



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

TESE DE DOUTORADO

INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES DA CCR5 E LANGERINA E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM A INFECÇÃO PELO HIV-1

GISELLE CALASANS DE SOUZA COSTA

Salvador – Bahia - Brasil

2012



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES DA CCR5 E LANGERINA E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM A INFECÇÃO PELO HIV-1**

GISELLE CALASANS DE SOUZA COSTA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara

Co-Orientador: Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Salvador – Bahia - Brasil

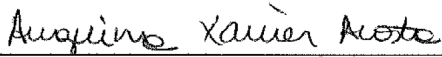
2012

“INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES DA CCR5 E LANGERINA E SUAS ASSOCIAÇÕES
COM A INFECÇÃO PELO HIV-1.”

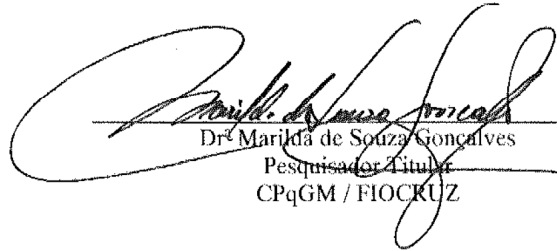
GISELE CALASANS SOUZA COSTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

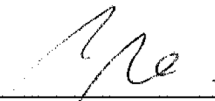
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr^a Angelina Xavier Acosta
Professor Adjunto II
UFBA



Dr^a Marilda de Souza Goncalves
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ



Dr^a Maria Lourdes Farre Vallve
Pesquisador em Saúde Pública
CPqGM / FIOCRUZ

Dedico este trabalho,
todo o aprendizado e todas as vitórias
conquistadas ao longo do caminho aos meus

dois maiores amores:

Julia e Anderson.

Giselle Calasans

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua presença constante e inegável em minha vida.

A meus pais, Josefa e Américo, por toda doação e sacrifício que culminaram na chegada deste dia.

A meu esposo, Anderson, pelo companheirismo, amizade, incentivo, dedicação e presença em todos os momentos desta caminhada. Amo você!

A minha filha, Julia, razão da minha vida, pelos chutes na barriga enquanto escrevia, que me acordavam para a realidade, pelos embalos de sábado à noite, antes de dormir, pelo sorriso tímido e marcante e pelo simples fato de existir em nossas vidas.

A meu irmão, Diego, pela amizade, pela torcida e por me mostrar que tudo é possível quando se acredita em um sonho.

A meu orientador, Dr. Luiz Alcântara, pelos ensinamentos, pela paciência, pela confiança e, acima de tudo, pela oportunidade.

A meu co-orientador, Dr. Bernardo Galvão, pelo exemplo a SEMPRE ser seguido, pelas conversas e por todos os ensinamentos, perante a vida e acadêmicos.

A Jaqueline Goes de Jesus, iniciação científica deste trabalho, por ser meu braço direito e esquerdo, pela dedicação, habilidade e competência e, acima de tudo, pela amizade e confiança. Sem você eu não teria conseguido!

À Dra. Marilda Gonçalves pela ajuda generosa e indispensável.

A Silvana Paz, da Plataforma de sequenciamento, pela dedicação, disponibilidade e pelas conversas e risadas.

A todos os amigos do grupo, por TUDO: toda compreensão, vivência, ajuda, presença, risada, choro, anseios e vitórias. Amo vocês, todos vocês!!!

Ao antigo e eterno GeneLASP, especialmente a Thaís e a Taísa, pela amizade, apoio e sinceridade durante todos esses anos.

Aos colegas do LASP e do CHTLV, por todo o tempo de convivência e troca de experiência.

A minha “cori”, Aline Miranda, por todo auxílio no início, no meio e no fim desta etapa! Sua amizade foi imprescindível para a conclusão deste processo.

A Lindinha (D. Eugênia), a Rodrigo, a Cláudio, a Sônia e a Noilson pelo suporte durante todo o caminho.

À Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pelo suporte.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, por toda estrutura e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dos trabalhos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Raras são as visões intelectuais
bastante agudas e poderosas para
romper através da neblina e
surpreender as linhas exatas, o
verdadeiro contorno da realidade”

Eça de Queiroz

COSTA, Giselle Calasans de Souza. Investigação de mutações nos genes da CCR5 e Langerina e suas associações com a infecção pelo HIV-1. 125 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

RESUMO

O HIV-1 é o agente etiológico da AIDS. Sabe-se que fatores virais e do hospedeiro podem influenciar na susceptibilidade à infecção pelo vírus e na progressão para a AIDS. Em relação aos fatores intrínsecos ao hospedeiro, tem sido demonstrado que algumas alterações na CCR5 podem afetar sua ligação com a gp120 do HIV-1, influenciando na infecção pelo vírus. Além disso, a proteína Langerina, encontrada na superfície das Células de Langerhans (LCs), apresenta um papel importante em relação à infecção pelo HIV-1, por ter a capacidade de se ligar à gp120 viral através de seu Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD). Esta interação permite que as LCs internalizem o vírus em Grânulos de Birbeck, os quais degradam a partícula viral, inibindo a apresentação do HIV-1 para os linfócitos T. Desta forma, diferenças na função da langerina, devido a mutações no promotor do gene *Langerina* e na região codificante do CRD, por exemplo, podem influenciar a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi verificar a existência de mutações nas regiões do gene *CCR5* que codificam para os domínios N e C-terminal da proteína, no promotor do gene da Langerina e na região codificante do CRD, bem como verificar a existência de possíveis associações entre as mutações encontradas e a infecção pelo HIV-1. Para tal, através de sequenciamento, foi analisado um total de 128 amostras de DNA de indivíduos infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia e 197 amostras de DNA de indivíduos não-infectados de Salvador, Bahia. Os possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição da região promotora do gene da Langerina foram analisados pela ferramenta MatInspector implementada no software Genomatix. Análises físico-químicas, de domínios protéicos potenciais, de predição da estrutura proteica secundária e de modelagem tridimensional proteica foram também realizadas, utilizando diferentes ferramentas de bioinformática. Os estudos na região N-terminal da CCR5 revelaram a existência de uma mutação de sentido trocado no aminoácido 55 (p.L55Q) apenas em indivíduos não-infectados, com uma frequência do alelo mutante de 1,8%. Análises físico-químicas demonstraram que esta mutação aumentou a flexibilidade e a acessibilidade da CCR5 e a modelagem protéica demonstrou que a mutação levou a um pequeno desvio para a direita, bem como alterou levemente a carga eletrostática dessa região da proteína. Foi observada diferença estatisticamente significante entre as frequências alélicas ($p=0,039$) e genotípicas ($p=0,038$) da mutação p.L55Q quando os indivíduos infectados e não-infectados foram comparados. Os estudos na região C-terminal da CCR5 demonstraram a existência de três mutações silenciosas em indivíduos infectados pelo HIV-1: c.3,765C>T, c.3,777A>T e c.3,831A>G. Em relação à análise da região promotora do gene da Langerina, foram observadas três mutações (-577T>C, -517T>C e -160T>C) que, segundo o MatInspector, criaram novos sítios de ligação para fatores de transcrição, tais como: NFAT5, HOXB9.01 e STAT6.01. Entretanto, comparando as frequências alélicas e genotípicas dessas mutações entre os indivíduos infectados e não-infectados, não foi observada diferença estatisticamente significante. Já as análises realizadas na região gênica que codifica o CRD da Langerina demonstraram a existência de três mutações: p.K313I (c.937T>A), c.941C>T (g.4728C>T) e c.983C>T (g.4770C>T). As análises físico-químicas revelaram que a mutação p.K313I aumentou a hidrofobicidade e as hélices transmembranares

e diminuiu a hidrofobicidade, a acessibilidade e a antigenicidade da proteína. Entretanto, a presença do alelo mutante não alterou a predição da estrutura secundária da Langerina e não foi observada diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas e genotípicas quando os dois grupos estudados foram comparados. Estes resultados sugerem que a mutação p.L55Q, encontrada no domínio N-terminal da CCR5, pode afetar a entrada do HIV-1 na célula. Foi possível, também, observar que as mutações encontradas no gene da Langerina não apresentam associação com a infecção pelo HIV-1. No entanto, é importante que novos estudos sejam realizados com o intuito de compreender melhor o verdadeiro papel da mutação p.L55Q na infecção pelo HIV-1, assim como, novas análises voltadas para a busca de variações no gene da Langerina também devam ser conduzidas, uma vez que este é o primeiro estudo que investiga mutações na Langerina em indivíduos infectados pelo HIV-1.

Palavras-chave: HIV-1, CCR5, Langerina, mutações

COSTA, Giselle Calasans de Souza. Mutations investigation at *CCR5* and *Langerin* genes and their associations with HIV-1 infection. 125 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

ABSTRACT

HIV-1 is the etiologic agent of AIDS. It has been demonstrated that the mechanisms underlying HIV-1 infection and pathogenesis require a combination of viral and host factors. Concerned to the host intrinsic factors, some mutations at *CCR5* human gene can affect the interaction between *CCR5* protein and HIV-1 gp120, influencing the virus infection. Besides, the Langerin protein, located exclusively on Langerhans cells surface, has an important role in HIV-1 infection due to its ability of binding to gp120 through its Carbohydrate Recognition Domain (CRD). This interaction ables HIV-1 internalization into Birbeck granules, which degrade the virus and prevent LC infection and viral dissemination. So, differences in Langerin function due to mutations at promoter and CRD encoding regions of the human *Langerin* gene, for example, might influence the susceptibility to HIV-1 infection. Thus, the main purpose of this study is to investigate the existence of mutations at the regions of *CCR5* gene that encodes the N- and C-terminal protein domains and at promoter and CRD encoding regions of the human *Langerin* gene, and finally to stablish possible associations among the observed mutations and HIV-1 infection. Using DNA sequencing, it was studied a total of 128 DNA samples of HIV-1 infected individuals from Feira de Santana, Bahia and 197 DNA samples of HIV-1 non-infected individuals from Salvador, Bahia. The transcription factors binding sites were analyzed using the MatInspector tool implemented in the Genomatix software. Physico-chemical, potential protein domain, prediction of protein secondary structure and protein modeling analyses were also performed, using Bioinformatic tools. The studies into the N-terminal protein domain revealed a new *missense* mutation at aminoacid 55 (p.L55Q), only in HIV-1 non-infected individuals, with allelic frequency of 1.8%. Physico-chemical analysis revealed that this mutation magnified the flexibility and accessibility profiles and the modeling of *CCR5* structures showed that this mutation resulted in a small deviation to the right, as well as, a hydrophobic to hydrophilic property alteration. When HIV-1 infected and non-infected groups were compared, the allelic and genotypic frequencies of the p.L55Q mutation were statistically significant ($p=0.039$ and 0.038 , respectively). Three novel silent mutations were found at encoding region of C-terminal protein domain in the HIV-1 infected individuals: c.3,765C>T, c.3,777A>T and c.3,831A>G. Concerned to the analyses at promoter *Langerin* region, the studies revealed three mutations: -577T>C, -517T>C and -160T>C. The search for possible transcription factors binding sites using MatInspector demonstrated that these promoter mutations created new binding sites to some transcription factors, such as NFAT5, HOXB9.01 and STAT6.01. However, when HIV-1 infected and non-infected groups were compared, the allelic and genotypic frequencies of the analyzed promoter sites were not statistically significant. It was observed three mutations at *Langerin* gene region that encodes to the protein CRD: p.K313I (c.937T>A), c.941C>T (g.4728C>T) and c.983C>T (g.4770C>T). The physico-chemical analysis revealed that the p.K313I polymorphism magnified the hydropathy and transmembrane profiles and reduced the hydrophilicity, accessibility and anitigenicity profiles. However, this mutation did not modify the protein secondary structure prediction and when HIV-1 infected and non-infected individuals were compared, it was not observed a statistically significant difference in the allelic and genotypic frequencies from the p.K313I polymorphism. These results suggest that

the p.L55Q mutation can affect HIV-1 infection through CCR5 entry. It was also observed that the mutations detected at the promoter and CRD encoding regions of the human *Langerin* gene are not associated with HIV-1 infection susceptibility. However, it is important to accomplish future studies in order to better understand the role of the p.L55Q mutation at HIV-1 infection, as well as, conduct new search for variations at *Langerin* gene that could influence HIV-1 infection, since this is the first study that analyzes mutations at promoter and encoding regions of *Langerin* gene in a HIV-1 infected population.

Key words: HIV-1, CCR5, Langerin, mutations

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Prevalência do HIV-1 no mundo.....	19
Figura 2	Taxa de Incidência dos casos de AIDS (por 100 mil habitantes), segundo região geográfica de residência e ano de diagnóstico no Brasil e regiões, 1997/2009.....	20
Figura 3	Desenho esquemático da estrutura do HIV-1.....	22
Figura 4	Organização genômica do HIV-1.....	24
Figura 5	Abordagem global do ciclo de replicação do HIV-1.....	26
Figura 6	História natural da infecção pelo HIV-1.....	29
Figura 7	Estrutura da CCR5.....	32
Figura 8	Localização específica das LCs e DC-SIGN ⁺ -DCs no tecido epitelial da mucosa genital.....	37
Figura 9	Papel das DCs na apresentação de antígenos e na transmissão do HIV-1 para células T.....	38
Figura 10	Diagrama da estrutura da Langerina.....	40
Figura 11	Papel da Langerina e dos Grânulos de Birbeck na infecção pelo HIV-1.....	41
Figura 12	Diferentes formas de interação entre LCs e DC-SIGN ⁺ -DCs e o HIV-1.....	42
Figura 13	Diferentes subtipos de DCs no epitélio e o subepitélio da mucosa e suas participações na infecção pelo HIV-1.....	43
Figura 14	Figure 1. The final model of stable structure of CCR5.....	70
Figura 15	Figure 2. Validation of the model using Ramachandran plot computed with the PROCHECK program with 90.1% (a) and 87.6% (b) of the residues from the mutant and wild models, respectively, in favored and allowed regions.....	71
Figura 16	Figure 3. Overlapped CCR5 structures. In green, wild aminoácido (L) and in blue, mutante aminoacid (Q). (a) Complete structures. (b) Wild and mutant alleles in focus.....	72
Figura 17	Figure 4. Eletrostatic load of the wild and mutant models. (a) Wild model. (b) Mutant.....	73
Tabela 1	Table 1- Allelic and genotypic frequencies of p.L55Q, c.C3765T,	

	c.A3777T and c.A3831G mutations in HIV-1 infected and non-infected individuals.....	74
Figura 18	Figure 1. Physico-chemical analysis of wild and mutated alleles of p.K313I polymorphism.....	98
Tabela 2	Table 1. Allelic and genotypic frequencies of -577T>C, -517T>C, -160T>C, p.K313I, c.941C>T, c.983C>T and c.*30C>T mutations in HIV-1 infected and non-infected individuals.....	99
Figura 19	Nível de escolaridade dos indivíduos infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia.....	101
Figura 20	Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia, de acordo com a auto-denominação para cor da pele.....	101
Figura 21	Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia, de acordo com a classe social baseada na renda familiar.....	101
Figura 22	Orientação sexual dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana.....	102
Figura 23	Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana de acordo com a via de transmissão do vírus.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD-b	Do inglês <i>Abdominal B-type domain</i>
AIDS	Do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AIRE	Do inglês <i>Autoimmune regulatory element</i>
ARV	Do inglês <i>Antiretroviral</i>
CCL-5	Quimiocina CC do tipo 5
CCR2b	Receptor do tipo 2b de quimiocina CC
CCR3	Receptor do tipo 3 de quimiocina CC
CCR5	Receptor do tipo 5 de quimiocina CC
CCR8	Receptor do tipo 8 de quimiocina CC
CCR9	Receptor do tipo 9 de quimiocina CC
CD1a	Do inglês <i>Cluster of differentiation 1a</i>
CD4	Do inglês <i>Cluster of differentiation 4</i>
CD207	Do inglês <i>Cluster of differentiation 207</i>
CDST	Centro de Doenças Sexualmente Transmissíveis
CLR	Do inglês <i>C-type lectin receptors</i>
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
CXCR4	Receptor do tipo 4 de quimiocina CXC
CXCR6	Receptor do tipo 6 de quimiocina CXC
DC	Células Dendrítica
DC-SIGN⁺	Célula Dendrítica do tipo DC-SIGN
DC	
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECL1	Primeiro <i>loop</i> extracelular
ECL2	Segundo <i>loop</i> extracelular
ECL3	Terceiro <i>loop</i> extracelular
Env	Proteína do envelope viral
ETV1.02	Do inglês <i>Human and murine ETS1 factors 1.02</i>
gp41	Glicoproteína transmembrana do HIV-1
gp120	Glicoproteína de superfície do HIV-1
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HOXB9.01	Do inglês <i>Homeobox 9.01</i>
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
I	Aminoácido Isoleucina
ICL1	Primeiro <i>loop</i> intracelular
ICL2	Segundo <i>loop</i> intracelular
ICL3	Terceiro <i>loop</i> intracelular
K	Aminoácido Lisina
L	Aminoácido Leucina
LAV	Vírus Associado à Linfadenopatia
LC	Célula de Langerhans
LTR	Do inglês <i>Long Terminal Repeat</i>
MEL1.03	Do inglês <i>EVI 1-myeloid transforming protein</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1α	Proteína Inflamatória de Macrófago do tipo 1 α

MIP-1β	Proteína Inflamatória de Macrófago do tipo 1 β
NF1.01	Do inglês <i>Nuclear factor 1</i>
NFAT5	Do inglês <i>Nuclear factor of activated T-cells 5</i>
NPSA	Do inglês <i>Network Protein Sequence Analysis</i>
nt	Do inglês <i>nucleotide</i>
PBMC	Do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Q	Aminoácido Glutamina
RANTES	Do inglês <i>Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
RCSTD	Do inglês <i>Reference Center for Sexual Transmitted Disease</i>
RNA	Ácido ribonucléico
SDF-1α	Do inglês <i>stromal cell-derived factor-1</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
siRNA	Pequeno RNA de interferencia
SNP	Polimorfismo de um Único Nucleotídeo
STAT6.01	Do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 6.01</i>
V3	Alça variável 3 da gp120 do HIV-1

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	16
2.0	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO 1 (HIV-1).....	18
2.1.1	Histórico e epidemiologia do HIV-1.....	18
2.1.2	Estrutura, Classificação e Características do HIV-1.....	21
2.1.3	Ciclo de Replicação Viral.....	24
2.1.4	Correceptores do HIV-1.....	26
2.1.5	Patogênese do HIV-1.....	28
2.2	CORRECEPTOR CCR5.....	31
2.2.1	Estrutura e função da CCR5.....	31
2.2.2	Mutações na CCR5 e infecção pelo HIV-1.....	34
2.3	LANGERINA.....	36
2.3.1	Características e funções das Células Dendríticas.....	36
2.3.2	Estrutura da Langerina.....	39
2.3.3	Papel da Langerina na infecção pelo HIV-1.....	40
2.3.4	Mutações na Langerina e infecção pelo HIV-1.....	43
3.0	OBJETIVOS	46
4.0	JUSTIFICATIVA	47
5.0	RESULTADOS	49
5.1	CAPÍTULO I- New amino-terminal <i>CCR5</i> gene mutation can affect HIV-1 infection	50
5.2	CAPÍTULO II- Polymorphisms at <i>Langerin</i> gene and HIV-1 infection.....	75
5.3	ANÁLISES COMPLEMENTARES.....	100
5.3.1	Perfil Epidemiológico dos Indivíduos Infectados pelo HIV-1.....	100
6.0	DISCUSSÃO	103
7.0	CONCLUSÕES	107
8.0	REFERÊNCIAS	109
9.0	APÊNDICE	123
10.0	ANEXO	124

1.0- INTRODUÇÃO

A resposta imune intrínseca do hospedeiro, assim como fatores virais, desempenham um papel importante no controle da infecção por retrovírus. Em relação ao Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1, do inglês *Human Immunodeficiency Virus type 1*), diferentes hospedeiros apresentam variação na susceptibilidade à infecção e no nível de replicação do vírus. Tal variação pode ser decorrente de fatores virais, como o fenótipo do vírus, e/ou de fatores relacionados ao próprio hospedeiro, tais como a magnitude de resposta dos linfócitos T citotóxicos, o haplótipo do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I, do inglês *Major Histocompatibility Complex class I*) e polimorfismos em receptores de quimiocinas (LIU *et al.*, 1996; SCHMITZ *et al.*, 1999; KAWASHIMA *et al.*, 2009). Além disso, tem sido sugerido que fatores ainda não-definidos do hospedeiro também contribuem para o nível de controle viral em indivíduos infectados pelo HIV-1, enfatizando a importância do estudo de variações genéticas humanas como forma de combate a agentes infecciosos (FELLAY *et al.*, 2007). Alguns desses fatores que contribuem para a contenção da infecção pelo HIV-1 podem ser responsáveis pela manutenção da replicação deste vírus (ROGERS *et al.*, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado a associação entre polimorfismos nas regiões codificantes e promotora de genes humanos e a manifestação de doenças (LICASTRO *et al.*, 2003; SABOURI *et al.*, 2004; YOSHIKAWA *et al.*, 2002). No que diz respeito à infecção pelo HIV-1, sabe-se que a proteína CCR5 (Receptor do tipo 5 de quimiocina CC) funciona como correceptor para as cepas R5 do vírus, que são responsáveis pela maioria das novas infecções e predominam durante as fases inicial e crônica da infecção pelo HIV-1. Sabe-se ainda que a glicoproteína de superfície gp120 do vírus interage com a região amino-terminal (N-terminal) e com o segundo “loop” extracelular (ECL2) da CCR5. Neste âmbito, tem sido demonstrado que algumas mutações no gene humano da CCR5 podem alterar sua ligação com a gp120 do HIV-1, influenciando a infecção pelo vírus (SAMSON *et al.*, 1996; O'BRIEN *et al.*, 1997; BLANPAIN *et al.*, 1999; FARZAN *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2004).

A Lecitina do tipo C, Langerina (CD207), é encontrada na superfície das Células de Langerhans (LC), abundantes em mucosas, assim como no cordão umbilical e no canal vaginal. Essa proteína desempenha um papel importante em relação à infecção pelo HIV-1,

por ter a capacidade de internalizar este vírus em Grânulos de Birbeck, os quais degradam a partícula viral, inibindo a apresentação do HIV-1 para os linfócitos T (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b). Por conseguinte, a langerina de LC de mucosa íntegra funciona como um mecanismo protetor contra a infecção por cepas R5 do HIV-1. Diferenças na função da langerina devido a fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1. É possível que mutações nas regiões promotora e codificantes do gene humano da proteína Langerina contribuam para essas diferenças funcionais (WARD *et al.*, 2006). Entretanto, ainda não existem estudos descritos na literatura que tratem da análise de mutações no gene *Langerina* no contexto de infecção pelo HIV-1.

Neste contexto, o estudo de mutações nas regiões promotora e codificantes dos genes da CCR5 e Langerina nos indivíduos infectados pelo HIV-1 pode ser útil para a compreensão do mecanismo de infecção do vírus e do desenvolvimento das patologias associadas ao mesmo.

