diversidade Populacional de Microssatélites no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em Populações Indígenas do Paraná e do Mato Grosso do Sul.** Dissertação de Mestrado, Curitiba – Paraná.
- Oswald-Richter, K; Grill, SM; Leelawong, M; Tseng, M; Kalams, SA; Hulgán, T; Haas, DW; Unutmaz, D. (2007) **Identification of a CCR5-Expressing T Cell Subset That Is Resistant to R5-Tropic HIV Infection.** *Plos Pathog*; 3(4): e58; 553-565.
- Palacín, L; Garciam LF; Amado, J. (1995) **História de Goiás em documentos: Colônia.** Editora UFG. Goiânia, GO; 122.
- Passos, GAJr; Picanco, VP. (1998) **Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population.** *Immunol Lett* 61(2-3):205-207.
- Pedersen, BR; Kamwendo, D; Blood, M; Mwapasa, V; Molyneux, M. (2007) **CCR5 Haplotypes and Mother-to-Child HIV Transmission in Malawi.** *PLoS ONE* 2(9): e838.
- Pena, SDJ. (2002) **Homo brasilis: Aspectos Genéticos, Linguísticos, Históricos e Socioantropológicos da Formação do Povo Brasileiro.** Ed. FUNPEC, Ribeirão Preto.
- Pritchard, JK; Przeworski, M. (2001). **Linkage disequilibrium: Models and Data.** *Am J. Hum. Genet.* 69:1-14.
- Rassi, DM; Wastowski, IJ; Simões, RT; Rodrigues, S; Deguaide, NNHS; Mendes-Júnior, CT; Simões, AL; Soares, CP; Passos, GAS; Donadi, EA. (2006) **TNF α -e Microsatellite, HLA-DRB1 and -DQB1 Alleles and Haplotypes in Brazilian Patients Presenting Recently Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1079: 300–304.
- Reichi, EMV; Watanabe, MAE; Bonametti, AM; Morimoto, HK; Morimoto, AA; Wiechmann, SL; Matsuo, T; Oliveira, JC; Reichi, FV. (2008) **Frequency of**

CCR5 Δ32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)

International Journal of Molecular Medicine 22: 669-675.

- Robinson, J; Waller, MJ; Parham, P; Groot, N; Bontrop, R; Kennedy, LJ; Stoehr, P; Marsh, SGE. (2003) **IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex.** *Oxford University Press Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 1 311–314.
- Rodrigues, MLV; Figueiredo, JFC; Deghaide, NHS; Roma, E; Souza, NV; Donadi, EA. (2003) **Frequency of HLA class 1 and 2 alleles in Brazilian patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis.** *Acta Ophthalmol*, 81: 514–516.
- Rothenberg R. (2009) **HIV transmission networks.** *Curr Opin HIV AIDS*, 4(4):260-5.
- Rousset F: (2007) **GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux.** *Molecular Ecology Resources*, 8:103-106.
- Sorrentino, AH; Marinic, K; Motta, P; Sorrentino, A; Lopez, R; Illioovich, E. (2000) **HLA Class I Alleles Associated with Susceptibility or Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection among a Population in Chaco Province, Argentina.** *JID*;182.
- Souza, PR; Arraes, LC; Lima Filho, JL; Brunaska, D; Milanese, Crovella, S (2006) **CCR5 promoter polymorphis and HIV-1 perinatal transmission in Brazilian children.** *Journal of Reproductive Immnology* 69, 77-84.
- Stephens, JC; Reich, DE; Goldstein, DB; Shin, HD; Smith, MW; Carrington, M; Winkler, C; Huttley, GA; Allikmets, R; Schriml, L; Gerrard, B; Malasky, M; Ramos, MD; Morlot, S; Tzetis, M; Oddoux, C; di Giovine, FS; Nasioulas, G; Chandler, D; Aseev, M; Hanson, M; Kalaydjieva, L; Glavac, D; Gasparini, P; Kanavakis, E; Claustres, M; Kambouris, M; Ostrer, H; Duff, G; Baranov, V; Sibul, H; Metspalu, A; Goldman, D; Martin, N; Duffy, D; Schmidtke, J; Estivill, X; O'Brien, SJ; Dean, M. (1998) **Dating the Origin of the CCR5-D32 AIDS-Resistance Allele by the Coalescence of Haplotypes.** *Am. J. Hum. Genet.* 62:1507–1515.
- Szajerka, T; Jablęcki, J. (2007) **Kaposi's sarcoma revisited.** *AIDS Reviews*, (9) 230-236. Tang, J; Tang, S; Lobashevsky, E; Myracle, AD; Fideli, U; Aldrovandi, G; Allen, S; Musonda, R; Kaslow, RA; the Zambia-UAB HIV Research Project. (2002) **Favorable and Unfavorable HLA Class I Alleles and Haplotypes in**

- Zambians Predominantly Infected with Clade C Human Immunodeficiency Virus Type 1.** *Journal of Virology*, p. 8276–8284.
- Tang, J; Myracle, AD; Allen, S; Karita, E; Musonda, R; F, PN; Kaslow, RA. (2001). **Novel Alleles at the Lymphotoxin Alpha (LT α) Locus Mark Extended HLA Haplotypes in Native Africans.** *Human Immunology* 62, 269-278.
- Temin, HM. (1993). **Retrovirus variation and reverse transcription: Abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 90, 6900-6903.
- Udalova, IA; Nedospasov, SA; Webb, GC; Chaplin, DD; Turetskaya, RL. (1993) **Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers.** *Genomics* 16(1):180-6.
- UNAIDS. (2009). **AIDS Epidemic Update.** *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data* 09.36E / JC1700E.
- Vargas, AE; Marrero, AR; Salzano, FM; Bortolini, MC; Chies, JAB. (2006) **Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations.** *Braz J Med Biol Res*, 39(321-325).
- Watts, JM; Dang, KK; Gorelick, RJ; Leonard, CW; Bess Jr, JW; Swanstrom, R; Burch, CL; Weeks, KM. (2009) **Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome.** *Nature*, (6):Vol 460 711-716.
- Wertheim, JO; Worobey, M. (2009) **Dating the age of the SIV lineages that give rise HIV-1 and HIV-2.** *PloS Comput Biol* 5(5): e1000377.

ANEXO 1. Protocolos dos procedimentos laboratoriais

1- Processamento do material biológico

As amostras foram coletadas em tubos a vácuo estéreis indentificados, mantidos em gelo durante o transporte até o Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. O processamento das amostras se deu com a separação do fluído em 3 frações distintas (plasma, fração leucocitária e hemácias) através de repetidas centrifugações e lavagens em solução salina.

As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por cinco minutos para garantir a separação do sangue. Inicialmente, o plasma foi retirado e estocado em microtubo para posterior análise de proteínas séricas e como possível fonte de DNA residual. A fração leucocitária foi separada e estocada para posterior extração de DNA. A fração final contendo hemácias foi lavada três vezes com solução salina 0,9% e após a última centrifugação foi estocado em tampão glicerol 40% em citrato tripotássio (0,1M, KH₂PO₄ 0,0345M, K₂HPO₄ 0,0344M) para análise de proteínas eritrocitárias e, se necessário, fonte para extração de DNA residual. Todas as frações foram identificadas e estocadas a -20°C.

2- Extração de DNA

2.1. Método “Salting Out”

Um volume inicial de sangue de 200 µl em 200 µl de tampão (*Buffer A*) resfriado foi centrifugado a 5.000 rpm durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 150 µl de tampão (*Buffer B*). À solução, foi adicionado 20 µl de SDS 10% e 2,2 µl de proteinase K (10mg/ µl), que então foi incubada a 55°C por 1h30 min.

Após a incubação, foi adicionada uma quantidade de NaCl saturado (6 M) que variou de 65 a 80 µl, para que então o tubo fosse centrifugado a 9.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 µl, ao qual foi adicionado 467 µl de isopropanol. A solução foi então agitada até e centrifugada a 11.000 rpm durante 4 minutos.

O etanol foi então descartado e a solução foi deixada para secagem à temperatura ambiente. O material depositado no fundo do tubo foi ressuscitado em 50 µl de TE (1X – pH 8,0) e então incubado 73 °C por uma hora.

2.2. “GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit” – Pharmacia

Em um tubo de microcentrífuga, foram adicionados 300 µl da amostra de sangue e três volumes da solução de lise pré-aquecido a 70°C, homogeneizando-se, por inversão do tubo. O sistema foi incubado à temperatura ambiente durante cinco minutos e, posteriormente, submetido à centrifugação em alta rotação (12.000 rpm) por vinte segundos. O sobrenadante foi removido, por aspiração, tomando-se o cuidado para não atingir o aglomerado de células brancas. Um líquido residual de 20-50 µl foi aproveitado para ressuspensão das células.

Após a ressuspensão completa das células brancas, foram adicionados 500 µl de solução de extração, homogeneizando-se vigorosamente. Em seguida, foi realizada uma incubação em temperatura ambiente durante cinco minutos.

O sistema de extração foi transferido para uma coluna GFX, sendo que, após a centrifugação, o volume do tubo coletor foi mais uma vez descartado. Em seguida, foram adicionadas à coluna GFX 500 µl de solução de lavagem para nova centrifugação em alta rotação (12.000 rpm), duração 3 minutos. O fluxo foi descartado e coluna transferida para um novo tubo coletor.