2.0- REVISÃO DA LITERATURA

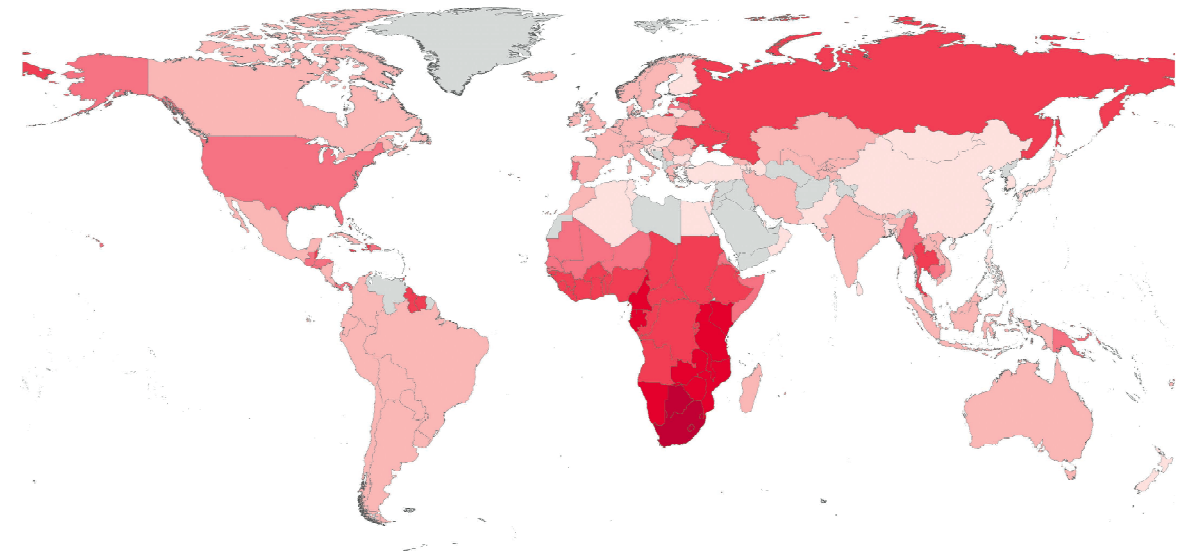
2.1- VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO 1 (HIV-1)

2.1.1- HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DO HIV-1

Em 1983, o Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (VIH-1 ou HIV-1, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) foi isolado pela primeira vez por um grupo de pesquisadores liderados por Luc Montagnier do Instituto Pasteur de Paris, França, sendo então denominado LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus* ou Vírus Associado à Linfadenopatia) (BARRÉ-SINOUSI *et al.*, 1983). Em 1984, a equipe do pesquisador Dr. Robert Gallo, nos Estados Unidos, isolou este mesmo vírus, denominando-o de HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus type III* ou Vírus Linfotrópico de Células T-Humanas do tipo III) (GALLO & WONG-STAAAL, 1985). Em 1986, a Organização Mundial da Saúde recomendou o termo HIV (*Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana) para denominar o vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*). A partir de então, os esforços foram direcionados para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos para combater a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No Brasil, o Boletim Epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde reporta o primeiro caso de AIDS identificado no ano de 1980, assim como o primeiro óbito relacionado à doença. Em 1988, uma equipe de pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, liderada pelo pesquisador Dr. Bernardo Galvão Castro Filho, isolou o HIV-1 no país pela primeira vez, representando um marco simbólico para a pesquisa no Brasil (GALVÃO, 2002).

Atualmente, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que 34 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV-1 no mundo, sendo que mais de 60% destas vivem na África Subsaariana (Figura 1). Em 2010, 1,8 milhão de pessoas morreram em decorrência da AIDS no mundo. No entanto, desde 1999, conhecido como o ano em que a epidemia atingiu seu pico globalmente, o número de novas infecções diminuiu cerca de 19%, incluindo nessa estatística os dados do número de novos infectados na África Subsaariana, que reduziu de 2,2 milhões de pessoas, em 2001, para 1,8 milhão, em 2010 (UNAIDS, 2010). Essa tendência na redução de casos novos reflete uma combinação de fatores, incluindo o

impacto dos esforços na prevenção da infecção pelo HIV-1 e o curso natural da epidemia do vírus.



Prevalência:



Figura 1 – Prevalência do HIV-1 no mundo (Adaptado de UNAIDS, 2010 em http://www.unaids.org/documents/20101123_2010_HIV_Prevalence_Map_em.pdf)

No Brasil, estima-se que 630 mil pessoas vivam com o HIV-1. Destas, 250 mil (aproximadamente 40%) não sabem que estão infectadas pelo vírus. A taxa de prevalência da infecção pelo HIV-1 no Brasil, em indivíduos adultos (15 a 49 anos), no ano de 2010, foi de 0,61 %, sendo de 0,41% entre as mulheres e de 0,82% entre os homens, mantendo-se estável desde o ano 2000. Entre os anos de 1980 a 2010 foram registradas 241.469 mortes no país em decorrência da AIDS (UNAIDS, 2011). De acordo com o boletim epidemiológico, divulgado pelo Ministério da Saúde, no ano de 2009, foram registrados 38.538 novos casos de AIDS. Já no ano de 2010 foram diagnosticados 34.212 casos novos da doença. Dos casos acumulados até 2010, tem-se a seguinte distribuição: 56,5% na região sudeste, 20,2% na região sul, 12,9% no nordeste, 5,8% no centro-oeste e 4,6% na região norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Conforme visto anteriormente, as taxas de incidência no Brasil foram crescentes até o ano 2000 e estão estabilizadas desde então, embora em patamares elevados quando

comparadas a parâmetros internacionais. Por região, observa-se a partir de 2002 um decréscimo da incidência no sudeste, tendência à estabilização na região centro-oeste e crescimento nas demais regiões (Figura 2). Comparada com anos anteriores (1991 a 2009), a taxa de incidência de casos novos de AIDS diagnosticados no Brasil em 2010 apresentou redução ainda maior. Apesar da redução do número de casos novos de AIDS no país, pesquisas sugerem o aumento na taxa de prevalência do HIV-1 na população jovem brasileira (17 a 20 anos) de 0,09% para 0,12%, de acordo com dados de 2009. Seguindo o mesmo padrão, a taxa de incidência de casos de AIDS por 100 mil habitantes, notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) no Estado da Bahia, aumentou de 5,5% em 1999, para 12,4% em 2009, e a incidência na cidade de Salvador também vem aumentando progressivamente desde o ano de 2005 (UNAIDS, 2011; Ministério da Saúde, 2011).

A epidemia da infecção pelo HIV-1 e da AIDS representa um fenômeno complexo, global, instável e dinâmico, sendo que a forma de ocorrência nas diferentes regiões do mundo depende, dentre outros fatores, do comportamento humano. Como um dos resultados das desigualdades sociais enfrentadas pela população brasileira, a propagação da infecção pelo HIV no país revela uma epidemia multifacetada, que vem sofrendo profundas transformações em seu perfil epidemiológico, passando a ser caracterizada, principalmente, pelos processos de heterossexualização, feminização, interiorização e pauperização em curso na sociedade brasileira (BRITO *et al.*, 2001).

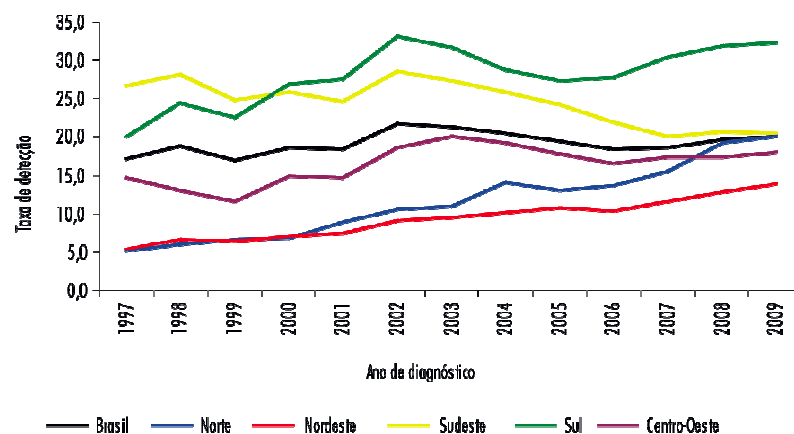


Figura 2 – Taxa de Incidência dos casos de AIDS (por 100 mil habitantes), segundo região geográfica de residência e ano de diagnóstico no Brasil e regiões, 1997/2009 (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A AIDS foi primeiramente relatada em 1981 nos Estados Unidos e esteve associada a indivíduos adultos do gênero masculino que apresentavam alguns aspectos em comum, como sarcoma de *Kaposi*, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, comprometimento do sistema imune e comportamento homossexual. Logo após a identificação da AIDS, as pesquisas se voltaram para a identificação do agente etiológico desta síndrome, o HIV.

O comportamento homossexual foi o principal comportamento de risco associado à infecção pelo HIV-1 nos primeiros anos da epidemia de AIDS (1980 a 1986). Em seguida, entre 1987 a 1991, a epidemia passou a se caracterizar pela transmissão sanguínea, principalmente na subcategoria de uso de drogas injetáveis, particularmente em regiões como a Ásia e o Leste Europeu, dando início a um processo caracterizado pela pauperização e interiorização da epidemia. Outro modo de transmissão do vírus que passou a contribuir para a disseminação do HIV-1, nesse período, foi pelo uso de hemocomponentes, o qual diminuiu drasticamente na maioria dos países desenvolvidos, com a implantação de testes sorológicos nos bancos de sangue (GAYLE & KOPLAN, 2001). Ao longo dos últimos 20 anos, um grande aumento na quantidade de casos por exposição heterossexual vem sendo observado. Este fato reflete o número de 50 milhões de mulheres vivendo com HIV no mundo, caracterizando a feminilização da epidemia do HIV/AIDS, com conseqüente aumento do número de casos de transmissão vertical (forma de transmissão do vírus de mãe para filho durante a gestação, o parto ou por meio da amamentação). De fato, a exposição heterossexual representa, atualmente, a forma predominante de transmissão do HIV no mundo. Particularmente, a transmissão do HIV de mãe para filho responde pela maioria dos casos pediátricos de AIDS. Esse tipo de transmissão ocorre com maior frequência durante o parto e o período de amamentação (UNAIDS, 2010).

2.1.2- ESTRUTURA, CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO HIV-1

O HIV é um membro da família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, que exibe extrema variabilidade genética. Existem duas formas distintas de vírus humanos que causam a AIDS: HIV do tipo 1 (HIV-1) e do tipo 2 (HIV-2 - *Human Immunodeficiency Virus type 2* ou Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2). Eles se diferenciam com base na organização de seus genomas e nas suas relações filogenéticas com outros lentivírus primatas e foram subclassificados, também, com base no critério filogenético. O HIV-1 é subdividido em 3 grupos distintos (grupos M, N e O), sendo o grupo M predominante e consistindo de 11

subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K). Semelhantemente, as cepas do HIV-2 que infectam humanos abrangem 6 diferentes linhagens filogenéticas, consistindo do subtipo A até o subtipo F (HAHN *et al.*, 2000).

O HIV-1 apresenta uma estrutura morfológica composta por um nucleocapsídeo central de 100 nm de diâmetro circundado por um envelope circular. Este envelope é composto por uma proteína de superfície extracelular, denominada gp 120, e uma proteína transmembranar, denominada gp 41, que atravessa a membrana viral. O core interno é constituído por três tipos de proteínas: a do capsídeo (p24), a do nucleocapsídeo (p6 e p7) e a proteína da matriz (p17). Esta estrutura abriga no seu interior o genoma viral composto por duas fitas de RNA, de 9,2 kb de comprimento, às quais estão associadas outras proteínas importantes no processo de integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira (Transcriptase reversa - p24 e integrase – p32) e no desenvolvimento do papel catalítico antes do ciclo de replicação viral (protease – p10) (WATTS *et al.*, 2009) (Figura 3).

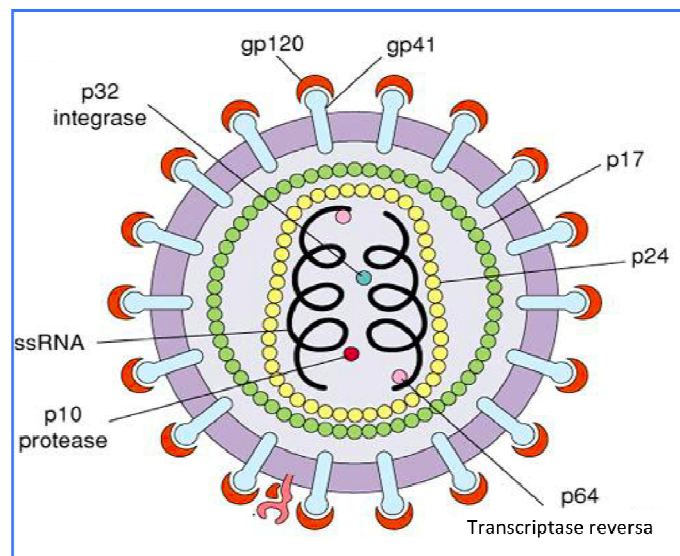


Figura 3 – Desenho esquemático da estrutura do HIV-1 (adaptado de <http://www.niaid.nih.gov>)

O núcleo do HIV-1 apresenta um genoma constituído por 2 fitas simples de RNA e da enzima transcriptase reversa responsável pela conversão do RNA em uma fita dupla de DNA. Este processo ocorre dentro da célula hospedeira logo após a infecção e o DNA produzido irá incorporar-se ao DNA da célula. O genoma assim composto é chamado de provírus. Devido

às altas taxas de erro da transcriptase reversa, à ausência de um sistema de correção desses erros, à dinâmica da replicação viral e a sua propriedade de recombinação, o HIV-1 é caracterizado por uma marcante variabilidade genotípica (ROBERTS *et al.*, 1988). Isto faz com que, praticamente, cada partícula viral contenha um genoma diferente das demais. Essa taxa elevada de variação é responsável pelo aparecimento de cepas virais que apresentam características biológicas diferentes (SIMMONDS *et al.*, 1990) e/ou pela resistência à terapia anti-retroviral (COFFIN, 1995). Como resultado, esta grande variabilidade genética do vírus se constitui em um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina universal (COFFIN, 1995).

O genoma do HIV-1 é composto por três genes necessários para a replicação do vírus (*gag*, *env* e *pol*) e outros genes adicionais que regulam a expressão viral e são importantes na patogênese do vírus (*tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpr* e *vpu*). O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope viral e seus produtos, as glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembranar (gp 41), são responsáveis pelo reconhecimento e pela penetração do vírus na célula-hospedeira. O gene *gag* codifica as proteínas da matriz protéica e do capsídeo viral (p17 e p24) e o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, a protease e a integrase, responsáveis pela conversão da fita simples de RNA na fita de DNA, pela maturação protéica dos componentes dos vírions infecciosos de HIV-1 e pela integração do material genético do vírus ao DNA da célula infectada, respectivamente. Os outros genes adicionais são responsáveis pela transativação da transcrição (*tat*), pela regulação da expressão do RNA mensageiro (*rev*), pela infectividade do HIV (*nef*), pela formação do complexo de integração (*vif*), pela localização nuclear deste complexo (*vpr*) e pela liberação do vírus (*vpu*). As extremidades do genoma são flanqueadas por duas regiões repetidas, chamadas de LTR (do inglês *Long Terminal Repeat*), cujas sequências são essenciais para a integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro e também para a regulação da transcrição do genoma do HIV-1 através da ligação dos fatores de transcrição, como NFκB (WATTS *et al.*, 2009) (Figura 4).

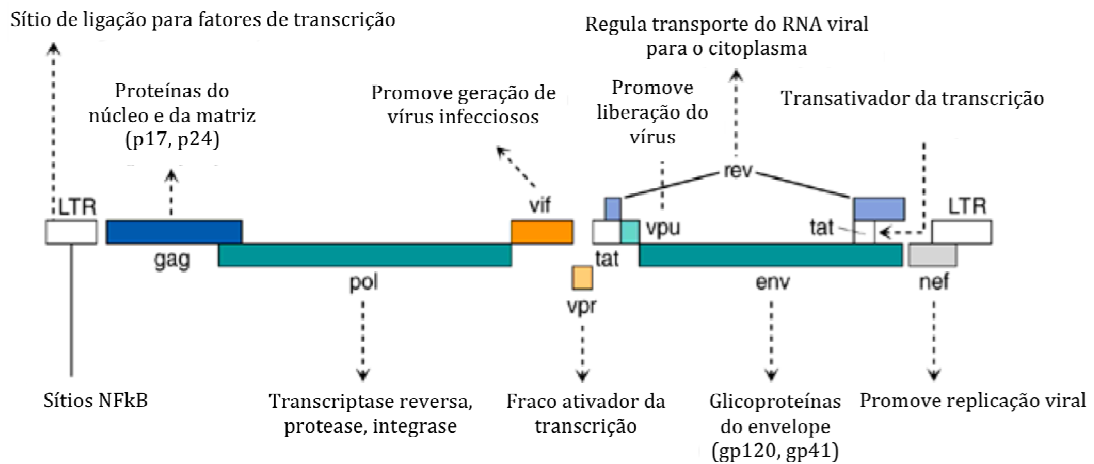


Figura 4 – Organização genômica do HIV-1 (adaptado de JOHN WILEY & SONS, Inc.)

2.1.3- CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de replicação do HIV-1 é semelhante ao dos demais retrovírus, dependente da presença da transcriptase reversa, e se caracteriza pela existência de sete etapas (Figura 5):

1ª. Etapa: Fusão do HIV-1 à superfície da célula hospedeira- A glicoproteína de superfície do HIV (gp120) liga-se, inicialmente, a seu receptor na célula hospedeira, a molécula CD4, sofrendo, dessa forma, uma mudança conformacional que expõe seu sítio de ligação a um dos receptores de quimiocinas celulares, denominados correceptores (UGOLINI *et al.*, 1999; SCARLATA & CARTER, 2003; BANNWARTH & GATIGNOL *et al.*, 2005). Os correceptores mais utilizados pelo HIV-1 são os receptores de quimiocinas CCR5 (receptor do tipo 5 de quimiocinas CC) e CXCR4 (receptor do tipo 4 de quimiocinas CXC) (CORMIER *et al.*, 2000; DRAGIC *et al.*, 2000). A interação entre gp120/CD4/correceptor induz uma mudança conformacional que expõe a região amino-terminal (N-terminal) da glicoproteína transmembranar do envelope viral (gp41), a qual contém um peptídeo de fusão que entra em contato com a membrana da célula hospedeira, permitindo a justaposição das membranas do vírus e da célula-alvo (NAZARI & JOSHI, 2008).

2ª. Etapa: Entrada das proteínas virais na célula hospedeira- Após a fusão das membranas do vírus e da célula-hospedeira, o nucleocapsídeo do HIV-1, contendo o genoma e as enzimas virais, como a transcriptase reversa e a integrase, entra no citoplasma da célula (DOMS *et al.*, 1997; SCARLATA & CARTER, 2003).

3ª. Etapa: Formação do DNA viral- A fita simples de RNA é reversamente transcrita em DNA de fita dupla pela enzima transcriptase reversa. Durante a transcrição, o RNA molde é removido pela atividade RNase H da enzima. Devido às altas taxas de erro da transcriptase reversa, à ausência de um sistema de correção desses erros, à dinâmica da replicação viral, e a sua propriedade de recombinação, o HIV-1 é caracterizado por uma marcante variabilidade genotípica (ROBERTS *et al.*, 1988).

4ª. Etapa: Transporte do DNA viral para o núcleo- A Integrase, por sua vez, insere o DNA viral no núcleo da célula hospedeira e promove sua integração ao DNA do hospedeiro. Esse processo marca o fim da fase inicial do ciclo de multiplicação do vírus e inicia a fase mediada por enzimas do hospedeiro. Ocorre então a síntese do RNA viral, tendo como molde o DNA proviral integrado no genoma do hospedeiro. O provírus pode permanecer inativo em termos de transcrição durante meses ou anos, com pouca ou nenhuma produção de novas proteínas virais (PETERLIN & TRONO, 2003).

5ª. Etapa: Produção de proteínas virais- A nova fita do RNA viral é transportada para o citoplasma da célula hospedeira, onde ocorre a síntese das proteínas virais nos ribossomos a partir do RNA mensageiro (mRNA) do vírus (PETERLIN & TRONO, 2003).

6ª. Etapa: Formação da nova partícula de HIV-1 imaturo- As proteínas e os RNAs virais, recém-sintetizados, movem-se em direção à superfície da célula, formando um novo vírus, ainda imaturo (PETERLIN & TRONO, 2003).

7ª. Etapa: Brotamento e maturação da nova partícula de HIV-1- A ação da protease permite a liberação das proteínas individuais do vírus, o que, por sua vez, favorece a maturação da nova partícula viral e seu brotamento a partir da célula hospedeira (PETERLIN & TRONO, 2003).

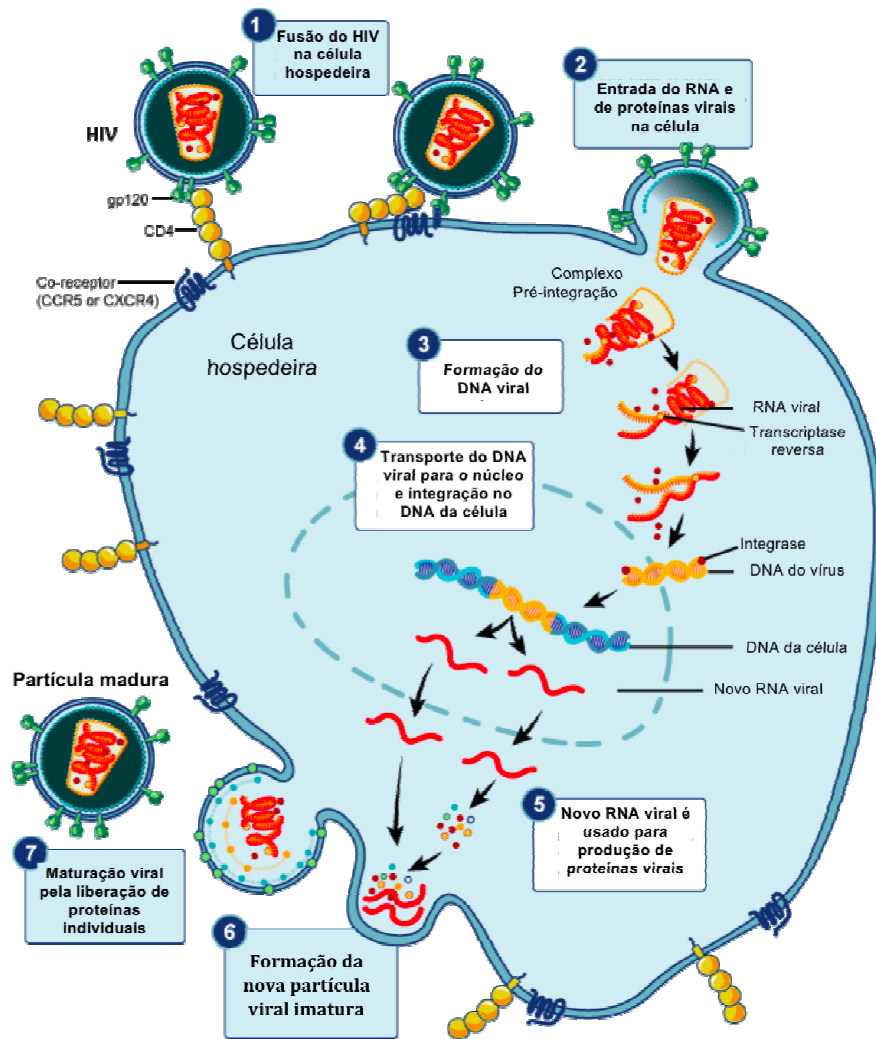


Figura 5 – Abordagem global do ciclo de replicação do HIV-1 (adaptado de PETERLIN & TRONO, 2003)

2.1.4- CORRECEPTORES DO HIV-1

Conforme citado anteriormente, a entrada do HIV-1 na célula depende de uma série de interações entre a subunidade de superfície (gp120) da glicoproteína do envelope viral (env), o receptor celular (a molécula CD4) e os receptores de quimiocinas (CCR5 ou CXCR4, principalmente), que agem como correceptores na célula-alvo (CHOE *et al.*, 2003; NAZARI & JOSHI, 2008; GORRY & ANCUTA, 2010).