Após a adição de 100-200 µl de água mili-Q (pré-aquecida) à coluna GFX, os sistemas foram incubados em temperatura ambiente durante 60 segundos e centrifugados a 8.000 rpm, por igual tempo, para a recuperação do DNA purificado.

3- Reação em Cadeia da Polimerase

3.1. Reagentes e soluções:

Amostras de DNA genômica (50 ng/ µl)

Tampão de reação (Tris/HCL 0,2 M pH 8,5; KCL 0,5 M; MgCl₂ 0,02 M)

Solução de dNTP 20nM

Taq DNA Polimerase

Solução de trabalho dos iniciadores (10 µM):

Os iniciadores foram diluídos com água mili-Q esterilizada para uma concentração de 50 µM utilizando-se para base de cálculo a quantidade de nano moles obtidos na síntese destes. Uma alíquota de 100 µl de iniciadores diluídos foi então depositada em tubo, para serem estocados em freezer (-20°C) até o momento do uso.

Para uso durante os procedimentos de PCR, prepararam-se soluções de trabalho com os dois iniciadores necessários para a amplificação de cada região genômica selecionada, na concentração de 10 μ M de cada iniciador. A mistura do mix apresenta as seguintes concentrações:

- . 8,8 μ l de água deionizada, autoclavada
- . 1,3 μ l de tampão de reação (10X), fornecido com a enzima
- . 1,3 μ l de solução de dNTP (20mM)
- . 1,0 μ l de cada iniciador, específico para cada *locus* (10mM)
- . 0,4 μ l de DMSO P.A. a 10%
- . 0,2 μ l da enzima Biotools DNA polimerase ou similar (5 unidades)

Uma alíquota de 1 μ l de cada amostra do DNA genômico não quantificado e descongelado foi distribuída em microtubos de 500 μ l, devidamente identificados, antes de serem aquecidos no termociclador, por 10 minutos, a 94°C. Uma vez realizada esta fase, foram adicionados 13 μ l da mistura de reação da PCR e imediatamente submetidos à programação específica de cada marcador a ser analisado.

Uma mistura de reagentes da PCR suficientes para o número de indivíduos em análise (conforme item 2.1 deste anexo) foi adicionado ao microtubo que continha o DNA do indivíduo a ser analisado para cada sistema. Óleo mineral foi adicionado aos microtubos no final do procedimento, para que então fossem levados à máquina de PCR com o programa correspondente a cada sistema.

4- Procedimentos para Eletroforese – Análise do produto de PCR

4.1 Gel de Poliacrilamida – Eletroforese vertical

4.1.1 Solução para gel (estoque)

- Acrilamida 29g;
- Bisacrilamida 1g;
- H₂O deionizada completar para 100ml.

4.1.2 Soluções para géis

Tabela A

Reagentes	10% não desnaturante	12% destaturante
Solução de estoque	6,7 ml	8 ml
Glicerol	1,4 ml	
Uréia		9,6g
H ₂ O	9,8 ml	4 ml
TBE 10X	2,0	2 ml
TEMED	15 µl	15 µl
Persulfato de Amônia (APS)	300 µl	300 µl
Volume Final	20 ml	20 ml

4.2 Preparo das amostras para aplicação no sistema de eletroforese

Os produtos de PCR foram preparados para eletroforese adicionando-se Tampão de Amostra, acrescido do corante bromofenol na proporção de 7 µl de corante para 5 µl do produto de PCR para as amostras submetidas a gel 10% não desnaturante. As amostras submetidas a gel 12% desnaturante foram preparadas com 5 µl do produto de PCR para 7 µl de corante bromofenol com formamida a 75%.

4.3 Procedimento

Após a assepsia, as placas de vidro foram montadas com espaçadores e prendidas com grampos de aço. A solução de poliacrilamida foi preparada nas concentrações de 10% e 12 % de acordo com a tabela A.

Em seguida, os catalizadores TEMED e APS foram adicionados na proporção descrita na tabela anterior para que então a solução fosse entornada na placa preparada.

Tempo médio de polimerização: 20 minutos.

À cuba de eletroforese foi adicionada solução de TBE preparada pela diluição de solução estoque de TBE concentrada que, por sua vez, foi preparada segundo este protocolo:

-TRIS 108,0g;

-Ácido Bórico 55g;

-EDTA 9,3g

-H₂O destilada 1l.

Após a montagem das placas, as cubas foram submetidas a carga elétrica em fontes EC 452™ EC-Aparatus Corporations de alta voltagem por períodos entre três e três horas e meia, conforme o sistema analisado. Foi fixada a miliamperagem a 20 mA e mantida a voltagem livre ao longo da corrida.