Quimiocinas (forma abreviada de citocinas quimiotáticas) são pequenas proteínas (polipeptídeos) de cerca de 8-12 kDa, que contêm duas pontes dissulfeto internas e apresentam um papel importante na regulação funcional do sistema imune, estimulando, por exemplo, o movimento de diversas subpopulações de leucócitos. Algumas quimiocinas

podem ser produzidas por várias células, em resposta a estímulos inflamatórios, e recrutar leucócitos para os locais de inflamação. Outras quimiocinas, entretanto, são produzidas normalmente em vários tecidos e recrutam leucócitos para esses tecidos mesmo na ausência de inflamação. As quimiocinas são classificadas em famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína N-terminais. As duas principais famílias são a das quimiocinas CC, nas quais os resíduos de cisteína são adjacentes, e a das quimiocinas CXC, nas quais esses resíduos são separados por um aminoácido (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Alguns linfócitos T ativados secretam quimiocinas, como RANTES, MIP - 1 α , MIP - 1 β e CCL-5, que diminuem a infecção por algumas cepas do HIV-1 por competirem com o vírus pelo mesmo receptor, o CCR5, para atuarem na célula (COCHI *et al.*, 1995).

Onze receptores diferentes para quimiocinas CC (chamados CCR1 a CCR11) e seis para quimiocinas CXC (chamados CXCR1 a CXCR6) já foram identificados. Todos os receptores de quimiocinas exibem uma estrutura característica com sete domínios α -helicoidais transmembrânicos. Tais receptores exibem uma superposição de especificidades para as quimiocinas dentro de cada subfamília e o padrão de expressão celular destes receptores determina quais os tipos celulares que respondem a cada quimiocina. Certos receptores de quimiocinas, especialmente CCR5 e CXCR4, atuam como correceptores para o HIV-1 (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Os receptores CCR5 e CXCR4 são expressos tanto em células T CD4⁺ como em macrófagos. O CCR5 é um receptor natural para β -quimiocinas (RANTES, MIP - 1 α , MIP - 1 β , CCL-5) (COCHI *et al.*, 1995; NAZARI & JOSHI, 2008), enquanto o CXCR4 é receptor para α -quimiocinas, como SDF-1 α (BLEUL *et al.*, 1996; OBERLIN *et al.*, 1996). Embora com frequência menor do que as moléculas CCR5 e CXCR4, outros receptores de quimiocinas, como CCR2b, CCR3, CCR8, CCR9 e CXCR6, podem ser utilizados por algumas cepas de HIV-1, inclusive na ausência de CCR5 ou CXCR4, durante a efetivação da infecção (DORANZ *et al.*, 1996; NAZARI & JOSHI, 2008).

Cepas do HIV-1 que utilizam o correceptor CCR5, denominadas cepas R5, causam a maioria das novas infecções e predominam durante as fases inicial e crônica da infecção pelo HIV-1. Por sua vez, cepas do vírus que utilizam o correceptor CXCR4, denominadas cepas X4, surgem na infecção tardia, coincidindo com o declínio da função imune e contribuindo para a progressão mais rápida da doença. Existem ainda as cepas dual-trópicas, que

apresentam tropismo para os dois correceptores CCR5 e CXCR4, denominadas cepas R5/X4 (CONNOR *et al.*, 1997; GORRY & ANCUTA, 2010; REGOES & BONHOEFFER, 2005).

A glicoproteína de superfície gp120 do vírus interage com a região amino-terminal (N-terminal) e com o segundo *loop* extracelular (ECL2) da CCR5, enquanto a região do envelope viral das cepas X4 interage com o primeiro e o segundo *loop* extracelular (ECL1 e ECL2, respectivamente) da molécula CXCR4 (LU *et al.*, 1997; BRELOT *et al.*, 1997). A região do envelope viral das cepas R5/X4 pode interagir tanto com a região N-terminal da CCR5, quanto com o ECL1 e o ECL2 da CXCR4. Entretanto, apesar destas cepas poderem usar ambos os correceptores, o CXCR4 é utilizado, preferencialmente, para entrar nas células (YI *et al.*, 2005).

Geralmente, cerca de 4 a 5 anos após a infecção inicial, ocorre uma evolução das cepas R5 para cepas X4 do vírus em mais de 50% dos indivíduos infectados pelo subtipo B do HIV-1, que é correlacionada com o declínio rápido das células T-CD4⁺ e a progressão para a AIDS. Os mecanismos moleculares envolvidos na troca do correceptor utilizado pelo HIV-1 ainda não estão bem compreendidos. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado uma redução no *fitness* viral das cepas R5, permitindo o surgimento dos vírus R5/X4. Para evoluir para as cepas X4, as cepas R5 do HIV-1 sofrem mutações na alça V3 (terceira alça variável) da gp120, além de sofrerem mudanças na eficiência com que env se liga ao correceptor CCR5 (COETZER *et al.*, 2008).

Mudanças no tropismo viral para células T-CD4⁺ têm grandes impactos na patogênese do HIV-1. Além disso, há um crescente interesse em relação ao uso dos correceptores apresentado por diferentes cepas do HIV-1, devido ao desenvolvimento de uma nova classe de drogas antirretrovirais, os antagonistas dos correceptores ou bloqueadores/inibidores de fusão. Estas drogas podem bloquear tanto os correceptores CCR5 ou CXCR4 quanto a molécula CD4, impedindo a fusão do HIV-1 com a membrana celular (SIERRA *et al.*, 2007).

2.1.5- PATOGÊNESE DO HIV-1

Os mecanismos envolvidos na patogênese do HIV-1 são complexos e envolvem uma combinação de fatores virais e do hospedeiro que estão relacionados com o equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune apresentada pelo hospedeiro ao vírus. Por este motivo, a

taxa de progressão da doença relacionada à infecção pelo HIV-1 pode variar substancialmente entre indivíduos infectados (GROSSMAN *et al.*, 2006).

A história natural da infecção pelo HIV-1 é caracterizada, em 80% dos indivíduos infectados, por uma fase aguda, com níveis elevados de vírus circulante e um rápido declínio na contagem de células T CD4⁺; uma fase crônica, sem sintomas, e uma fase caracterizada pela evolução da AIDS no organismo (GROSSMAN *et al.*, 2006) (Figura 6).

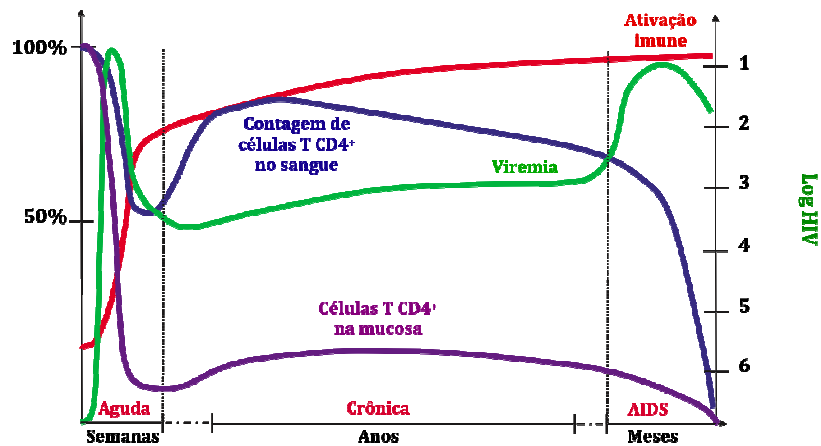


Figura 6 – História natural da infecção pelo HIV-1 (adaptado de GROSSMAN *et al.*, 2006)

A fase aguda ou primária da infecção pelo HIV-1 é definida como o primeiro período da infecção a partir da detecção do RNA viral até a formação de anticorpos específicos contra o vírus, cerca de 3 a 4 semanas após a infecção (McMICHAEL *et al.*, 2010). A infecção primária ocorre quando vírions do HIV-1 no sangue, sêmen ou outros fluidos corporais de um indivíduo ingressam nas células de outro indivíduo, pelos eventos de fusão mediada pelo receptor e correceptor celulares e as glicoproteínas do envelope viral, conforme descrito anteriormente. Dependendo do sítio de exposição inicial ao vírus, células T CD4⁺ e monócitos no sangue ou células T CD4⁺, macrófagos e Células Dendríticas (DC) na mucosa, todas expressando CD4 e CCR5, podem ser as primeiras células infectadas. Estas células infectadas, então, atingem os linfonodos, onde células T CD4⁺CCR5⁺ ativadas estão presentes e representam novo alvo para a infecção (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b, 2007c; POPE *et al.*, 1994; REECE *et al.*, 1998; KAWAMURA *et al.*, 2005). Neste processo, as partículas virais infectam DC e linfócitos B, aumentando a replicação viral e a disseminação do vírus no organismo (MOGENSEN *et al.*, 2010). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que DC no epitélio, em sítios de penetração do vírus, podem capturá-lo, através

de suas Lecitinas do Tipo C, que funcionam como receptores virais, e depois migrar para os linfonodos, exercendo um papel crucial na disseminação inicial do vírus para estes tecidos. Uma vez presentes nos tecidos linfóides, as DC podem transmitir, por contato direto, o HIV-1 para células T CD4⁺ (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b, 2007c).

Nesta fase, além do aumento da viremia devido à abundante replicação viral, ocorre uma depleção de células T CD4⁺ de memória, primeiramente no tecido de mucosa e, em seguida, no organismo como um todo, incluindo sangue, linfonodos e baço. Esse rápido decréscimo na contagem de células T CD4⁺, nas três primeiras semanas da infecção, pode ser explicado pela lise direta destas células, através do ciclo lítico da infecção pelo HIV-1, e, indiretamente, pela sua apoptose mediada por Fas, cuja ligação a seus receptores na superfície celular induz a recrutação de moléculas ativadoras, como as caspases, que acabam ativando, por sua vez, o processo autocatalítico (LI *et al.*, 2005). A viremia plasmática atinge um pico cerca de 21 a 28 dias após a infecção, acompanhada da depleção no número de células T CD4⁺ e do aumento do número de linfócitos T CD8⁺. Neste momento, os indivíduos infectados podem desenvolver a síndrome retroviral aguda, com sinais e sintomas inespecíficos de muitas doenças virais. O sistema imune torna-se altamente ativado, com o sistema imunológico adaptativo produzindo respostas imunológicas com mediação humoral e celular, ambas dirigidas aos antígenos virais. Essas respostas imunológicas, tanto através da eliminação das células que contêm o vírus por um mecanismo citotóxico quanto pela liberação de citocinas supressoras da replicação viral, ambos os mecanismos influenciados pelos linfócitos T CD8⁺ (PANTALEO & FAUCI, 1996), controlam parcialmente a infecção e a produção do vírus. Tal controle é refletido pela queda na carga viral, entre 12 a 20 semanas após a infecção primária, para níveis baixos mas, ainda assim, detectáveis. A contagem de células T CD4⁺ do sangue aumenta até um nível subnormal, dando início à fase crônica da infecção (GROSSMAN *et al.*, 2006; MOGENSEN *et al.*, 2010).

A fase crônica da infecção é caracterizada por um longo período de latência clínica (de 6 a 8 anos). A maioria dos indivíduos infectados apresenta, no início dessa fase, o retorno da quantidade de células T CD4⁺ circulantes para níveis próximos do normal. Entretanto, apesar da ausência de sintomas durante o desenvolvimento da fase crônica, observa-se a ativação do sistema imune e a perda progressiva e lenta de células T CD4⁺ com o passar dos anos. Esta diminuição na contagem de células T CD4⁺ representa uma consequência do aumento da ativação imune e da elevada evolução viral neste estágio, caracterizada por uma

excessiva taxa de mutação do vírus e pela mudança do tropismo celular. Como resultado, tem-se a progressão de cepas com tropismo para o CCR5 (cepas R5) para cepas dual-trópicas (R5/X4) ou X4-trópicas. Além disso, a viremia aumenta e a contagem de células T CD4⁺ de mucosa mantém-se reduzida (MOGENSEN *et al.*, 2010).

A progressão para a fase de doença clinicamente aparente ou de doença definidora de AIDS geralmente ocorre entre 8 a 10 anos após a infecção primária na maioria dos indivíduos infectados. Quando a contagem de células T CD4⁺ está abaixo de 200 células/ μ l, os indivíduos infectados podem apresentar sinais e sintomas graves da infecção, associados ao aumento da susceptibilidade a infecções oportunistas ou neoplasias. A viremia do HIV-1 pode subir drasticamente, enquanto a replicação viral em outros reservatórios acelera-se sem controle (PANTALEO & FAUCI, 1996). A persistência da ativação imune, o aumento rápido e progressivo da viremia, assim como a diminuição das células T CD4⁺ do sangue e das mucosas para níveis muito baixos caracterizam essa fase (GROSSMAN *et al.*, 2006; MOGENSEN *et al.*, 2010).

2.2- CORRECEPTOR CCR5

2.2.1- ESTRUTURA E FUNÇÃO DA CCR5

O gene *CCR5*, localizado na posição 21 do braço curto do cromossomo 3 (3p21), codifica o receptor de quimiocinas CC humano do tipo 5, CCR5, e é formado por 4 éxons e 2 íntrons, sendo que não existe íntron entre os éxons 2 e 3. A transcrição é iniciada em 2 diferentes promotores, ambos ricos em adenina e timina. Padrões de *splicing* alternativo podem originar dois transcritos diferentes da CCR5: a CCR5-A e a CCR5-B, que codificam uma proteína idêntica (CCR5) em diferentes tipos celulares, variando apenas o padrão de regulação nessas células por uma variedade de sinais extracelulares, como citocinas ou quimiocinas (MUMMID *et al.*, 1997).

A proteína CCR5 é um membro da família de receptores de β -quimiocinas, que apresenta sete domínios transmembranares com características anfipáticas, semelhante aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (FEDERSPIEL *et al.*, 1993; HERZOG *et al.*, 1993; NOMURA *et al.*, 1993). Composta por 352 aminoácidos e disposta de 40,6 kDa, a CCR5 apresenta um domínio amino-terminal (N-Terminal), voltado para a superfície

extracelular, e um domínio carboxi-terminal (C-Terminal), voltado para o citoplasma da célula. A CCR5 sofre modificações pós-traducionais através de sulfatação de tirosinas, adjacentes a aminoácidos ácidos, e de O-glicosilação (acréscimo de polissacarídeo em uma hidroxila na cadeia lateral de resíduos de serina, treonina e tirosina, por exemplo) no domínio N-Terminal que favorecem sua interação com seus ligantes, como as β -quimiocinas e o HIV-1 (FARZAN *et al.*, 2000; CORMIER *et al.*, 2000). Além disso, a CCR5 apresenta 3 *loops* extracelulares (ECL1, ECL2 e ECL3) e 3 *loops* intracelulares (ICL1, ICL2 e ICL3), sendo que no ICL2 (segundo *loop* intracelular) observa-se o domínio de ligação à proteína G (Figura 7).

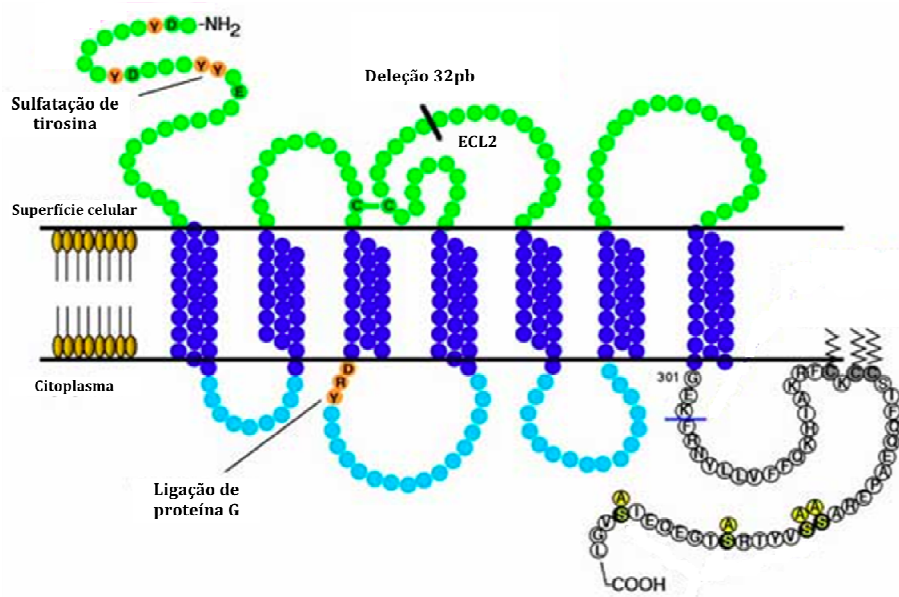


Figura 7 - Estrutura da CCR5 (adaptado de http://www.scripps.edu/newsandviews/e_20041018/enlarge.html)

A CCR5 é expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos, Células Dendríticas do tipo DC-SIGN e Células de Langerhans (CARRINGTON *et al.*, 1997; NAZARI & JOSHI, 2008). Sua expressão é regulada a curto prazo, em nível proteico, através de mecanismos como internalização, sequestro e dessensibilização, e a longo prazo, pela taxa de transcrição do gene e estabilidade do RNA mensageiro (MUMMID *et al.*, 1997). Os ligantes para este receptor incluem as β -quimiocinas MCP-2, MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES e sua ligação causa a migração de leucócitos para os sítios de inflamação (CARRINGTON *et al.*, 1997; NAZARI & JOSHI, 2008).

Uma segunda classe de ligantes para a CCR5 inclui as cepas R5 do HIV-1, através da gp210. Neste contexto, a proteína CCR5 funciona como correceptor para o vírus (DRAGIC *et al.*, 1996; DENG *et al.*, 1996). Isto pode ser confirmado pelo fato de quimiocinas como MIP - 1 α , MIP - 1 β e RANTES inibirem a infecção de células T CD4⁺ por cepas R5 do HIV-1 no estágio de entrada do vírus, bloqueando a fusão célula-célula mediada por env, por competirem pela mesma proteína, CCR5, para atuarem na célula (DRAGIC *et al.*, 1996).

Em relação ao papel apresentado pela CCR5 como correceptor para o HIV-1, sabe-se que determinadas regiões ou domínios da molécula CCR5 são importantes na interação com a gp120 viral (ATCHISON *et al.*, 1996; RUCKER *et al.*, 1996). Mais especificamente, a glicoproteína de superfície gp120 do vírus interage com a região amino-terminal (N-terminal), entre os resíduos 2 e 18, e com o segundo *loop* extracelular (ECL2) da CCR5, de forma que alterações nestes domínios podem interferir nos processos de ligação entre a CCR5 e a gp120 e de fusão da membrana do HIV-1 com a membrana celular, afetando a entrada do vírus na célula (FARZAN *et al.*, 2000; CORMIER *et al.*, 2000; LU *et al.*, 1997; BRELOT *et al.*, 1997). Por este motivo, indivíduos com padrão homozigoto mutante no gene da CCR5 (genótipo $\Delta 32/\Delta 32$) para uma deleção de 32 pares de bases, compreendida entre os nucleotídeos 794 e 825 na região do gene que codifica o segundo “*loop*” extracelular da proteína CCR5 (Figura 7), possuem resistência contra a infecção por cepas R5 do HIV-1, pelo menos por via sexual, corroborando o fato de que a CCR5 é o principal correceptor utilizado por cepas primárias do HIV-1 (SAMSON *et al.*, 1996).

Ademais, como as cepas R5 predominam durante a infecção primária do HIV-1, a CCR5 tornou-se alvo atrativo para o desenvolvimento de terapias contra a infecção por este vírus. Diferentes mecanismos têm sido elaborados para bloquear sua função como correceptor do HIV-1 ou diminuir sua expressão na superfície da célula-alvo. A terapia gênica, por exemplo, utiliza intra-quimiocinas (quimiocinas intracelulares que se ligam aos receptores de quimiocinas), para prevenir a expressão da CCR5 na superfície da célula; intra-anticorpos (fragmentos de anticorpos intracelulares) contra a região N-Terminal da CCR5, para diminuir a expressão de CCR5; e ainda pequenos RNAs de interferência (siRNA) e RNA antissense, que diminuem a síntese do correceptor (NAZARI & JOSHI, 2008).

2.2.2- MUTAÇÕES NA CCR5 E INFECÇÃO PELO HIV-1

A deleção de 32 pares de bases no gene da CCR5 (mutação $\Delta 32$) resulta em uma mudança no quadro de leitura durante a transcrição do gene e na terminação prematura da tradução do transcrito, após o aminoácido 174, afetando as últimas três regiões transmembranares da CCR5 e o sítio de ligação da proteína G, responsável pela transdução de sinais extracelulares (SAMSON *et al.*, 1996). A geração de uma proteína truncada, que não permite a fusão de células T CD4⁺ com células que expressam a gp120 viral e que pode não ancorar adequadamente na membrana da célula, seria a responsável pela resistência à infecção pelo HIV-1 nos indivíduos que apresentam esta mutação em homozigose (LIU *et al.*, 1996; SAMSON *et al.*, 1996).

Já os indivíduos que possuem essa mutação em heterozigose (CCR5/ $\Delta 32$) parecem ser parcialmente resistentes à infecção, apresentando progressão mais lenta para a AIDS, quando comparados aos homozigotos selvagens (CCR5/CCR5) (DENG *et al.* 1996; DRAGIC *et al.*, 1996; DEAN *et al.*, 1996; O' BRIEN & DEAN, 1997; DE RODAHUSMAN *et al.*, 1997). A resistência parcial atribuída à heterozigose é consequência do decréscimo do nível de expressão da CCR5 na membrana celular nesses indivíduos (LITTMAN, 1998). Na América do Sul, inclusive no Brasil, a frequência do alelo CCR5- $\Delta 32$ varia de 0 a 6,5% (PASSOS & PICANÇO, 1998; MANGANO *et al.*, 1998; DESGRANGES *et al.*, 2001; GRIMALDI *et al.*, 2002). Mais especificamente, na Bahia, a prevalência do genótipo heterozigoto (CCR5/ $\Delta 32$) foi de 5,3% em indivíduos não-infectados (GRIMALDI *et al.*, 2002).

No entanto, o alelo CCR5- $\Delta 32$ não é o único fator responsável pela modulação da infecção pelo HIV-1 através da utilização do correceptor CCR5. Até o momento, já foram descritas 25 mutações diferentes no gene *CCR5* (CARRINGTON *et al.*, 1999; O'BRIEN *et al.*, 2000; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/GeneGt.cgi?geneID=1234>) as quais apresentam distribuição geográfica e étnica diferentes (ZIMMERMAN *et al.*, 1997; O'BRIEN *et al.*, 2000). Entre estas mutações, existem determinados genótipos e/ou haplótipos que conferem ao indivíduo resistência à infecção pelo HIV-1. A mutação p.C101X, caracterizada pela criação de um códon de parada antes do terceiro domínio transmembranar da CCR5, por exemplo, gera uma proteína incapaz de mediar a entrada do HIV-1 na célula, devido a sua expressão diminuída na superfície celular, com repercussão semelhante à mutação $\Delta 32$. Logo, indivíduos que apresentam essa mutação em homozigose possuem resistência à infecção pelo HIV-1 (BLANPAIN *et al.*, 2000).

Além das mutações identificadas na região codificante, algumas mutações no promotor do gene *CCR5* podem, também, interferir no curso clínico da AIDS, conferindo ao indivíduo infectado pelo HIV-1 aceleração ou retardo da progressão para a doença, mesmo não influenciando na infecção por cepas R5 do vírus (MARTIN *et al.*, 1998). Essas mutações podem comprometer a regulação gênica, afetando a transcrição e/ou a expressão da proteína na superfície celular e, provavelmente, a patogenicidade do HIV-1 (McDERMOTT *et al.*, 1998). Algumas mutações descritas nessa região do gene como, por exemplo, a -2733A>G (29 A/G) e a -2459A>G (303 A/G), estão associadas à aceleração da progressão para a doença por acarretarem um aumento no nível de expressão da CCR5 na membrana (McDERMOTT *et al.*, 1998; CLEGG *et al.*, 2000; OMETTO *et al.*, 2001; BRUMME *et al.*, 1999; ROMAN *et al.*, 2002). Por outro lado, as variações com efeito contrário conduzem a uma progressão lenta da doença, como a mutação -1835C>T (927 C/T) (BRUMME *et al.*, 2001; LEWANDOWSKA *et al.*, 2002).

Conforme citado anteriormente, a proteína CCR5 sofre modificações pós-traducionais, como sulfatação de resíduos de tirosinas no domínio N-Terminal, que favorecem sua ligação às quimiocinas MIP1- α e MIP1- β , assim como facilitam a entrada do HIV-1 na célula hospedeira (CORMIER *et al.*, 2000; FARZAN *et al.*, 2000; HOFFMAN *et al.*, 2002; SEIBERT *et al.*, 2002). Como a região compreendida entre os resíduos 2 e 18 do domínio N-Terminal da CCR5 compõe o sítio específico de interação entre a alça V3 da gp120 do HIV-1 e a CCR5, a sulfatação das tirosinas nos aminoácidos 3, 10, 14 e 15 é importante na interação entre esse correceptor e a proteína viral e a perda de um ou mais desses grupamentos sulfato pode inibir a fusão do vírus com a célula-alvo (FENG *et al.*, 1996; FARZAN *et al.*, 1999; CORMIER *et al.*, 2000; FARZAN *et al.*, 2000). Dessa forma, mutações no gene *CCR5* que têm a capacidade de interferir na produção dos resíduos de tirosina do domínio amino-terminal da proteína podem estar relacionadas à habilidade da CCR5 em se ligar à gp120. Entretanto, novos estudos ainda questionam a possibilidade desses sítios específicos não serem os únicos responsáveis pela interação entre o correceptor e o vírus (CONNIE *et al.*, 2009). Alguns autores acreditam que a associação inicial entre a CCR5 e a gp120 é mediada pelo domínio N-Terminal deste correceptor, enquanto a maior especificidade da interação é mediada pelos demais domínios extracelulares da CCR5, principalmente o ECL2 (GERARD & GERARD, 1996; MONTECLARO & CHARO, 1996).

O domínio carboxi-terminal da CCR5 não interage diretamente com a gp120 do HIV-1 pelo fato de estar localizado no meio intracelular (Figura 7). Entretanto, tem sido sugerido

que outras modificações pós-traducionais, como a N-glicosilação (acrécimo de poli ou oligossacarídeo em um nitrogênio da cadeia lateral de resíduos de asparagina ou arginina) e a O-glicosilação da CCR5 na região C-Terminal, também podem influenciar a entrada do HIV-1 em suas células-alvo. Alterações de sítios de glicosilação podem representar consequências dramáticas para uma proteína, por afetar seu dobramento e sua conformação, interferindo em partes distantes da mesma. Dessa forma, a perda de sítios de glicosilação no domínio C-Terminal da CCR5 pode interferir na inserção da proteína na membrana celular pela geração de uma proteína que sofreu uma conformação atípica (MEUNIER *et al.*, 1998; LAND & BRAAKMAN 2001; SLATER-HANDSHY *et al.*, 2004). Além disso, demonstrou-se também que elementos críticos para a interação com o HIV-1, que funcionam como peptídeos imunogênicos, estão localizados no ECL2 do correceptor. Algumas mutações no ECL2 podem comprometer a eficiência da entrada do HIV-1 na célula-alvo, levando a uma diminuição da progressão para AIDS (GERARD & GERARD, 1996; MONTECLARO & CHARO, 1996). Ainda não há dados sobre essas mutações nas regiões do gene *CCR5* que codificam para os domínios N-Terminal, C-Terminal e ECL2 da proteína na população brasileira. Portanto, diante da realidade da infecção pelo HIV-1 e da AIDS no Brasil, essas informações podem ser importantes para o estudo do perfil epidemiológico da infecção pelo HIV-1 em nosso país.

2.3- LANGERINA

2.3.1- CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

As Células Dendríticas (DCs), células apresentadoras de antígeno profissionais, presentes nos tecidos de mucosa genital, possuem um papel importante em relação à transmissão do HIV-1 para células T CD4⁺ através de suas Lecitinas do tipo C, uma família de receptores da superfície celular que reconhecem diferentes estruturas de carboidratos com alta afinidade e que estão envolvidas em muitas funções do sistema imune, como inflamação e defesa contra patógenos invasores, como vírus (GEIJTENBEEK *et al.*, 2000; TURVILLE *et al.*, 2004; VEAZEY *et al.*, 2005).

Em tecidos de mucosa, os subtipos de DC podem ser diferenciados pela expressão de suas Lecitinas do tipo C: as Células de Langerhans (LCs) expressam, especificamente,

Langerina e as Células Dendríticas do tipo DC-SIGN (DC-SIGN⁺-DCs) expressam DC-SIGN. Tanto a DC-SIGN quanto a Langerina reconhecem estruturas de carboidratos com especificidade elevada à manose e, por este motivo, as duas Lecitinas do tipo C se ligam à gp120 do HIV-1, que apresenta uma região rica nesse monossacarídeo. Ambos os subtipos de DCs apresentam localização anatômica específica: LCs são encontradas na epiderme da pele e na maioria dos tecidos de mucosa, como a ectocérvice, epitélio vaginal, glândula peniana e prepúcio, enquanto DC-SIGN⁺-DCs são encontradas no subepitélio (Figura 8). Dessa forma, durante a transmissão sexual, as LCs são o primeiro subtipo de DCs que entram em contato com o HIV-1 em tecidos de mucosa genital intactos (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b, 2007c).

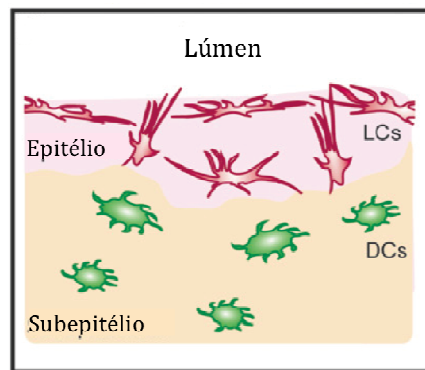


Figura 8- Localização específica das LCs e DC-SIGN⁺-DCs no tecido epitelial da mucosa genital (adaptado de DE WITTE *et al.*, 2007b)

As DCs imaturas do epitélio têm a capacidade de capturar antígenos da periferia e migrar para os linfonodos, adquirindo fenótipo maduro durante a migração. Já no tecido linfóide, as DCs maduras apresentam os antígenos processados em moléculas de MHC para células T, resultando em uma resposta imune adaptativa contra o patógeno. No caso da infecção pelo HIV-1, acredita-se que este vírus consiga desviar a função das DCs: estas capturam o HIV-1, migram para os linfonodos e, ao invés de induzir uma resposta imune eficiente contra o vírus, mediam a transmissão do HIV-1 para as células T do tecido linfóide. Entretanto, nem todos os subtipos de DC mediam a transmissão do HIV-1. Alguns estudos têm demonstrado que as LCs formam uma barreira protetora que impede a transmissão do HIV-1 para células T (ABBAS & LICHTMAN, 2005; DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b) (Figura 9).

As LCs são caracterizadas pela expressão de CD1a (molécula da família da classe I do MHC, associada à β_2 microglobulina, cuja função é a apresentação de antígenos não-peptídicos a alguns linfócitos T) e Langerina, também chamada de CD207. As LCs contêm os Grânulos de Birbeck, os quais são organelas específicas desse tipo de célula e estão relacionados com o processo de endocitose de partículas estranhas ao organismo. Neste processo, a Langerina está associada aos Grânulos de Birbeck por ser responsável pelo reconhecimento dos patógenos, direcionando-os para sua posterior e rápida degradação nos grânulos. Já as DC-SIGN⁺-DCs não possuem grânulos de Birbeck e, dessa forma, os patógenos internalizados por estas células sofrem processamento e seus antígenos são apresentados em moléculas de MHC de classe II. Além disso, tanto as Células de Langerhans quanto as DC-SIGN⁺-DCs expressam CD4 e CCR5 (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b; THÉPAUT *et al.*, 2009).

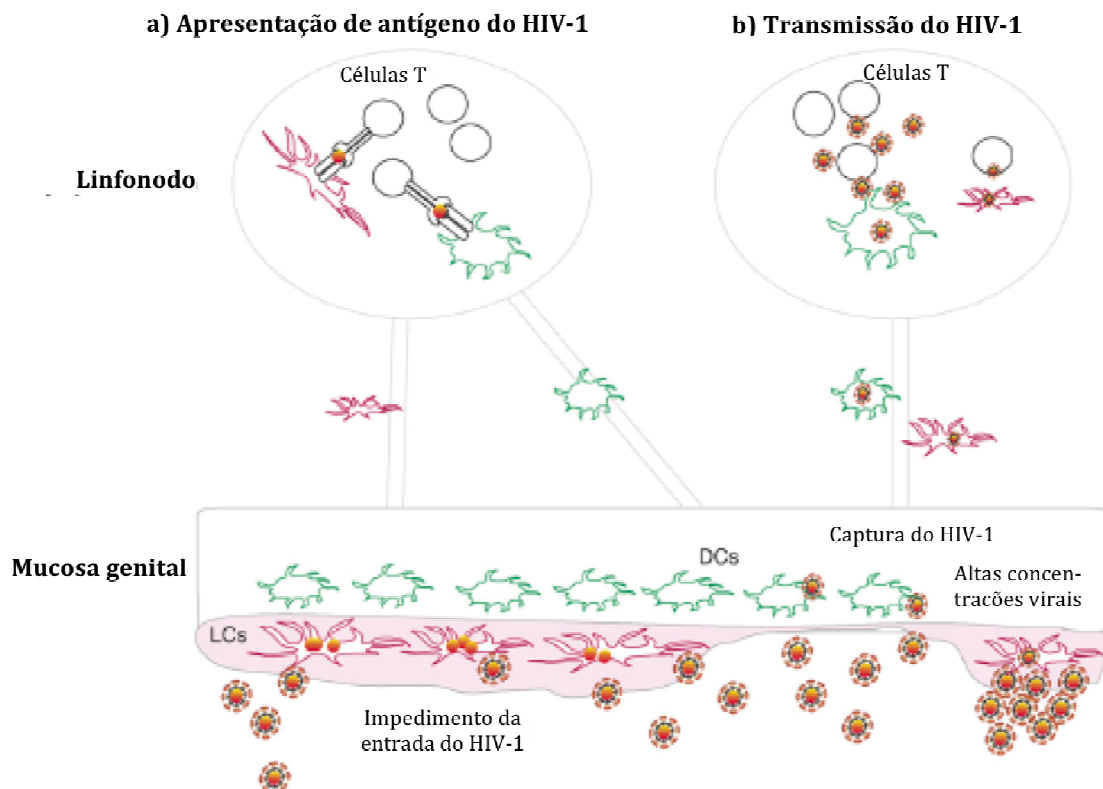


Figura 9- Papel das DCs na apresentação de antígenos e na transmissão do HIV-1 para células T (adaptado de DE WITTE *et al.*, 2007a)

As LCs contribuem com menos de 1% do total das células epiteliais. Entretanto, por possuírem longos dendritos, formarem uma rede contínua através da barreira epitelial e se

estenderem até o lúmen da mucosa são capazes de maximizar sua função de proteção (THÉPAUT *et al.*, 2009; DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b).

2.3.2- ESTRUTURA DA LANGERINA

O gene *Langerina* ou CD207 está localizado na posição 13 do braço curto do cromossomo 2 (2p13) e tem 5,6kb. Ele codifica a Lecitina do tipo C Langerina, com 328 aminoácidos, e é formado por 5 íntrons e 6 éxons, 3 dos quais codificam para o Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (CRD) (VALLADEAU *et al.*, 2002).

A Langerina (CD207) é um receptor da superfície celular do tipo II, transmembranar, encontrada exclusivamente em Células de Langerhans. É observada tanto na membrana plasmática quanto em endossomos primários e está associada com os Grânulos de Birbeck (STAMBACH & TAYLOR, 2003). A proteína Langerina é uma Lecitina do tipo C que se liga a carboidratos de maneira Cálcio-dependente através do Domínio de Reconhecimento de Carboidratos (CRD). É caracterizada por uma região extracelular que consiste de um domínio N-Terminal (domínio “*Neck*”) e um domínio C-Terminal com um CRD somados às porções transmembranar e intracelular. O domínio N-Terminal da Langerina media a formação trimérica, enquanto o domínio CRD se liga, preferencialmente, à manose, à *N-acetilglicosamina* e à fucose, por conter o trio de aminoácidos Glutamato-Prolina-Asparagina (Glu-Pro-Asn) (McGREAL *et al.*, 2004; TADA *et al.*, 2006). O domínio citoplasmático da Langerina aparenta estar envolvido na internalização dos ligantes externos, apesar de não apresentar os motivos de internalização identificados em outros receptores endocíticos (WARD *et al.*, 2006).

Como outras Lecitinas do tipo C, a Langerina existe como um oligômero, formando trímeros estabilizados por α -hélices no domínio “*Neck*”. A formação de trímeros é essencial para a ligação de oligossacarídeos uma vez que o CRD da Langerina apresenta baixa afinidade por monossacarídeos. A oligomerização ocorre entre os CRDs de três monômeros de Langerina, com participação dos domínios “*Neck*” (Figura 10). Esta oligomerização também é importante para a determinação da especificidade e da afinidade por estruturas particulares de oligossacarídeos endógenos e exógenos, como a região rica em manose da gp120 do HIV-1 (FEINBERG *et al.*, 2010). Por esse motivo, a Langerina é o principal

receptor de antígenos glicoprotéicos nas LCs, induzindo a formação de Grânulos de Birbeck (STAMBACH & TAYLOR, 2003).

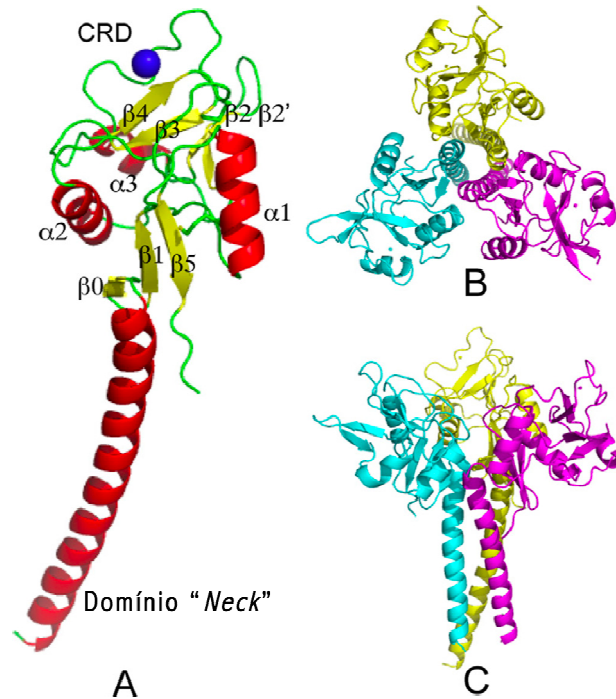


Figura 10 – Diagrama da estrutura da Langerina. A, estrutura secundária de um monômero de Langerina com o CRD e o Domínio “Neck”. As α -hélices estão mostradas em *vermelho*; as folhas β , em *amarelo*; os *loops*, em *verde*. O íon Ca^{2+} está mostrado como a esfera azul. B, vista de cima da estrutura trimérica da Langerina. Cada cor (amarelo, rosa e azul) representa um monômero. C, vista lateral do trímico (adaptado de STAMBACH & TAYLOR, 2003).

2.3.3- PAPEL DA LANGERINA NA INFECÇÃO PELO HIV-1

A principal forma de infecção pelo HIV-1 ocorre através da transmissão sexual mediante contato do vírus com o tecido epitelial genital. Entretanto, os eventos que ocorrem desde o momento em que o vírus encontra a barreira do epitélio genital até a produção de uma infecção sistêmica permanecem apenas parcialmente compreendidos. Neste contexto, um melhor entendimento dos mecanismos que controlam a transmissão do HIV-1 é crucial para o desenvolvimento de estratégias para prevenir novas infecções pelo vírus (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b; SCHWARTZ, 2007; VAN DER VLIST & GEIJTENBEEK, 2010;).

Conforme citado anteriormente, as LCs são as primeiras células que entram em contato com o HIV-1 durante sua transmissão sexual em tecido de mucosa intacto. Uma vez que essas células têm a capacidade de internalizar a maior quantidade de vírus, via Langerina, e degradá-lo em grânulos de Birbeck, entende-se que a camada epitelial pode funcionar como uma importante barreira contra a infecção pelo HIV-1, reduzindo sua transmissão. Entretanto, é importante citar que uma pequena fração das partículas virais pode escapar da degradação nos grânulos de Birbeck e ser transmitida para os linfócitos T nos linfonodos (Figura 11) (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b; SCHWARTZ, 2007; VAN DER VLIST & GEIJTENBEEK, 2010;).

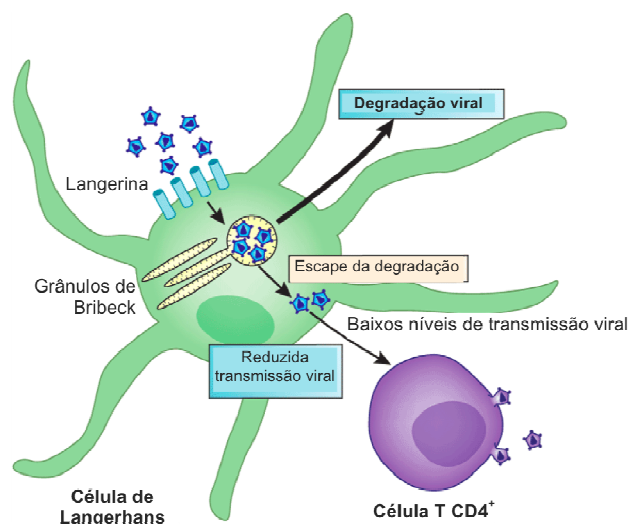


Figura 11- Papel da Langerina e dos Grânulos de Birbeck na infecção pelo HIV-1 (adaptado de SCHWARTZ, 2007)

Além disso, a transmissão do HIV-1 é aumentada em condições de trauma ou ulceração ânus-genital que danificam a camada do epitélio rica em LCs e permitem o acesso do HIV-1 ao subepitélio rico em DC-SIGN⁺-DCs. Como as DC-SIGN⁺-DCs não apresentam grânulos de Birbeck, elas são responsáveis pelo processamento do HIV-1 e pela transmissão para as Células T CD4⁺ nos linfonodos. Dessa forma, o vírus pode encontrar diferentes subtipos de DCs, a depender do sítio de infecção e de outros fatores, como a integridade da camada epitelial (Figuras 9 e 12) (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b).

Outro aspecto importante em relação ao papel das LCs na infecção pelo HIV-1 é que, em cargas virais elevadas ou durante um bloqueio da Langerina através de drogas

específicas, co-infecções ou mutações, por exemplo, o HIV-1 pode ser internalizado via CD4/CCR5, sendo processado e transmitido para as Células T CD4⁺ nos linfonodos (Figuras 9 e 13) (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b). Assim, uma infecção realizada com baixa carga do HIV-1, em tecido de mucosa intacto onde a Langerina apresenta sua função também intacta, pode ser controlada, e até mesmo evitada, devido à destruição do vírus nos grânulos de Birbeck presentes nas Células de Langerhans.