4.4 Coloração

a) Solução Fixadora

750 ml de H₂O destilada;

144 ml de Álcool Etílico;

6 ml de Ácido Acético.

b) Solução Reveladora

22,5 g de NaOH

Completar para 1l.

c) Solução de prata 10%

1g de Nitrato de Prata

10 ml de H₂O destilada.

Para a coloração, primeiramente, utilizou-se solução fixadora por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1 ml de Nitrato de Prata e manteve-se em agitação por 5 minutos. O gel foi lavado com H₂O destilada e mergulhado em solução reveladora previamente aquecida com 600 µl de formaldeído até que as bandas se tornassem visíveis.

4.5 Leitura dos géis

As determinações dos perfis alélicos e genotípicos foram realizadas por comparações entre os alelos padrões e o alelo observado em cada amostra ou com o auxílio de uma escada alélica. Uma segunda leitura dos resultados foi confirmada posteriormente, utilizando-se a escolha de amostras ao acaso.

ANEXO 2: Pareceres de aprovação do projeto, CEP-FS e CONEP.



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto: 028 2001

Título do Projeto: “Brasília – Reflexo da Constituição Genética Brasileira”.

Data da Entrada: 21/05/2001

Responsável Principal: Silviene Fabiana de Oliveira

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico e julgando satisfatórias às justificativas e pendências apresentadas a(o) relator(a), resolveu **APROVAR** o projeto 028/01 com o título: “Brasília – Reflexo da Constituição Genética Brasileira”, já analisado em sua 39ª Reunião, realizada no dia 05 de junho de 2001, retomando a 41ª Reunião, realizada no dia 14 de agosto de 2001.

Como o projeto está enquadrado na área temática especial – a de pesquisa genética, deverá ser encaminhado à CONEP, aguardando a apreciação final, para início da execução.

Brasília, 14 de agosto de 2001

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP –FS/UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro
Faculdade de Ciências da Saúde
Cep: 70.910-900

Tel: 307-3229/2113

23/03/05



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

OFÍCIO Nº 796 CONEP /CNS /MS

Brasília –DF, 05 de novembro de 2001.

Senhor(a) Coordenador(a),

Encaminhamos, em anexo, o(s) Parecer(es) nº (s) **1259/2001**
(**Já enviado(s) por fax**), da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP,
referente(s) a projeto(s) de pesquisa acompanhado(s) por esse Comitê.

Atenciosamente,

CORINA BONTEMPO DUCA FREITAS
Secretária Executiva
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

À Sua Senhoria
Sr(a) Volnei Garrafa
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas
Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde
Campus Univ. Darcy Ribeiro sl. BN 108 A e 108 B
Asa Norte Brasília DF
Cep : 70.910-900



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1259/2001

Registro CONEP = 2932 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEP = 028/2001

Processo nº 25000.102003/2001-05

Projeto de Pesquisa: "Brasília : um reflexo da constituição genética brasileira ? "

Pesquisador Responsável: Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Instituição: Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília / UNB / DF

Área Temática Especial : Genética Humana

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 19 de outubro de 2001.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1259/2001

Registro CONEP = 2932 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEP = 028/2001

Processo nº 25000.102003/2001-05

Projeto de Pesquisa: "Brasília : um reflexo da constituição genética brasileira ?".

Pesquisador Responsável: Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Instituição: Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília / UNB / DF

Área Temática Especial : Genética Humana

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:


a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 19 de outubro de 2001


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

Recebi



09/11/2001

ANEXO 3: Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado na coleta do material biológico.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, PÓS- INFORMAÇÃO

O abaixo assinado, _____ declara ter sido plenamente esclarecido, lido e ouvido o presente termo de responsabilidade que lhe informa estar ciente do seguinte:

- a) Que pelo presente documento concorda em participar da pesquisa “Brasília: reflexo da constituição genética brasileira?” visando à caracterização genética da população brasiliense e a comparação desta com populações urbanas brasileiras.
- b) Que esta participação implicará a retirada de aproximadamente cinco ml de sangue de uma das veias do antebraço sendo que este material será utilizado com finalidade de tipagem sanguínea, análise hemoglobina, extração de DNA, análise de marcadores moleculares e marcadores proteicos e isoenzimáticos.
- c) Que esse procedimento é método usual na pesquisa genética, não implicando risco para a saúde, podendo, porém, provocar um pouco de dor.
- d) Que a recusa em participar do projeto poderá ser feita a qualquer tempo mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento e ficará livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento bastando à comunicação aos responsáveis do projeto.

Brasília, ____ de _____ de 2001

Assinatura: _____

Documento de identidade: _____

Responsável pela pesquisa: _____