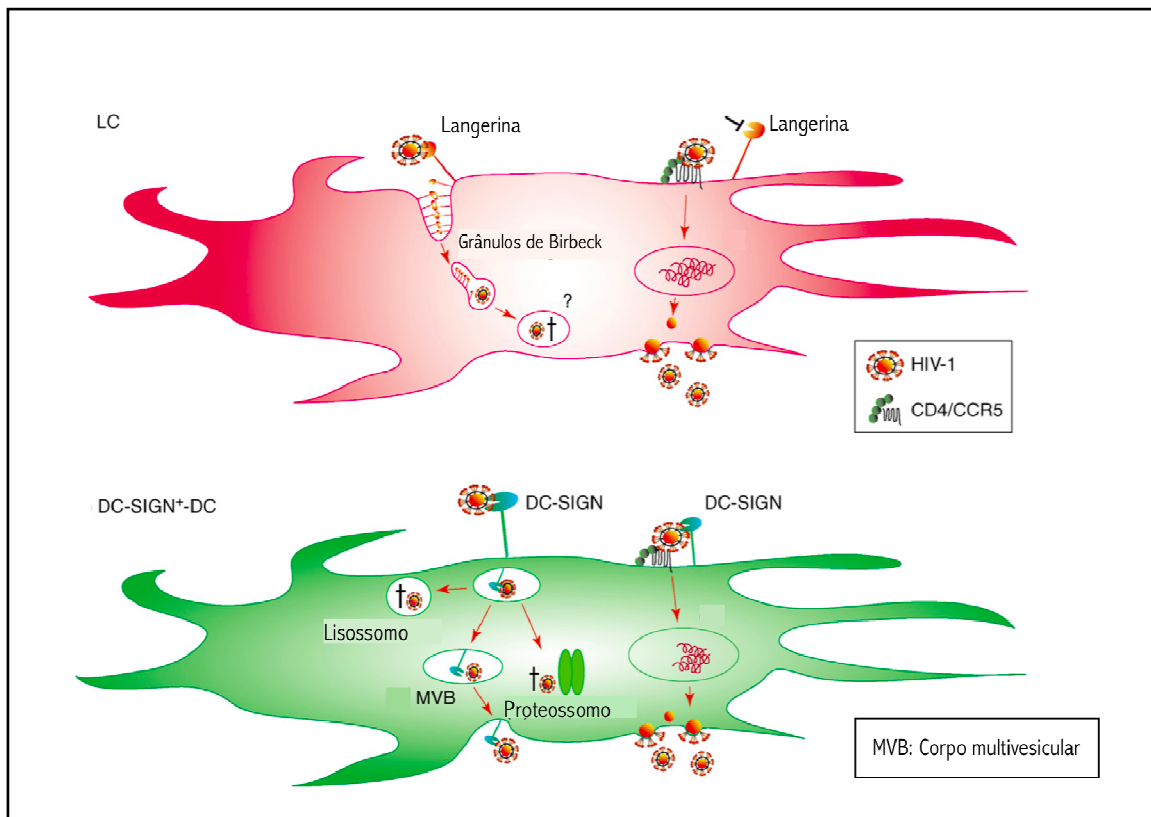


Figura 12- Diferentes formas de interação entre LCs e DC-SIGN⁺-DCs e o HIV-1 (adaptado de DE WITTE *et al.*, 2007b)

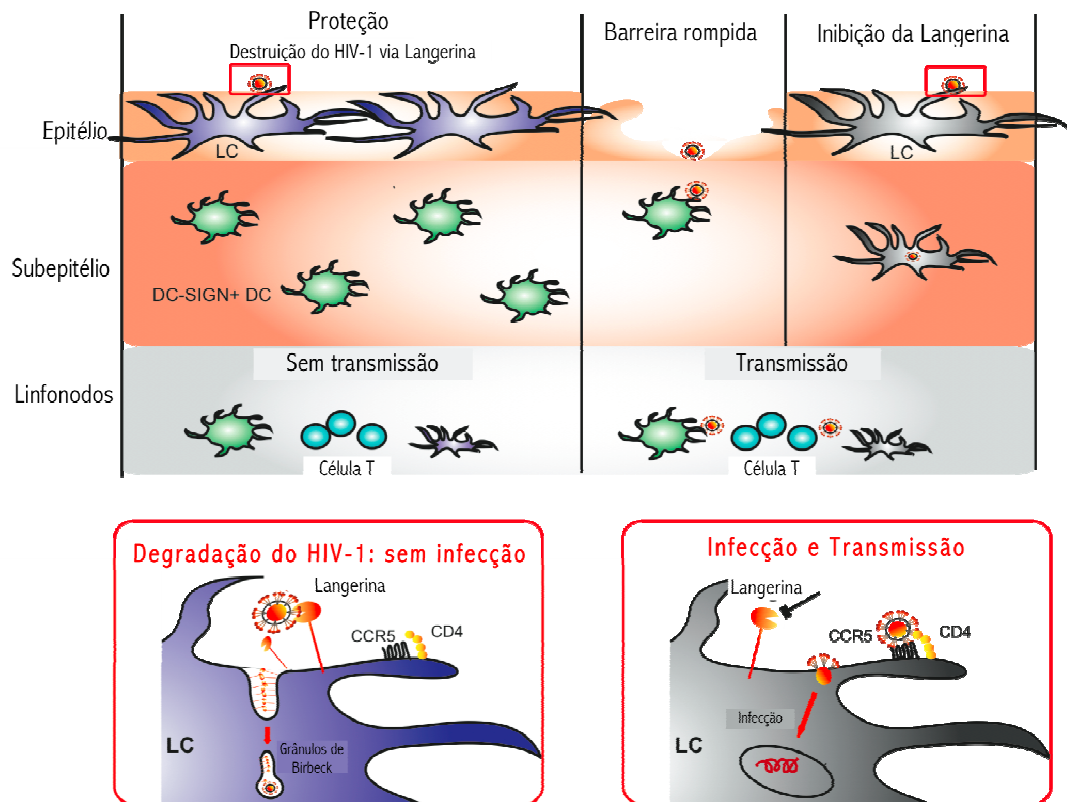


Figura 13- Diferentes subtipos de DCs no epitélio e o subepitélio de mucosa e suas participações na infecção pelo HIV-1 (adaptado de DE WITTE *et al.*, 2007a)

2.3.4- MUTAÇÕES NA LANGERINA E INFECÇÃO PELO HIV-1

Alguns estudos têm demonstrado que mutações e/ou polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) no gene da Langerina podem resultar em deficiência dos Grânulos de Birbeck ou perda da atividade de ligação à manose e a oligossacarídeos apresentada por esta proteína (VERDIJK *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2006).

A troca de uma timina (T) por uma citosina (C) na posição 837 do gene da Langerina, mais especificamente no éxon 5 deste gene, foi identificada em um indivíduo com o genótipo heterozigoto (T/C), que apresentava deficiência dos Grânulos de Birbeck. Tal substituição pontual leva à troca do triptofano (W) pela arginina (R) no aminoácido 264 da proteína (mutação p.W264R), afetando um resíduo altamente conservado no CRD da Langerina, o que, por sua vez, abole a capacidade de ligação da proteína a oligossacarídeos. Além disso, a expressão da Langerina com a mutação p.W264R em fibroblastos induziu a formação de estruturas tubulares que não eram reconhecidas por anticorpos anti-Grânulos de Birbeck e

que não tinham os padrões estruturais característicos destes Grânulos. Como esta mutação aboliu completamente a ligação a oligossacarídeos pela Langerina, é possível que a ligação a um carboidrato seja requerida para a formação dos Grânulos de Birbeck (VERDIJK *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2006).

Até o momento, já foram descritas 175 variantes, algumas destas polimórficas, no gene humano da Langerina. Desse total, 3 SNP que resultam em mudanças de aminoácidos no CRD da Langerina (p.A278V, p.N288D e p.A300P) já foram analisados funcionalmente. Os SNP p.A300P e p.N288D reduziram a habilidade da Langerina de interagir com glicoconjugados encontrados na superfície de microorganismos, apesar dos mecanismos para diminuição na atividade de ligação a oligossacarídeos serem diferentes para as duas variantes. Em relação à mutação p.A300P, a atividade de ligação é reduzida como resultado indireto da diminuição da estabilidade do CRD devido à ruptura do núcleo deste domínio. Já a mutação p.N288D, observada na superfície do CRD, apresentou um efeito mais local na estrutura ao redor do sítio de ligação à manose. Apesar de nenhuma destas variantes abolirem a habilidade da Langerina de endocitar seus ligantes, parece que as interações da Langerina com estes ligantes, tais como patógenos, poderiam ser prejudicadas por estas mudanças. Em contraste, a mutação p.A278V não teve alterada sua atividade de ligação a oligossacarídeos (WARD *et al.*, 2006).

Estas variantes, observadas no gene humano da Langerina e que podem levar às diferenças na estabilidade do CRD e na atividade de ligação a oligossacarídeos, podem ter implicações na susceptibilidade a infecções de indivíduos com certos haplótipos da Langerina. No caso da infecção pelo HIV-1, mutações no gene da Langerina que, como consequência, afetam a estrutura do CRD, podem interferir na ligação da gp120 a esta proteína, impedindo a entrada do vírus via Langerina. Desta forma, o HIV-1 entraria nas LCs através do complexo CD4/CCR5 e seria, posteriormente, transmitido para as células T CD4⁺ dos linfonodos.

Além das mutações identificadas na região codificante, algumas mutações no promotor do gene da proteína Langerina podem também interferir na infecção pelo HIV-1. Estas mutações, conforme citado anteriormente em relação à CCR5, podem comprometer a regulação gênica, afetando a transcrição e/ou a expressão da proteína na superfície celular e, provavelmente, a entrada do HIV-1 na célula por comprometerem o nível de expressão da Langerina na membrana. Apesar de poderem apresentar efeitos interessantes em relação à

expressão da Langerina, mutações na região promotora deste gene ainda não foram estudadas em associação com a infecção pelo HIV-1, assim como variações na região codificante do CRD da proteína não foram avaliadas em relação à infecção por este vírus.

3.0- OBJETIVOS

Objetivo geral: Analisar mutações nos genes da CCR5 e da Langerina e suas possíveis associações com a infecção pelo HIV-1.

Objetivos específicos:

- Verificar a existência de variações nas regiões do gene da CCR5 que codificam para os domínios N-terminal e C-terminal da proteína em indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1;
- Caracterizar, *in silico*, as possíveis variações encontradas no gene da CCR5 quanto à perda ou ao ganho de sítios de O-glicosilação e de outras modificações pós-traducionais, quanto ao perfil físico-químico e à alteração de domínios protéicos, da estrutura secundária e dos modelos tridimensionais da proteína;
- Verificar as possíveis relações existentes entre as variações encontradas no gene da CCR5 e a infecção pelo HIV-1
- Verificar a existência de variações na região promotora do gene *Langerina* e na região codificante do Domínio de Reconhecimento de Carboidratos da Langerina em indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1;
- Caracterizar, *in silico*, as possíveis variações encontradas na região codificante do Domínio de Reconhecimento de Carboidrato da Langerina quanto à perda ou ao ganho de sítios de O-glicosilação e de outras modificações pós-traducionais, quanto ao perfil físico-químico e à alteração de domínios protéicos e da estrutura secundária da proteína;
- Avaliar as consequências das possíveis variações encontradas na região promotora da Langerina;
- Verificar as possíveis relações existentes entre as variações encontradas no gene da Langerina com a infecção pelo HIV-1.

4.0- JUSTIFICATIVA

As variações na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e no nível de replicação viral pós-infecção apresentadas por diferentes indivíduos podem ser decorrentes tanto de fatores virais quanto de fatores intrínsecos do próprio hospedeiro. Alguns destes fatores relacionados ao hospedeiro já foram identificados como tendo um papel determinante na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e na evolução para a AIDS em indivíduos infectados. Entretanto, é possível que existam outros fatores relativos ao hospedeiro, ainda desconhecidos, que estejam relacionados com o controle da infecção. Por estes motivos e, considerando também que a epidemia de HIV/AIDS é um sério problema de saúde pública em nosso país, é de grande importância obter melhor conhecimento a respeito da influência das variações genéticas humanas na infecção pelo HIV-1 e a progressão para a AIDS (LIU *et al.*, 1996; SCHMITZ *et al.*, 1999; FELLAY *et al.*, 2007; KAWASHIMA *et al.*, 2009; ROGERS *et al.*, 2010).

Neste âmbito, muitos trabalhos têm demonstrado a existência de associação entre mutações em genes humanos, manifestação de doenças e influência em infecções virais (YOSHIKAWA *et al.*, 2002; LICASTRO *et al.*, 2003; SABOURI *et al.*, 2004). No caso da infecção pelo HIV-1, sabe-se que a proteína CCR5 funciona como um correceptor para as cepas R5 do vírus e que algumas mutações na região promotora e em regiões codificantes do gene humano da CCR5 têm influência tanto na infecção pelo vírus quanto na progressão para a AIDS. Estas mutações têm potencial para modular a expressão gênica por localizarem-se em sítios de ligação a fatores de transcrição ou por gerarem uma proteína truncada, podendo influenciar a expressão da proteína CCR5 na célula, levando a uma alta ou baixa produção proteica. Estes diferentes fenótipos de produção da proteína podem estar relacionados à funcionalidade da mesma e afetar seu papel na membrana celular, tanto em relação a sua ligação às β -quimiocinas, sua função primordial, quanto em relação ao seu papel na entrada do HIV-1 na célula. Além disso, a CCR5 sofre modificações pós-traducionais em aminoácidos, presentes nos seus domínios N e C-Terminal, que são necessárias à interação desta proteína com a gp120 do HIV-1, permitindo a fusão das membranas celular e do vírus e a posterior infecção da célula-alvo. Dessa forma, mutações no gene *CCR5* que têm a capacidade de interferirem na produção dos resíduos de aminoácidos dos domínios amino-terminal e carboxi-terminal da proteína podem estar relacionadas à habilidade da CCR5 em

se ligar a gp120 e afetarem a entrada do vírus (SAMSON *et al.*, 1996; FARZAN *et al.*, 2000; O'BRIEN & MOORE, 2000; SLATER-HANDSHY *et al.*, 2004;).

A proteína Langerina, encontrada exclusivamente nas LCs, apresenta um importante papel em relação à transmissão sexual do HIV-1 por ter a capacidade de se ligar à gp120 do vírus, através de seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), internalizá-lo em Grânulos de Birbeck, os quais degradam a partícula viral, inibindo a apresentação do HIV-1 para os Linfócitos T (DE WITTE *et al.*, 2007a, 2007b). Por conseguinte, a Langerina de LC de mucosa íntegra funciona como um mecanismo protetor contra a infecção por cepas R5 do HIV-1. Diferenças na função da Langerina devido a fatores genéticos do hospedeiro, como mutações na região codificante do CRD proteico e no promotor do gene da Langerina, podem influenciar na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 por terem a capacidade de interferirem na estabilidade do CRD e na expressão da proteína na membrana das LCs, respectivamente. (WARD *et al.*, 2006).

Embora os fatores genéticos do hospedeiro sejam importantes na pesquisa básica do HIV/AIDS, há poucos relatos sobre a frequência de mutações no gene da CCR5 entre as populações de indivíduos infectados e não infectados pelo HIV-1 no Brasil. Até o momento não existe nenhum estudo publicado em relação a mutações no gene da Langerina nem nas regiões N-terminal e C-terminal da CCR5 em populações brasileiras. Uma caracterização das modificações do correceptor CCR5 e do gene da Langerina de pacientes infectados oriundos da população em geral pode nos levar a entender melhor o mecanismo de infecção pelo HIV-1 e o desenvolvimento da AIDS. Portanto, pesquisar a influência dos fatores genéticos do hospedeiro na infecção pelo HIV-1 é de fundamental importância para a elaboração de novas formas terapêuticas, preventivas e profiláticas para o tratamento da AIDS.

5.0- RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em três seções subseqüentes:

- Capítulo I, referente à submissão para publicação de artigo científico contendo os resultados das análises do gene da CCR5, intitulado “*New amino-terminal CCR5 mutation can affect HIV-1 infection*”;
- Capítulo II, referente à submissão para publicação de artigo científico contendo os resultados das análises do gene da Langerina, intitulado “*Polymorphisms at Langerin gene and HIV-1 infection*”;
- Análises complementares, referentes ao perfil epidemiológico da população de indivíduos infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia.

5.1- CAPÍTULO I

New amino-terminal CCR5 mutation can affect HIV-1 infection

COSTA G.C.S., JESUS J.G., CARDOSO J.F., NUNES M.R.T, SOUSA E.C., SANTOS E.S.,
GALVÃO-CASTRO B., GONÇALVES M.S., ALCANTARA L.C.J.

O fato da proteína CCR5 ser o principal correceptor para as cepas R5 do HIV-1 somado com a descrição prévia na literatura de mutações na CCR5 que interferem na infecção e na patogênese do HIV-1, tornam o estudo de variações no gene humano da CCR5 uma ferramenta importante na busca pelo entendimento dos mecanismos de infecção e do desenvolvimento da AIDS. O presente trabalho trata da investigação de mutações nas regiões do gene da CCR5 que codificam para os domínios amino e carboxi-terminal da proteína em indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1 da Bahia. A identificação de mutações ainda não descritas na literatura, nas regiões supracitadas do gene *CCR5*, podem apresentar uma relação tanto com a infecção pelo vírus quanto com a progressão para a AIDS nos indivíduos analisados pelo fato de poderem interferir, de alguma maneira, na expressão e na conformação da CCR5 e até na ligação com a gp120 do HIV-1. Devido a esta última característica, as seqüências obtidas das regiões estudadas do gene da CCR5 foram avaliadas em busca de variações que poderiam alterar a estrutura da proteína, seus perfis físico-químicos e sua conformação proteica, podendo afetar, conseqüentemente, a afinidade de ligação com a gp120 viral e a infecção pelo HIV-1.

New amino-terminal CCR5 mutation can affect HIV-1 infection

Giselle Calasans de Souza Costa^{1,2}, Jaqueline Goes de Jesus^{1,2}, Jedson Ferreira Cardoso³, Marcio Roberto T. Nunes³, Edivaldo Costa Sousa Júnior³, Edson Santos², Bernardo Galvão Castro Filho^{1,2}, Marilda S. Gonçalves^{1,4}, Luiz Carlos Junior Alcantara^{1,2}.

Author's affiliation: ¹ Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil; ² Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Bahia, Brazil; ³ Bioinformatic Core, Center for Technological Innovation, Evandro Chagas Institute, Brazil; ⁴ Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

Corresponding author:

Luiz Carlos Junior Alcantara, Ph D

Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil - 40296-610.

Telephone # 55 71 3176 2255

Fax # 55 71 3176 2300

E-mail: lalcan@bahia.fiocruz.br

Running title: New CCR5 mutation and HIV-1 infection.

Abstract

Genetic factors from HIV-1 host can affect the rate of progression to AIDS and HIV infection. Tyrosine sulfatation and O-glycosilation at N-terminal domain of CCR5 (HIV-1 coreceptor) are crucial for mediating interactions with HIV-1 envelope protein. In addition, some mutations at C-terminal domain of CCR5 can be responsible for an atypical protein conformation and finally to an improperly attachment at the cell membrane. In order to better understand mechanisms of HIV-1 infection and AIDS development related to the host genetics, regions of *CCR5* gene that encode to N- and C-terminal protein domains were sorted for mutations in 118 and 120 HIV-1 infected individuals and in 197 and 128 non-infected individuals, respectively, by sequencing. Physico-chemical, CCR5 modeling and potential protein domain analyses were also performed. The studies into N-terminal protein domain revealed a new *missense* mutation at aminoacid 55 (p.L55Q), only in HIV-1 non-infected individuals, with allelic frequency of 1.8%. Physico-chemical analysis revealed that this mutation magnified the flexibility and accessibility profiles and the modeling of CCR5 structures showed that this mutation resulted in a small deviation to the right, as well as, a hydrophobic to hydrophilic property alteration. The p.L55Q mutation resulted in a light modification of the eletrostatic load of this region. When HIV-1 infected and non-infected groups were compared, allelic and genotypic frequencies of the p.L55Q mutation were statistically significant ($p=0.0395$ and 0.036 , respectively). Three novel silent mutations were found at coding region of C-terminal protein domain in the HIV-1 infected individuals: c.3,765C>T, c.3,777A>T and c.3,831A>G. These results suggest that the p.L55Q mutation can affect HIV-1 infection through CCR5 entry.

KEY WORDS: HIV-1, CCR5, MUTATIONS.

Introduction

The HIV-1 entry into target cells requires sequential interactions among the surface subunit (gp120) of the viral envelope glycoprotein (Env), the cellular receptor (the CD4 molecule) and the chemokine receptors (CCR5 or CXCR4), that act as coreceptors¹⁻³. CCR5-using viruses (R5-tropic strains) cause the majority of new infections and predominate during the early and chronic phases of HIV-1 infection, whereas variants that use CXCR4 (X4-tropic or R5/X4- dual tropic strains) emerge late in infection, coincident with the decline of immune function, and contributing to more rapid disease progression^{1, 4-5}. The gp120 of R5-tropic isolates interacts with the N-terminus and the second extracellular loop (ECL2) of the CCR5 coreceptor, whereas the Env from X4-tropic viruses interacts with the first and second extracellular loops (ECL1 and ECL2, respectively) of the CXCR4 coreceptor⁶⁻⁷.

The mechanisms underlying HIV-1 infection and pathogenesis require a combination of viral and host factors. Concerning to that, the CCR5 coreceptor is essential at initial steps of HIV-1 infection, in all routes of transmission, and then, it has an important role at the disease progression^{1, 8-9}. Individuals carrying the CCR5 Δ 32 allele are resistant to R5- and R5/X4- HIV-1 strains. This mutation results in frameshift and generates a truncated protein that cannot be exported to the cell surface, resulting in reduced receptor expression at the cell membrane¹⁰⁻¹². Besides CCR5 Δ 32 mutation, other mutations that lead to posttranslational modifications, like tyrosines sulfatation and O-glycosilation of the amino terminus (N-terminus) domain of CCR5 can affect the R5-HIV-1 strains entry into the target cells. The tyrosine sulfatations, at positions 10 and 14, of CCR5 N-terminal domain facilitate the HIV-1 entry because they contribute in the recognition of the CCR5 binding region at the HIV-1 gp120^{3, 13-17}. Glycosylation of CCR5 may also play some role in modulating the efficiency of HIV-1 entry at specific target cells¹⁶. In addition, some mutations at carboxi terminus (C-

terminus) domain of CCR5 can impact the protein folding and conformation, generating an atypical protein that may not anchor properly at the cell membrane affecting the virus entry¹⁸.

In order to better understand the host genetics mechanisms of HIV-1 infection and AIDS development, the regions of *CCR5* gene that encodes the N- and C-terminal protein domains were sorted for mutations, in HIV-1 infected and non-infected individuals, that could affect HIV-1 infection.

Materials and methods

Study population

HIV-1 infected individuals: The regions of *CCR5* gene that encodes the N-terminal and C-terminal protein domains were studied in a convenience sample of 118 and 120 HIV-1 infected individuals, respectively, followed at the Reference Center for Sexual Transmitted Disease (RCSTD)/AIDS of Feira de Santana, Bahia, Brazil. During 2007, blood samples were collected and then processed at the Advanced Laboratory of Public Health (LASP)/CPqGM/FIOCRUZ in Bahia, Brazil. This population was comprised of 114 women, recruited during gynecological follow-up, and 6 children (2-11 years, all infected through mother-to-child transmission). The ages ranged from 20 to 73 years among women (mean=37.9 years). Clinical and epidemiological data were obtained from medical records. Informed consent was obtained from the patients and/or the children's parents or guardians.

Control group: A total of 197 DNA samples from HIV-1 non-infected individuals were randomly selected to obtain control frequency, including: 104 samples consisted of volunteers with median age of 25 ± 15.2 years, 50 males and 54 females attended at the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Bahia, Salvador for laboratory analysis; and 93 samples selected from sentinel surveillance areas of Salvador, Bahia, previously established for the investigation of various infectious diseases¹⁹. The 93 samples from sentinel surveillance areas of Salvador were used to study, at first, both *CCR5* regions. Concerned to the region of *CCR5* gene that encodes the N-terminal domain, all the samples from the Faculty of Pharmacy were also analyzed. However, concerned to the region of *CCR5* gene that encodes the C-terminal domain, it was studied only 35 samples from the Faculty of Pharmacy due to the results initially observed. All analyses were performed separately in the control group from Faculty of Pharmacy of the Federal University of Bahia

and from the sentinel surveillance areas of Salvador. There were no differences at genotypic and allelic frequencies of the *CCR5* gene mutations detected when these populations were stratified (data not shown). For this reason, the HIV-1 non-infected individuals from the two control groups were compiled and studied in the same reference group.

The local ethical committee's approval was obtained and all subjects provided written informal consent.

DNA extraction and mutation detection: Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). The analyses of the N- and C-Terminal region of the CCR5 protein were performed through PCR amplification of the gene corresponding region (300bp and 344bp, respectively) followed by sequencing. The primers constructed for these analyses were: 5'TTTGCATTCATGGAGGGCA3' and 5'TGGCCAGGTTGAG CAGGTAG3', for the N-terminal region, and 5'TCTCTTCTGGGCTCCCTACA3' and 5'CCAGCCCACTTGAGTCCGTG3', for the C-Terminal region. All sequences obtained were analyzed with the SeqScape program (Applied Biosystems) and the nucleotide variations observed at the sequences were confirmed using the BioEdit²⁰ and GeneDoc²¹ Programs.

Physico-chemical and potential protein domain analyses: In order to investigate possible influences of mutations, the physico-chemical analyses of the *missense* mutations observed in the sequences was performed using the Network Protein Sequence Analysis (NPSA) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>)²². Sulfatation and O-glycosilation sites and other post-translational

modification sites were identified using the Prosite tool implemented in the GeneDoc software. The potential protein domain analysis was performed using the Pfam database²³. Finally, the SWISS-MODEL online tool (<http://swissmodel.expasy.org/>)²⁴ was used as a fully automated protein structure homology-modeling server, to infer about possible influence of the amino acid changes at protein secondary structure.

Homology Modeling of CCR5: The Homology Model of Human CCR5 was generated using the Modeller 9.10 software²⁵ with the crystal structure (PDB: 3EML) as Template chosen from PDB BLAST hit (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home>). The obtained model was validated using Procheck software²⁶.

Statistical Methods: The allelic frequencies were estimated by direct allele counting. The conformity with Hardy-Weinberg equilibrium and existence of linkage disequilibrium were tested using the Genepop v.3.4²⁷. The heterogeneity between population samples was evaluated by Fisher's exact test or by χ^2 test using the BioEstat v.5.0 program²⁸. The median HIV-1 virus load and CD4 counting in infected patients was also calculated using the BioEstat v.5.0 program. A p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The HIV-1 infected individuals consisted of 114 women and 6 children. Concerned to the time of antiretroviral (ARV) treatment, the appearance of HIV-1 constitutional symptoms, viral load and CD4 T cell counting, they showed high heterogeneity into the group. The median HIV-1 viral load was 754 ± 40.02 copies/ml and the median CD4 T cell counting of the HIV-1 infected individuals was $437 \text{ cells}/\mu\text{l} \pm 99.87$. Eighty-eight (73.3%) patients were under ARV therapy, while 24 (20.0%) were therapy naive. Eight patients did not have available data in medical records.

The CCR5 N-Terminal domain study revealed a novel *missense* mutation at 165 position of the *CCR5* gene in 7 samples from HIV-1 non-infected individuals (allelic frequency of 1.8%), characterized by a substitution of a Thymine nucleotide to an Adenine nucleotide, which results in a change of a Leucine aminoacid to the Glutamine aminoacid (p.L55Q mutation) at 55 position of CCR5 protein. The p.L55Q mutation was not observed in HIV-1 infected individuals and the physico-chemical analysis revealed that this mutation magnified the flexibility and accessibility profiles. When the mutant protein sequence was submitted to potential protein domain analysis to investigate if the p.L55Q mutation had changed any signature into the N-Terminal protein domain, we did not observe any modification. Also, this mutation did not change any post-translational modification site and it did not influence the prediction of the protein secondary structure. When HIV-1 infected and non-infected individuals were compared, it was observed a statistically significant difference in the allelic ($p=0.0395$, $\chi^2=4.24$) and genotypic frequencies ($p=0.036$, $\chi^2=4.329$) from the p.L55Q mutation (Table 1).

The Homology Model of Human CCR5 generated the final stable CCR5 structure (Figure 1). After the refinement process, validation of the CCR5 Models with mutant and

wild residues was carried out using Ramachandran plot calculations. Altogether 90.1% and 87.6% of the residues from mutant and wild models, respectively, were in favored and allowed regions, demonstrating that both models have a good stereochemistry quality (Figure 2). Overlapped structures showed that there was small deviation to the right, as well as, a hydrophobic to hydrophilic property alteration (Figure 3). The p.L55Q mutation resulted in a light modification of the electrostatic load of this region (Figure 4).

The study from the coding region of the CCR5 C-terminal protein domain revealed three novel silent mutations in the studied individuals (c.3,765C>T, c.3,777A>T and c.3,831A>G), which characterized this *CCR5* gene region as more divergent than the encoding region of the N-Terminal protein domain. Except for the c.3,831A>G mutation, the other mutations were considered as polymorphic sites in the studied populations (Table 1).

Genotypic and allelic frequencies of the analyzed sites did not differ significantly from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium ($p=1.00$, $\chi^2=0.0001$). It was not observed any linkage disequilibrium between the found mutations when infected and non-infected individuals were compared together or as separate groups ($p=1.00$, $\chi^2=0.0001$).

Discussion

Viral and host factors have been associated with variations in the infection susceptibility and post-infection replication level at different HIV-1 infected individuals. Some of these host factors have already been identified as determinant in HIV-1 infection susceptibility and AIDS progression. However, it is possible that others not identified host factors are related to the infection control highlighting that human genetics variations studies are an useful tool in the knowledge of HIV-1 infection and AIDS progression^{12, 29-32}.

At this context, many studies have demonstrated an association between mutations at human genes, diseases manifestation and viral infections influence³³⁻³⁵. Related to the HIV-1 infection, the chemokine receptor CCR5 act as the coreceptor for R5-tropic strains and some mutations at promoter and encoding regions of *CCR5* gene influence the virus infection and/or AIDS progression. These mutations could affect the CCR5 protein expression in the cell leading to a high or low protein production phenotype and they can also change the protein structure, which could be related to its functionality and affect its activity at cell membrane. Besides, CCR5 protein suffers post-translational modifications at specific aminoacids at its amino and carboxi domains, that are important for the interaction between this coreceptor and HIV-1 gp120, leading to the membranes fusion and the posterior target cell infection. So, *CCR5* gene mutations that change N- and C-Terminal amino acids could interfere in the CCR5 ability to bind gp120 and affect HIV-1 entry^{10, 36-38}. Regard to the HIV-1 infection, this is the first study that analyzes mutations at coding regions of CCR5 N and C-terminal protein domains and virus infection susceptibility in Brazilian population.

The novel p.L55Q mutation, observed at N-terminal domain of the CCR5 protein, is characterized by a change from a nonpolar aminoacid (Leucine or L) to a polar aminoacid (Glutamine or Q), which did not modify any post-translational modification site. The

physico-chemical analysis revealed that the mutated allele of p.L55Q mutation was more flexible than the wild allele and the modeling results demonstrated that this mutation altered the CCR5 3D structure. Altogether, these results could indicate that, since this mutation is placed next to the region that interact with the HIV-1 gp120, which comprehends the aminoacids 2 to 18 of the N-terminal domain, this aminoacid change interfered in the CCR5 N-terminal conformation, possibly affecting the interaction region and the gp120 binding.

As p.L55Q mutation was observed only in HIV-1 non-infected individuals and our results demonstrated an statistically significant difference between allelic and genotypic frequencies from p.L55Q mutation, it is suggestive that the 55 aminoacid change in the CCR5 N-terminal domain could interfere in HIV-1 entry through CCR5 coreceptor. However, to confirm these results more studies should be taken comparing the frequency of the mutant allele in a subset of exceptional individuals which deviate from the expected response to HIV exposure, such as: long-term non-progressors (LTNP), who maintain stable CD4 levels and low virus load for ten or more years; fast progressors (FP), who cannot control viremia and develop AIDS within three years of infection³⁹ and elite controllers (EC), who control HIV replication to <50 copies/ml⁴⁰.

The three mutations (c.3,765C>T, c.3,777A>T and c.3,831A>G) observed at *CCR5* gene region that codifies to the C-terminal protein domain do not cause any aminoacid change in the protein sequence. The number of mutations detected at this region of the *CCR5* gene shows that it is more divergent than the encoding region of N-terminal protein domain suggesting that the C-Terminal CCR5 domain suffers a minor positive selective pressure when compared to the N-Terminal domain, probably, due to its localization at the cytoplasmatic side of the cell.

These results suggest that the novel p.L55Q mutation, observed in the N-terminal CCR5 domain of HIV-1 non-infected individuals, could have an important role in HIV-1 infection not yet understood. So, more human genetic variations studies concentrated in the N- and C-Terminal CCR5 domains should be taken in order to investigate the CCR5 major role in the HIV-1 infection as this protein became an attractive target for therapeutic development against virus infection.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian Ministry of Health STD/AIDS Program, CNPq, FBDC and FIOCRUZ.

References

1. Gorry PR and Ancuta P: Coreceptors and HIV-1 Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2010; Epub ahead of print.
2. Nazari R and Joshi S: CCR5 as Target for HIV-1 Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 2008; 8 (4), 264-272.
3. Choe H, Li W, Wright PL, Vasilieva N, *et al.*: Tyrosine Sulfation of Human Antibodies Contributes to Recognition of the CCR5 Binding Region of HIV-1 gp120. *Cell* 2003; 114, 161-170.
4. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S and Landau NR: Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1 -infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185, 621-628.
5. Regoes RR and Bonhoeffer S: The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol* 2005; 13(6), 269-277.
6. BreLOT A, Heveker N, Pleskoff O, *et al.*: Role of the first and third extracellular domains of CXCR4 in HIV co-receptor activity. *J Virol* 1997; 71, 4744-4751.
7. Lu Z, Berson JF, Chen Y, *et al.*: Evolution of HIV-1 co-receptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94, 6426-6431.
8. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, *et al.*: HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381, 667-673.

9. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS and Paludan SR: Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 2010; 7:54.
10. Samson M, Libert F, Doranz BJ *et al.*: Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382:722-725.
11. O'Brien TR, Winkler C, Dean M *et al.*: HIV-1 infection in a man homozygous for CCR Δ 532. *Lancet* 1997; 349:1219.
12. Liu R, Paxton WA, Choe S *et al.*: Homozygous defect in HIV-1 co-receptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-377.
13. Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J *et al.*: Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J Biol Chem* 1999; 274:34719-34727.
14. Farzan M, Choe H, Vaca L *et al.*: A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp 120 and CCR5. *J Virol* 1998; 72:1160-1164.
15. Rabut GE, Konner JA, Kajumo F *et al.*: Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 72, 3464-3468.
16. Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P *et al.*: Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 1999; 96:667-676.

17. Acharya P, Dogo-Isonagie C, Lam SN *et al.*: Structure-based identification and neutralization mechanism of tyrosine sulfation mimetics that inhibit HIV-1 entry. *ACS Chem Biol* 2011; Epub ahead of print.
18. Zhang M, Gaschen B, Blay W *et al.*: Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 2004; 14(12):1229-1246.
19. Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Strina A *et al.*: Sentinel areas: a monitoring strategy in public health. *Caderno de Saúde Pública* 2002; 18(5):1189-1195.
20. Hall TA: BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95–98.
21. Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II: GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 1997; 4:14.
22. Combet C, Blanchet C, Geourjon C and Deléage G: NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* 2000; 25(3):147-150.
23. Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A *et al.*: The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res* 2010; 38:211-222.
24. Parker JMR, Guo D, Hodges RS: New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry* 1986; 25:5425-5431.
25. Sali A and Blundell TL: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol* 1993; 234:779-815.

26. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS and Thornton JM: PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 1993; 26:283–291.
27. Raymon M and Rousset F: GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered* 1995; 86:248-249.
28. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS: BioEstat Versão 5.0. Sociedade Civil Mamiraua, MCT-CNPq, Belém, Pará, Brasil 2005.
29. Rogers F, Lim SY, Sundsvold TJ, Chan T, Hsu A, Letvin NL: Variability in a dominant block to SIV early reverse transcription in rhesus monkey cells predicts in vivo viral replication and time to death. *Virology Journal* 2010; 7:79-90.
30. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S *et al.*: A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. *Science* 2007; 317(5840):944-947.
31. Kawashima Y, Pfafferot K, Frater J, Matthews P *et al.*: Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 2009; 458 (7238):641-645.
32. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S *et al.*: Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; 283(5403):857-860.
33. Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM *et al.*: Polymorphism in the Interleukin-10 Promoter Affects Both Provirus Load and the Risk of Human T Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis. *J. Infec Dis* 2004; 190: 1279-85.
34. Yoshikawa T, Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H *et al.*: Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002 ; 19: 1000-1005.

35. Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M *et al.*: Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging* 2003; 24(7):921-6.
36. Slater –Handshy T, Droll DA, Fan X, Di Bisceglie AM, Chambers TJ: HCV E2 glycoprotein : mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology* 2004; 319:36-48.
37. O'Brien SJ and Moore JP: The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* 2000.; 177:99-111.
38. Farzan M, Vasilieva N, Schnitzler CE *et al.*: A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry. *J Biol Chem* 2000; 275(43):33516-21.
39. O'Brien SJ and Nelson GW: Human genes that limit AIDS. *Nature Genetics* 2004; 36:565–574.
40. Walker BD: Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* 2007; 15:134-136.

Reprint requests should be directed to:

Luiz Carlos Junior Alcantara, Ph D

*Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação
Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.*

Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil - 40296-610.

Telephone # 55 71 3176 2255

Fax # 55 71 3176 2300

E-mail: lalcan@bahia.fiocruz.br



Figure 1. The final model of stable structure of CCR5.

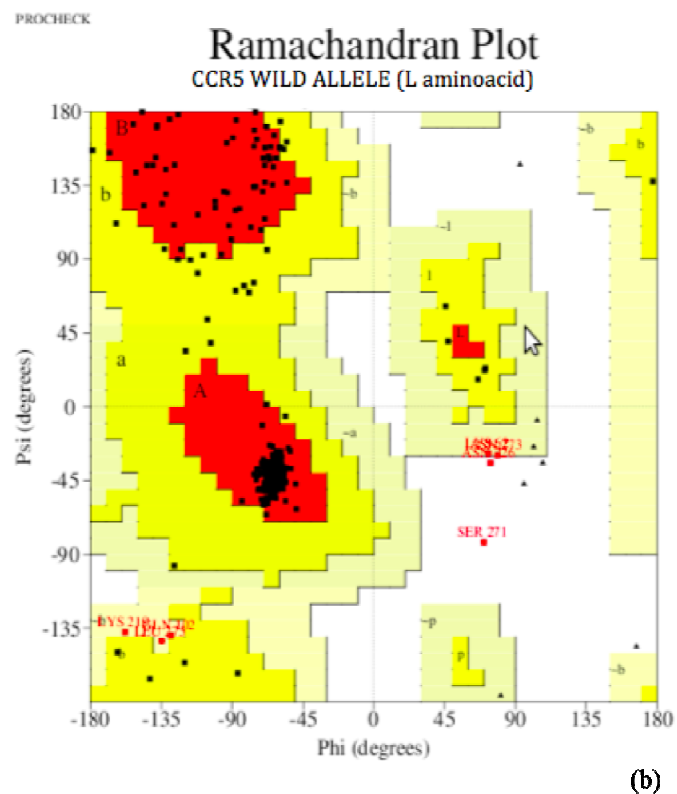
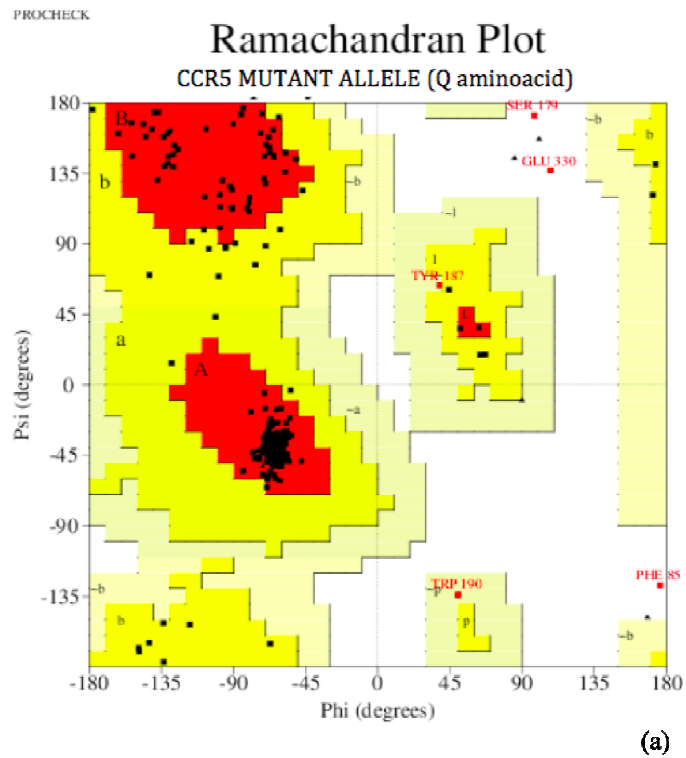
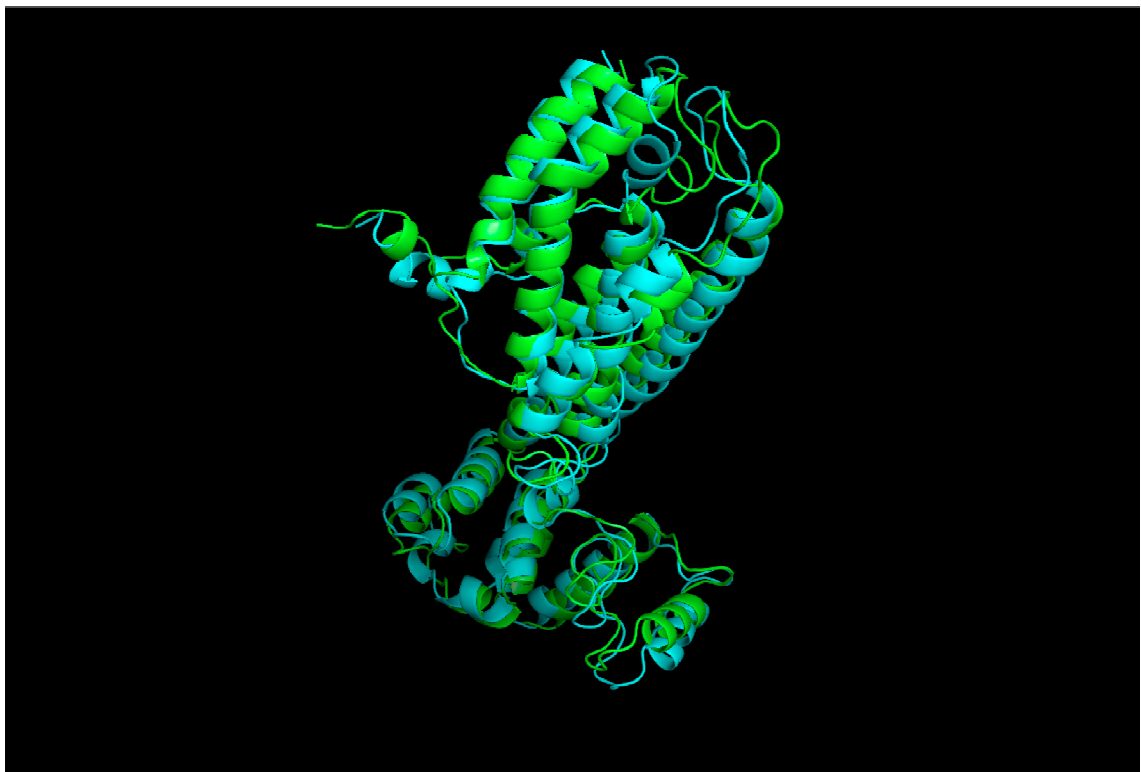
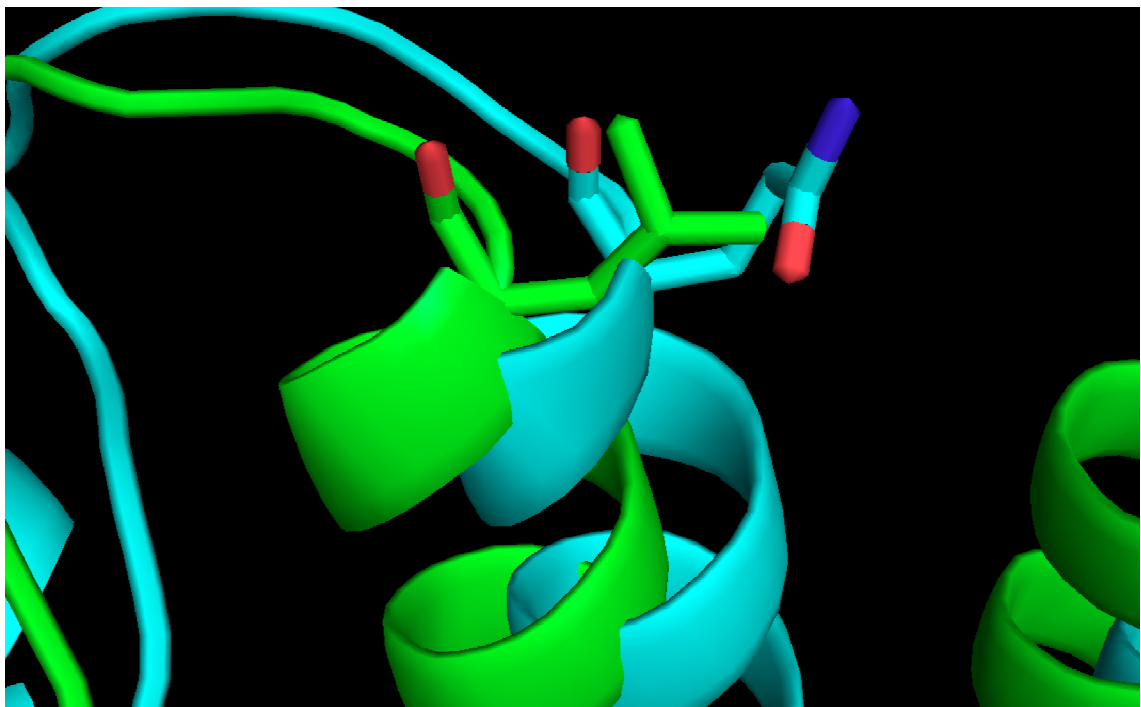


Figure 2. Validation of the model using Ramachandran plot computed with the PROCHECK program with 90.1% (a) and 87.6% (b) of the residues from the mutant and wild models, respectively, in favored and allowed regions.

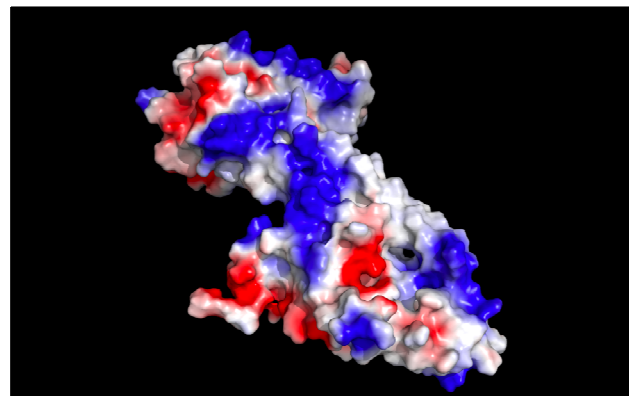


(a)

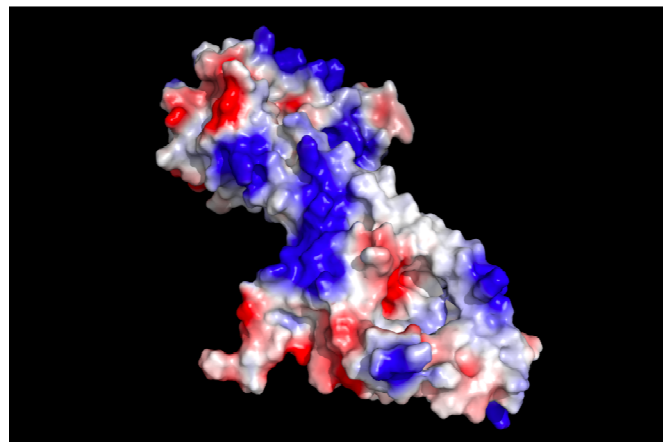


(b)

Figure 3. Overlapped CCR5 structures. In green, wild aminoacid (L) and in blue, mutante aminoacid (Q). **(a)** Complete structures. **(b)** Wild and mutant alleles in focus.



(a)



(b)

Figure 4. Eletrostatic load of the wild and mutant models. **(a)** Wild model. **(b)** Mutant model.

Table 1- Allelic and genotypic frequencies of p.L55Q, c.C3765T, c.A3777T and c.A3831G mutations in HIV-1 infected and non-infected individuals

Mutation	Genotypes (%)			Alleles (%)	
	T/T	T/A	A/A	T	A
p.L55Q*					
HIV-1 infected individuals	118 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	236 (100)	0 (0,0)
HIV-1 non-infected individuals	190 (96,4)	7 (3,6)	0 (0,0)	387 (98,2)	7 (1,8)
c.C3765T	C/C	C/T	T/T	C	T
HIV-1 infected individuals	111 (92,5)	9 (7,5)	0 (0,0)	231 (96,3)	9 (3,7)
HIV-1 non-infected individuals	123 (96,1)	5 (3,9)	0 (0,0)	251 (98,0)	5 (2,0)
c.A3777T	A/A	A/T	T/T	A	T
HIV-1 infected individuals	119 (99,2)	1 (0,8)	0 (0,0)	239 (99,6)	1 (0,4)
HIV-1 non-infected individuals	124 (96,8)	4 (3,2)	0 (0,0)	252 (98,4)	4 (1,6)
c.A3831G	A/A	A/G	G/G	A	G
HIV-1 infected individuals	119 (99,2)	1 (0,8)	0 (0,0)	239 (99,6)	1 (0,4)
HIV-1 non-infected individuals	128 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	256 (100)	0 (0,0)

* Genotypic and allelic frequencies with statistical significance ($p=0.036$, $\chi^2=4.276$ and $p=0.0395$, $\chi^2=4.324$, respectively)

5.2- CAPÍTULO II

Polymorphisms at *Langerin* gene and HIV-1 infection

COSTA G.C.S., JESUS J.G., SANTOS E.S., MONTEIRO J.P., GALVÃO-CASTRO B., GONÇALVES M.S., ALCANTARA L.C.J.

O papel protetor, recentemente descrito, da Langerina na transmissão sexual pelo HIV-1 juntamente com a ausência de estudos de mutações na proteína relacionadas à infecção por este vírus, fazem do gene *Langerina* um importante alvo na busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção pelo HIV-1 e na patogênese da AIDS. Este trabalho trata da investigação de mutações nas regiões promotora e codificantes do gene da Langerina responsáveis pela codificação do Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD) da proteína em indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1 na Bahia. A identificação de mutações nas regiões supracitadas do gene *Langerina* podem apresentar uma associação tanto com a infecção pelo vírus quanto com a progressão para a AIDS nos indivíduos analisados pelo fato de terem a capacidade de interferir na expressão da Langerina e na estabilidade do CRD, afetando, por conseguinte, sua ligação à gp120 do HIV-1, através do CRD, e a internalização e degradação do vírus em Grânulos de Birbeck. Por este motivo, as sequências obtidas das regiões estudadas do gene da Langerina foram avaliadas em busca de mutações que poderiam alterar a afinidade de ligação com a gp120 viral ou afetar o nível de expressão da Langerina e, conseqüentemente, a infecção pelo HIV-1.

Polymorphisms at *Langerin* gene and HIV-1 infection

GISELLE C S COSTA^{1,2}, JAQUELINE G JESUS^{1,2}, EDSON S SANTOS², BERNARDO GALVÃO-CASTRO^{1,2}, MARILDA S GONÇALVES^{1,3}, LUIZ CARLOS J ALCANTARA^{1,2}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

²Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Bahia, Brazil.

³Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

Corresponding author:

Luiz Carlos Junior Alcantara, Ph D

Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil - 40296-610.

Telephone # 55 71 3176 2255

Fax # 55 71 3176 2300

E-mail: lalcan@bahia.fiocruz.br

Running title: Langerin polymorphisms and HIV-1 infection

KEY WORDS: HIV-1, LANGERIN, POLYMORPHISM.

SUMMARY

Human genetics variations studies are an useful source of knowledge of HIV-1 infection. At this context, the Langerin protein, found at the surface of Langerhans cells, has an important protective role into HIV-1 infection. Differences in the Langerin function due to host genetic factors could influence in the HIV-1 infection susceptibility. The promoter and Carbohydrate Recognition Domain (CRD) encoding regions of *Langerin* gene were sorted for mutations, by sequencing, in 128 HIV-1 infected individuals and in 99 non-infected individuals. The *Langerin* promoter studies revealed three mutations that created new binding sites to some transcription factors, such as NFAT5, HOXB9.01 and STAT6.01, according to MatInspector tool. However, when HIV-1 infected and non-infected groups were compared, the allelic and genotypic frequencies of the analyzed promoter sites were not statistically significant. It was observed three mutations at *Langerin* gene region that encodes to the CRD of the protein: p.K313I, c.941C>T and c.983C>T. When both studied groups were compared, it was not observed a statistically significant difference in allelic and genotypic frequencies from the identified polymorphisms at CRD encoding region. These results suggest that the mutations detected in the promoter and CRD encoding regions of *Langerin* gene do not interfere in HIV-1 infection susceptibility.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) play an important role in the early HIV-1 infection due to their ability to mostly capture the virus in peripheral tissues, such as genital mucosa, migrate to the secondary lymphoid organs and present HIV-1 processed antigens to CD4⁺ T lymphocytes, their major cell target. Different DCs subsets interact with HIV-1 via selected C-type lectin receptors (CLR), independently of CD4 and chemokine coreceptors (CCR5 and CXCR4), the classical pathway used by HIV-1 to enter in CD4⁺ T lymphocytes and macrophages. These CLRs are used to distinguish the DCs subsets in mucosal tissues (Turville *et al.*, 2002; Tada *et al.*, 2006; Hirbod *et al.*, 2009).

In the genital mucosa, two different DCs subsets are present: the Langerhans cells (LCs), which specifically express the C-type lectin Langerin (CD207), and the DC-SIGN⁺-DCs, characterized by the expression of the CLR DC-SIGN. These subsets have an specific anatomical localization: while LCs reside in the stratified mucosal epithelia of the vagina, ectocervix, epidermis of foreskin, glan penis and skin, the DC-SIGN⁺-DCs are located at the subepithelium layer. Thus, HIV-1 encounters different DCs subsets depending on the site of infection and the integrity of the epithelial layer. Due to its location, LCs are potentially the first DC subset to encounter HIV-1 during sexual transmission within intact genital epithelial tissues (de Witte *et al.*, 2007^a; de Witte *et al.*, 2007^b; Hirbod *et al.*, 2009).

Langerin is a cell surface C-type lectin located exclusively on Langerhans cells and it is constitutively associated with Birbeck granules, endosomal recycling organelles consisting of superimposed and zippered membranes. The antigen capture is a Langerin function and the induction of Birbeck granules formation in fibroblasts is a consequence of this function in order to process the antigen (Ward *et al.*, 2006; de Witte *et al.*, 2007^a; Fahrbach *et al.*, 2007). Langerin protein is comprised of extracellular neck, transmembrane and intracellular portions

and Carbohydrate Recognition Domains (CRDs), which bind preferentially glycoconjugates containing mannose, N-acetylglucosamine and fucose (Valladeau *et al.*, 2002; Stambach & Taylor, 2003; McGreal *et al.*, 2004; Tada *et al.*, 2006).

Specially about HIV-1, langerin has the ability of binding the mannan rich region of gp120 through CRD, capture and internalize HIV-1 into the Birbeck granules, which degrades the virus and prevents LC infection and viral dissemination at low virus concentration, providing a different pathway to the classical antigen processing. However, HIV-1 transmission to T-cells mediated by LCs can occur at high viral load, suggesting that the inhibition of Langerin by inhibitors or through saturation enables HIV-1 binding to CD4 and CCR5, and subsequent LC infection and transmission to T cells (Ward *et al.*, 2006; Schwartz, 2007; de Witte *et al.*, 2007^a; de Witte *et al.*, 2007^b; Feinberg *et al.*, 2010; Van der Vlist & Geijtenbeek, 2010).

As Langerin on LCs functions as a protective mechanism in intact mucosa by HIV-1 clearance, during sexual transmission of the virus, differences in Langerin function due to genetic, cellular or infectious factors might influence the susceptibility to HIV-1 infection (de Witte *et al.*, 2007^a). At this context, polymorphisms at *Langerin* gene that result in different protein carbohydrate-binding capacities and/or that influence the protein expression could result in different HIV-1 susceptibility and transmission rates by LCs. Some polymorphisms that result in amino acid changes in the CRD of human langerin have been identified (Verdijk *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2006)

In an effort to find polymorphisms that could be associated to the HIV-1 infection and susceptibility, the promoter and CRD encoding regions of the human *Langerin* gene were analyzed in HIV-1 infected and non-infected individuals from Bahia, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study population

HIV-1 infected individuals: The promoter and CRD encoding regions of *Langerin* gene were studied in a convenience sample of 116 and 124 HIV-1 infected individuals, respectively, followed at the Reference Center for Sexual Transmitted Disease (STD)/AIDS of Feira de Santana, Bahia, Brazil. During 2007, blood samples were collected and then processed at Advanced Laboratory of Public Health (LASP)/CPqGM/FIOCRUZ in Bahia, Brazil. This population was comprised of 118 women, recruited during gynecological follow-up, and 6 children (2-11 years, all infected through mother-to-child transmission). Clinical and epidemiological data were obtained from medical records. Informed consent was obtained from the patients and/or the children's parents or guardians.

Control group: A total of 99 DNA samples from HIV-1 non-infected individuals were randomly selected to obtain the frequency of polymorphisms at a control group. These samples consisted of volunteers who went to the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Bahia, Salvador for laboratory analysis.

The local ethical committee's approval was obtained and all subjects provided written informal consent.

DNA extraction and mutation detection: Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). The analyses of the promoter and encoding CRD regions of *Langerin* gene were performed through PCR amplification followed by sequencing. PCR products were

purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) and sequenced in an ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). The sequences obtained were analyzed with the SeqScape program (Applied Biosystems) and the nucleotide variations observed at the sequences were compared with the wild-type *Langerin* gene sequence (NM_015717.3) and confirmed utilizing the BioEdit (Hall, 1999) and GeneDoc (Nicholas et al., 1997) Programs.

Promoter region – The promoter region of *Langerin* gene analysis was performed in two steps in order to improve the amplification of this region, comprised of, about, 900bp. The first step resulted in the amplification and analysis of a 331bp longer fragment with the following constructed primers: 5'AGAGGTCCAGCTCCTTGACATGAT3'(F) and 5'AGTCCTTGCA CCAAGCAGCTCATA3'(R). The second step resulted in the amplification and analysis of a 429bp longer fragment with the constructed primers sequencing 5'AATGGATGGGTGGATGGATGACGA3'(F) and 5'CAAAGGGCAGGTTTGCACACAG AA3'(R).

CRD Encoding region - The *Langerin* CRD coding region was also analyzed in two steps in order to eliminate the amplification of introns. The first step resulted in the amplification and analysis of a 556bp longer fragment using the following primers: 5'AGGAAGAAGCTTGAGAGGCCAGTT3'(F) and 5'ACCCACCACTTTCAAGTCCCTACA3'(R). The second part, named LanC2, resulted in the amplification and analysis of a 445bp longer fragment using the primers sequencing 5'TTGGGTGCAGACATTTGCTATGC C3'(F) and 5'ATTCCAGCCAAGACAGACGGACT3'(R).

Transcription Factor binding sites analyses: To investigate if the detected mutations at *Langerin* promoter region could modify the possible transcription factors binding sites, mutated and wild sequences were analyzed using the MatInspector tool implemented in the Genomatix software (Cartharius *et al.*, 2005).

Physico-chemical and potential protein domain analyses: In order to investigate possible influences of mutations at protein structure, the physico-chemical analysis of the *missense* mutations observed in the sequences was performed using the Network Protein Sequence Analysis (NPSA) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) (Combet *et al.*, 2000). Sulfation and O-glycosylation sites and other posttranslational modification sites were analyzed using the Prosite tool implemented in the GeneDoc software. The search for potential protein domain was performed using the Pfam database (Finn *et al.*, 2010). Finally, the SWISS-MODEL online tool (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) was used as a fully automated protein structure homology-modeling server, to infer about possible influence of the amino acid changes at protein secondary structure.

Statistical Methods: Allelic frequencies were estimated by direct allele counting. The conformity with Hardy-Weinberg equilibrium and existence of linkage disequilibrium were tested using the Genepop v.3.4 (Raymon & Rousset, 1995). The heterogeneity between population samples was evaluated by Fisher's exact test or by χ^2 test using the BioEstat v.5.0 program (Ayres *et al.*, 2005). A p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Sample characterization

The sampling of this study consisted of 124 HIV-1 infected individuals (118 women and 6 children) and 99 HIV-1 non-infected individuals (49 males and 50 females), used as control group. The ages of the HIV-1 infected individuals ranged from 20 to 73 years among women (mean=37.9 years) and from 2 to 11 years among children (mean=6 years). Clinical factors, as the time of antiretroviral treatment, the appearance of HIV-1 constitutional symptoms, viral load and CD4 T cell counting from HIV-1 infected individuals showed a high heterogeneity into the group. The median HIV-1 viral load was 386 ± 17.93 copies/ml and the median CD4 T cell counting was 382.5 ± 2.03 cells/ μ l. Eighty-eight (75.9%) patients were under antiretroviral therapy, while 28 (24.1%) were therapy naïve. The main form of HIV-1 infection, among women, was through sexual transmission (66.2%), while one patient reported a blood transfusion (1.5%) and one was an intravenous drug use (IDU) (2.2%). All the children were infected through vertical transmission. 12 patients did not have available data in medical records. The median age of the non-infected individuals (control group) was 29 ± 15.2 years. All the blood samples from the control group had negative serology for HIV-1/2 and HTLV-1/2.

Molecular analysis of Langerin gene promoter region

The Langerin gene promoter studies revealed three mutations, all characterized by a substitution of a Thymine nucleotide to an Adenine nucleotide, at -577, -517 and -160 positions of the Langerin gene promoter region (-577T>C, -517T>C and -160T>C). Except for the frequency of the -577T>C mutation in HIV-1 non-infected group (0.5%), the other

mutations were considered as polymorphic sites in the studied populations. Genotypic and allelic frequencies of the analyzed sites are shown at Table 1.

Genotypic and allelic frequencies of the analyzed sites did not differ significantly from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.2608$, $\chi^2=5.2686$). A strong linkage disequilibrium was observed when infected and non-infected individuals were compared as separate groups between the -577T>C and -160T>C mutations, at control group ($p=0.027520$, $\chi^2=12.34$). There were no differences in *Langerin* -577T>C, -517T>C and -160T>C mutations genotypic and allelic distributions between HIV-1 infected and non-infected individuals.

According to the transcription factors binding sites analyses accomplished at MatInspector tool, the mutation -577T>C created a new binding site to the transcription factor HOXB9.01 (Homeobox 9.01), from the family ABD-b (Abdominal B-type domain), with the highest level of similarity (1.0). Concerned to the -517T>C mutation, the analyses revealed that it is placed at AIRE 01 (Autoimmune regulatory element 01) binding site and that the nucleotide change from thymine to cytosine reduced the similarity of the core sequence from 0.857 to 0.774 and created a new binding site to NFAT 5 (Nuclear factor of activated T-cells 5) transcription factor with similarity of 1.0. As regards to the -160T>C polymorphism, the substitution from thymine to cytosine nucleotide created two new binding sites to the following transcription factors: STAT6.01 (Signal transducer and activator of transcription 6.01) with similarity of 0.94 and ETV1.02 (Human and murine ETS1 factors 1.02) with similarity of 0.961; and also excluded the binding sites to MEL1.03 (EVI 1-myeloid transforming protein) and the NF1.01 (Nuclear factor 1) transcription factors.

Molecular analysis of Langerin CRD encoding region

It was observed three mutations at *Langerin* gene region that encodes to the CRD of the protein: p.K313I (c.938T>A), c.941C>T (g.4728C>T) and c.983C>T (g.4770C>T). The genotypic and allelic frequencies of the analyzed sites are shown at Table 1. Except from the p.K313I mutation, which is characterized by a substitution from thymine to adenine nucleotide at 4724 gene position and results in a change of lysine amino acid to the isoleucine amino acid (p.K313I mutation) at 313 position of Langerin protein, all the others mutations did not result in amino acid changes. All the mutations were considered as polymorphic sites in both studied groups.

The physico-chemical analysis revealed that the p.K313I polymorphism magnified the hydropathy (Kyte & Doolittle, 1982) and transmembrane profiles (Argos *et al.*, 1982) and reduced the hydrophilicity (Hopp & Woods, 1983), accessibility (Janin, 1979) and antigenicity profiles (Hopp & Woods, 1983) (Figure 1). Our results about the identification of post-translational modification sites showed that any modification occurred at wild and mutated alleles and the same potential protein domains were found among the wild and mutated sequences. This mutation is placed at the end of the Langerin CRD and it did not alter the protein secondary structure prediction after submission of wild and mutated sequences to SWISS-MODEL server.

Genotypic and allelic frequencies of the analyzed sites did not differ significantly from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.9023$, $\chi^2=1.0486$). A strong linkage disequilibrium was observed when infected and non-infected individuals were compared as separate groups between the c.941C>T and c.983C>T polymorphisms ($p=0.02186$, $\chi^2=12.42$) at control group ($p=0.02686$, $\chi^2=12.39$). When HIV-1 infected and

non-infected individuals were compared, it was not observed a statistically significant difference in the allelic and genotypic frequencies from the identified polymorphisms.

DISCUSSION

Sexual transmission of HIV-1 is the most common mode of infection worldwide. The stratified epithelium of genital mucosa contains only one specific DC subset, so that the first DC subset to encounter HIV-1 during sexual transmission within intact genital epithelial tissues is Langerhans Cell (LC). Their extensive dendrites form a barrier against pathogens, and concerned to HIV-1, the binding and degradation of the virus through Langerin and Birbeck granules, respectively, prevents HIV-1 infection and posterior transmission to CD4 T-cells. HIV-1 gp120 recognition by Langerin depends on the presence of the Carbohydrate Recognition Domain (CRD), which binds the gp120 mannose rich region allowing the HIV-1 entry (Turville *et al.*, 2002; Tada *et al.*, 2006; de Witte *et al.*, 2007^a; de Witte *et al.*, 2007^b; Hirbod *et al.*, 2009; Van der Vlist & Geijtenbeek, 2010).

However, the co-expression of CD4 and CCR5 by LCs enables HIV-1 infection at high viral load or after Langerin inactivation, since HIV-1 entry in LCs may occur by the classical pathway of infection: via CD4/CCR5. At this context, Langerin genetics variations could interfere in its expression and/or in its sugar binding activity, affecting HIV-1 infection susceptibility and AIDS progression (Ward *et al.*, 2006; de Witte *et al.*, 2007^a; de Witte *et al.*, 2007^b; Schwartz, 2007; Feinberg *et al.*, 2010; Van der Vlist & Geijtenbeek, 2010). Although the role of Langerin in HIV-1 infection has a remarkable importance, there are no studies associating mutations at *Langerin* gene and the virus infection susceptibility. So, this is the first study that analyzes mutations at promoter and encoding regions of *Langerin* gene in a HIV-1 infected population. The samples from HIV-1 infected individuals analyzed in this study proceeded from the city of Feira de Santana, an inner city in the northeast of Brazil. This city is placed at one of the major road junctions of the northeast of the country, connecting it with the Midwest, the south and the rest of the northeast regions.

Many studies have demonstrated an association between polymorphisms at promoter regions of human genes and disease manifestation. It has been suggested that SNP at promoter region of human genes could influence the protein expression in the cell leading to a high or low protein expression (Yoshikawa *et al.*, 2002; Licastro *et al.*, 2003; Sabouri *et al.*, 2004). These different protein phenotypes could be related to its functionality and affect its activity. As regards HIV-1 infection, polymorphisms at promoter region of human *Langerin* gene could interfere in the virus entry through Langerin and HIV-1 susceptibility. For this reason, we investigated the presence of polymorphisms at *Langerin* promoter region and our results showed three mutations at this region: -577T>C, -517T>C and -160T>C. According to the transcription factors binding sites analyses accomplished at MatInspector tool, all of these mutations created new binding sites to transcription factors.

The -577T>C mutation, for example, created a binding site to the transcription factor HOXB9.01, which encodes a nuclear protein that functions as a sequence-specific transcription factor that is involved in cell proliferation and differentiation (Bürglin, 2005). Concerned to the -517T>C polymorphism and according to MatInspector analyzes, it is placed at AIRE 01 binding site which is expressed in peripheral monocyte and differentiated dendritic cell lineage (Kogowa *et al.*, 2002). This mutation reduced the similarity of the core sequence from 0.857 to 0.774, however this reduction was not expressive. It also created a new binding site to NFAT 5 transcription factor with similarity of 1.0. The NFAT family of transcription factor plays a central role in inducible gene transcription during immune response (Rinne *et al.*, 2009). And finally, the -160T>C polymorphism created binding sites to the STAT6.01 and ETV1.02 transcription factors with similarity of 0.94 and 0.961, respectively. STAT proteins are involved in the development and function of the immune system and play a role in maintaining immune tolerance and tumor surveillance (Vinkemeier *et al.*, 1998). Concerned to the ETV1.02 transcription factor, it belongs to ETS family, which

is involved in a wide variety of functions including the regulation of cellular differentiation, cell migration and proliferation, apoptosis and angiogenesis (Lee *et al.*, 2005).

Although the mutations observed at the *Langerin* promoter region created binding sites for several transcription factors, as resulted after submission of wild and mutated sequences to MatInspector tool, we did not observe any association between these mutations and susceptibility to HIV-1 infection. As MatInspector is a software tool that uses a large library of matrix descriptions for transcription factor binding sites, it is possible that the creation of the new binding sites through the nucleotide substitutions does not really impact on the Langerhans Cells functionality, since the transcription factors that bind to the new binding sites created by the mutations may not occur in Langerhans Cells. Otherwise, there are no functional studies based on *Langerin* gene promoter that could confirm or refuse the results presented by these MatInspector analyses. So, despite the absence of association between the mutations detected in this study and susceptibility to HIV-1 infection, it would be interesting to investigate the functional impact of these mutations once the creation of new binding sites for transcription factors suggested by MatInspector analyses can not be confirmed due to the lack of information about the transcription factors existent in Langerhans Cells.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) are very common in *Langerin* gene. Some of them have been researched in different populations and can alter the amino acid sequence of Langerin protein, resulting in changes at the protein functionality. p.A300P and p.N288D polymorphisms, for example, decrease the langerin sugar binding activity by the decreased stability of the CRD and the local effect on the structure around the sugar binding site, respectively. In addition, the W264R mutation completely abolishes langerin sugar binding activity, preventing langerin binding to microorganisms, such as HIV-1 (Verdijk *et al.*, 2005;

Ward *et al.*, 2006). Differences in the distribution of SNP can be observed in populations with different ethnic backgrounds (Cox *et al.*, 2001; Meenagh *et al.*, 2002; Verdijk *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2006; Van der Vlist & Geijtenbeek, 2010). Our study demonstrated the existence of three polymorphisms at CRD encoding region, two synonymous (c.941C>T - rs2080390 and c.983C>T - rs13421115) and one nonsynonymous (p.K313I - rs57302492).

Previous results have shown that the p.K313I, c.941C>T and c.983C>T alleles frequencies are highly heterogeneous among different populations (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=57302492, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=2080390 and http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=13421115). The samples analyzed in this study proceeded from the cities of Salvador and Feira de Santana, both belonging to Bahia state, at Brazilian Northern region. As Brazil is a South American nation characterized by the admixture of several ethnic groups such as Portuguese, Africans, indigenous tribes and a variety of other European immigrants, the contribution of these different ethnic groups varies among the different regions of Brazil. In Northern Brazil, the most important contributions to the gene pool region are from Europeans and Africans, and there is a smaller influence of Amerindians, as shown in the city of Salvador (capital of the state of Bahia) (Salzano & Freire-Maia, 1967; Callegari-Jacques & Salzano, 1999; Alves-Silva *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2010). Our alleles frequencies results from the p.K313I, c.941C>T and c.983C>T polymorphisms (Table 1) were higher than the African American and European alleles frequencies previously reported. This could be explained by the miscegenation suffered by Brazilian population during the colonization period, which could interfere in the allele frequencies of several *loci* due to the contribution from different ethnic groups.

The p.K313I polymorphism resulted in a substitution from Lysine (K) to Isoleucine (I) amino acid at the end of the Carbohydrate Recognition Domain of the protein (position 313). The magnificence of hydropathy and transmembrane profiles and the reduction of hydrophilicity, accessibility and antigenicity profiles at this polymorphism site, as resulted of the physico-chemical analysis, could diminish the HIV-1 gp120 access to this CRD region and affect HIV-1 entry through Langerin. However, this mutation did not alter the protein secondary structure prediction and when HIV-1 infected and non-infected individuals were compared it was not observed a statistically significant difference in the allelic and genotypic frequencies in our population, suggesting that this mutation do not interfere in HIV-1 susceptibility.

In summary, the results presented in this study suggest that the mutations detected in the promoter and CRD encoding regions of the human *Langerin* gene (-577T>C, -517T>C, -160T>C, p.K313I, c.941C>T and c.983C>T) are not associated with HIV-1 infection susceptibility. Since this is the first study that investigate *Langerin* gene mutations in HIV-1 infected individuals, we believe that more extensive human genetic variations analyses should be taken in order to understand the Langerin major role in HIV-1 infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian Ministry of Health STD/AIDS Program, CNPq, FBDC and FIOCRUZ.

REFERENCES

1. Alves-Silva J, Santos M, Guimaraes PE *et al.* (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444–461.
2. Argos P, Rao JK, Hargrave PA (1982) Structural prediction of membrane-bound proteins. *Eur J Biochem* 15: 565-575.
3. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
4. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS (2005) BioEstat. Versão 5.0, Sociedade Civil Mamiraua, MCT-CNPq, Belém, Pará, Brasil.
5. Bürglin TR. (2005) Homeodomain Proteins. In: *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* (eds. R.A. Meyers, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim), pp. 179-222.
6. Callegari-Jacques SM, Salzano FM (1999) Brazilian Indian/non- Indian interactions and their effects. *Ciência Cult J Braz Assoc Adv Sci* 51:166–174
7. Cartharius K, Frech K, Grote K *et al.* (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 21(13): 2933-2942.
8. Combet C, Blanchet C, Geourjon C and Deléage G. (2000) NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS*. 25(3):147-150.
9. Costa GC, Alcantara LC, Azevedo R *et al.* (2010) Frequency distribution of XbaIG>T and HaeIIIT>C GLUT1 polymorphisms among different Brazilian ethnic groups. *Mol Biol Rep* 37:75–79.

10. Cox ED, Hoffmann SC, DiMercurio BS *et al.* (2001) Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation* 72:720–726.
11. de Witte L, Nabatov A & Geijtenbeek T (2007) Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends in Molecular Medicine*. 14 (1), 12-19. ^a
12. de Witte, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong M *et al.* (2007) Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nature Medicine*. 13 (3), 367-371. ^b
13. Fahrbach K, Barry S, Ayehunie S *et al.* (2007) Activated CD34-Derived Langerhans Cells Mediate Transinfection with Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*. 81(13), 6858-6868.
14. Feinberg H, Powlesland A, Taylor M, Weis W (2010) Trimeric Structure of Langerin. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(17):13285–13293.
15. Finn RD, Mistry J, Tate J, Coghill P, Heger A *et al.* (2010) The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res*. 38:211-222.
16. Hall TA. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 41:95–98.
17. Hirbod T, Kaldensjo T, Lopalco L, Klareskog E, Andersson S *et al.* (2009) Abundant and Superficial Expression of C-type Lectin Receptors in Ecotocervix of Women at Risk of HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 51 (3), 239-247.
18. Hopp TP, Woods KR (1983) Physico-chemical profiles: A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol Immunol* 20: 483-489.

19. Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins (1979). *Nature* 277:491-491.
20. Kogowa K, Nagafuchi S, Katsuta H, Kudoh J, Tamiya S *et al.* (2002) Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage. *Immunol Lett.* 80(3):195-198.
21. Kyte J, Doolittle R (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
22. Lee GM, Donaldson LW, Pufall MA *et al.* (2005). The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition. *J. Biol. Chem.* 280 (8): 7088–99.
23. Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M, Martina C *et al.* (2003) Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging.* 24(7):921-6.
24. McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S (2004) Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol.* 41:1109-1121.
25. Meenagh A, Williams F, Ross OA *et al.* (2002) Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum Immunol* 63:1055–1061.
26. Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS.* 4:14.
27. Raymon M & Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86:248-249.
28. Rinne A, Banach K, Blatter LA. (2009) Regulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in vascular endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 47(3):400-410.

29. Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM *et al.* (2004) Polymorphism in the Interleukin-10 Promoter Affects Both Provirus Load and the Risk of Human T Lymphotropic Virus Type I- Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis. *J. Infect Dis* 190: 1279-85.
30. Salzano FM, Freire-Maia N (1967) Imigração e Miscigenação. In: Companhia Editora Nacional (ed) Populações Brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo-Brasil, pp 32–39.
31. Schwartz O (2007) Langerhans cells lap up HIV-1. *Nature Medicine*. 13:245-246.
32. Stambach N & Taylor M (2003) Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology*. 13, 401-410.
33. Tada Y, Riedl E, Lowenthal M, Liotta L, Briner D, Crouch E, Udey M (2006) Identification and Characterization of Endogenous Langerin Ligands in Murine Extracellular Matrix. *Journal of Investigative Dermatology*. 126, 1549-1558.
34. Turville S, Cameron P, Handley A, Lin G *et al.* (2002) Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature Immunology*. 3 (10), 975-983.
35. Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin J, Kissenpfennig A *et al.* (2002) Identification of Mouse Langerin/CD207 in Langerhans Cells and Some Dendritic Cells of Lymphoid Tissues. *The Journal of Immunology*. 168: 782-792.
36. Van der Vlist M & Geijtenbeek T (2010) Langerin functions as an antiviral receptor on Langerhans cells. *Immunology and Cell Biology*. 88:410-415.

37. Verdijk P, Dijkman R, Plasmeijer EI, Mulder AA, Zoutman WH, Mommaas AM, Tensen CP. (2005) A lack of Birbeck granules in Langerhans cells is associated with a naturally occurring point mutation in the human Langerin gene. *J. Invest. Derm.* 124:714-717.
38. Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Kuriyan J (1998). Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279 (5353): 1048–52.
39. Ward E, Stambach N, Drickamer K and Taylor M (2006) Polymorphisms in Human Langerin Affect Stability and Sugar Binding Activity. *The Journal of Biological Chemistry.* 281(22), 15450-15456.
40. Yoshikawa T, Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H *et al.* (2002) Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetic Med.* 19: 1000-1005.

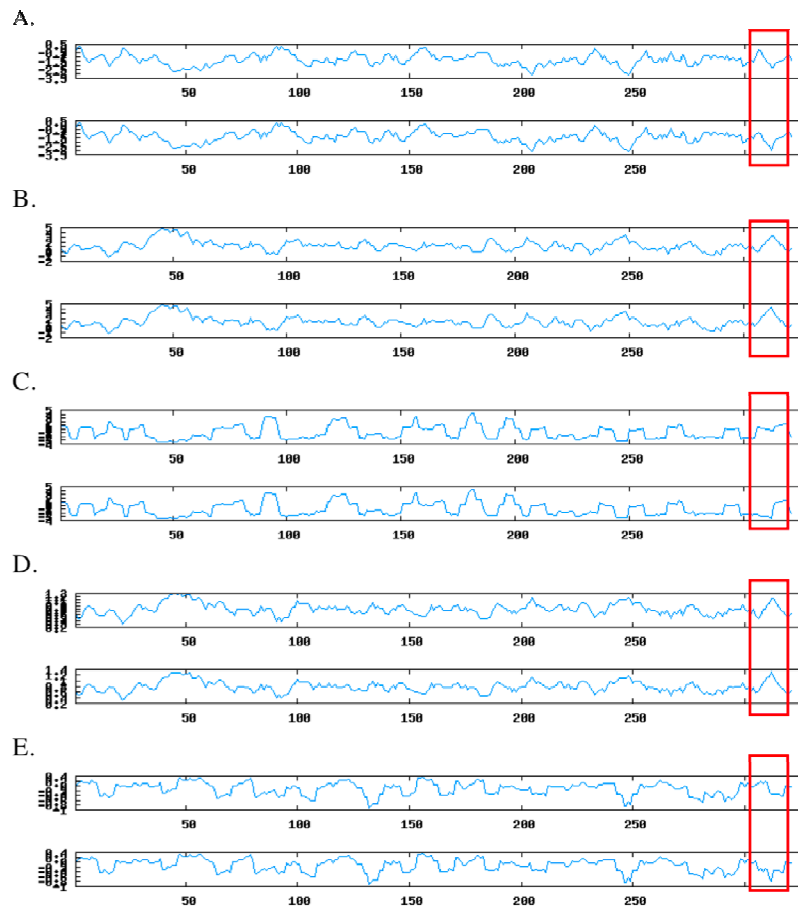


Figure 1. Physico-chemical analysis of wild and mutated alleles of p.K313I polymorphism. A. Hydrophilicity for wild allele and hydrophilicity for mutated allele, respectively. B. Hydropathy for wild allele and hydropathy for mutated allele, respectively. C. Accessibility for wild allele and accessibility for mutated allele, respectively. D. Transmembranous helices for wild allele and Transmembranous helices for mutated allele, respectively. E. Antigenicity for wild allele and antigenicity for mutated allele, respectively.

Table 1- Allelic and genotypic frequencies of -577T>C, -517T>C, -160T>C, p.K313I, c.941C>T and c.983C>T mutations in HIV-1 infected and non-infected individuals

Mutation	HIV-1 infected individuals					HIV-1 non-infected individuals				
	Genotypes (%)			Alleles (%)		Genotypes (%)			Alleles (%)	
-577T>C	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	T (%)	C (%)	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	T (%)	C (%)
	112 (96.5)	4 (3.5)	0 (0.0)	228 (98.3)	4 (1.7)	97 (99.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	195 (99.5)	1 (0.5)
-517T>C	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	T (%)	C (%)	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	T (%)	C (%)
	93 (80.2)	22 (19.0)	1 (0.8)	208 (89.7)	24 (10.3)	73 (74.5)	24 (24.5)	1 (1.0)	170 (86.7)	26 (13.3)
-160T>C	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	T (%)	C (%)	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)	T (%)	C (%)
	22 (20.0)	65 (59.1)	23 (20.9)	109 (49.5)	111 (50.5)	23 (23.2)	46 (46.5)	30 (30.3)	92 (46.5)	106 (53.5)
p.K313I	T/T (%)	T/A (%)	A/A (%)	T (%)	A (%)	T/T (%)	T/A (%)	A/A (%)	T (%)	A (%)
	100 (80.6)	23 (18.6)	1 (0.8)	223 (89.9)	25 (10.1)	77 (78.6)	21 (21.4)	0 (0.0)	175 (89.3)	21 (10.7)
c.941C>T	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)
	87 (70.2)	33 (26.6)	4 (3.2)	207 (83.5)	41 (16.5)	70 (71.4)	24 (24.5)	4 (4.1)	164 (83.7)	32 (16.3)
c.983C>T	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	C (%)	T (%)
	74 (59.7)	47 (37.9)	3 (2.4)	195 (78.6)	53 (21.4)	52 (53.1)	43 (43.9)	3 (3.0)	147 (75.0)	49 (25.0)

5.3- ANÁLISES COMPLEMENTARES

5.3.1- PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1

A população de indivíduos infectados incluídos neste estudo consta de 118 mulheres e 6 crianças todas HIV-1 positivos. De acordo com dados coletados dos prontuários, o perfil epidemiológico da amostra refere-se a uma população de baixa escolaridade com 59,6% dos indivíduos analfabetos, 11,0% apresentando nível básico de escolaridade e apenas 0,7% possuíam nível médio (Figura 19). Não foi encontrado nenhum indivíduo com nível superior. Baseado na auto-denominação para cor da pele, há um predomínio de indivíduos de cor parda (44,1%), seguidos por brancos (36%). A minoria destes indivíduos (5,2%) se auto-denominou como tendo cor negra (Figura 20). A situação financeira é limitada, sendo a grande maioria dos pacientes infectados (81,6%) classificados como Classe E (Figura 21). A totalidade da amostra é heterossexual, excetuando as crianças que entraram no escopo de “sem orientação” (Figura 22). A via de transmissão do HIV-1 entre as mães, na sua maioria, foi horizontal (66,2%) e a totalidade entre as crianças foi vertical (16,2%). Observou-se também a transmissão do HIV-1, nesta população, pelo uso de drogas injetáveis (2,2%) e por transfusão sanguínea (1,5%) (Figura 23). A população em estudo possui uma heterogeneidade grande referente ao tempo de tratamento e ao aparecimento de manifestações clínicas relacionadas à infecção pelo HIV-1. Entretanto, a grande maioria (80,1%) possui cinco anos ou menos de tratamento, sendo que 69% dos indivíduos apresentaram menos de dois sintomas relacionados à infecção por ano.

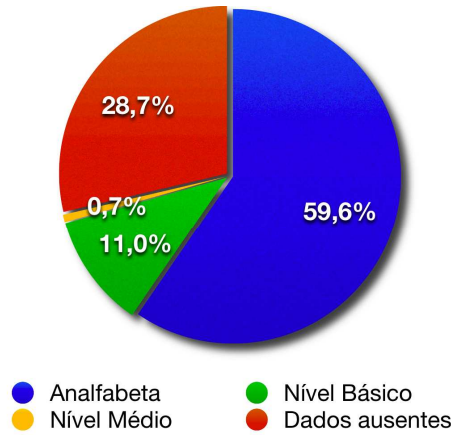


Figura 19- Nível de escolaridade dos indivíduos infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia

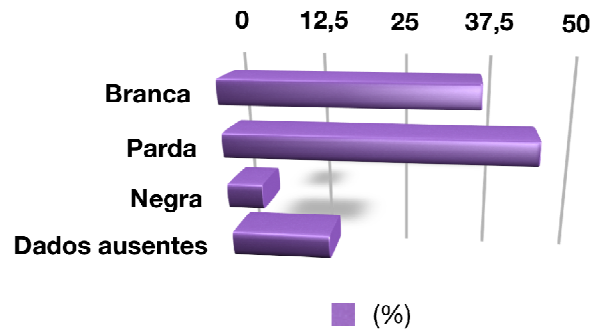


Figura 20- Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia, de acordo com a auto-denominação para cor da pele

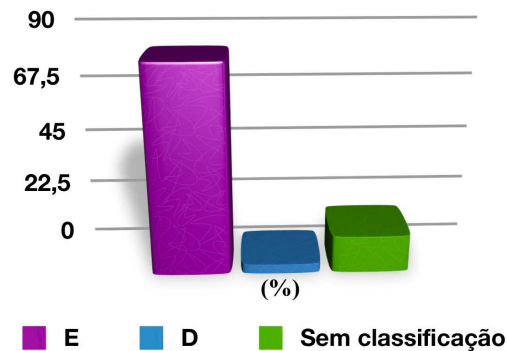


Figura 21- Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia, de acordo com a classe social baseada na renda familiar (Classe E compreende indivíduos que pertencem a famílias com até 2 salários mínimos, Classe D compreende indivíduos que pertencem a famílias que somam entre 2 e 4 salários mínimos de renda e Sem classificação refere-se à ausência de dados).

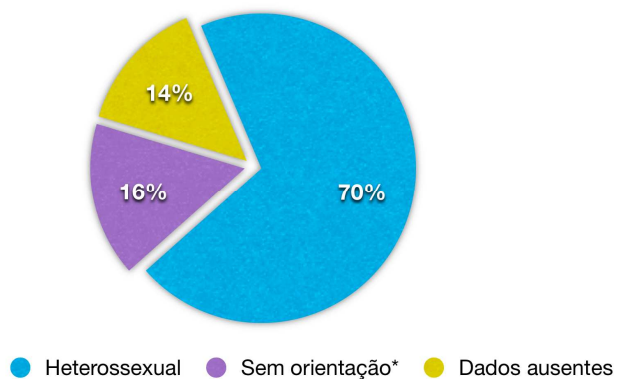


Figura 22- Orientação sexual dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana, Bahia

* Sem orientação refere-se às crianças menores de 14 anos participantes do estudo

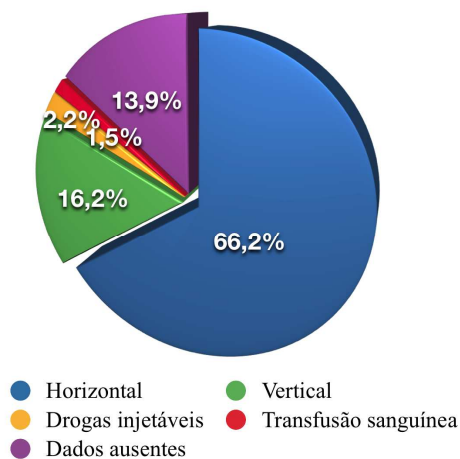


Figura 23- Caracterização dos pacientes infectados pelo HIV-1 de Feira de Santana de acordo com a via de transmissão do vírus

6.0- DISCUSSÃO

Diversos fatores do hospedeiro e do HIV-1 têm sido associados com a susceptibilidade à infecção pelo vírus e com o nível de replicação viral pós-infecção em diferentes indivíduos infectados. Algumas variações genéticas nesses organismos já estão bem caracterizadas como determinantes na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e na progressão para a AIDS. Entretanto, é possível que outros fatores ainda não identificados do hospedeiro estejam relacionados com o controle da infecção pelo vírus (FELLAY *et al.*, 2001; KAWASHIMA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 1996; ROGERS *et al.*, 2010; SCHMITZ *et al.*, 1999).

No contexto da transmissão sexual do HIV-1, a forma mais comum de infecção por este vírus no mundo, as LCs são o primeiro subtipo de DCs que entram em contato com o vírus. Estas células expressam, exclusivamente, a proteína Langerina, na sua superfície. A Langerina tem a capacidade de internalizar o HIV-1 nas LCs, através de seu CRD, e direcioná-lo aos Grânulos de Birbeck, que, por sua vez, pode impedir a infecção destas células através da degradação viral. Sendo assim, em um epitélio genital intacto, as LCs podem reduzir e até mesmo evitar a infecção pelo HIV-1 devido a sua destruição nos Grânulos de Birbeck (DE WITTE *et al.*, 2007^a; DE WITTE *et al.*, 2007^b; HIRBOD *et al.*, 2009; TADA *et al.*, 2006; TURVILLE *et al.*, 2002; VAN DER VLIST & GEIJTENBEEK, 2010).

Pelo fato da Langerina interagir com a gp120 viral através de seu CRD, é possível que variações neste domínio protéico possam afetar essa interação e interferir na entrada do HIV-1 nas LCs através da Langerina. Além disso, variações na região promotora do gene da Langerina também podem afetar sua expressão na superfície celular, o que também poderia interferir na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1. Entretanto, como as LCs também co-expressam as moléculas CD4 e CCR5, em carga viral elevada e/ou na incapacidade de interação entre a Langerina e a gp120 viral, devido a variações na própria Langerina, por exemplo, o HIV-1 pode entrar nas LCs através do mecanismo clássico de infecção: via CD4/CCR5, o que, por sua vez, evitaria a destruição do vírus nos Grânulos de Birbeck e facilitaria a infecção das LCs e a transmissão do HIV-1 para os linfócitos T CD4⁺ (DE WITTE *et al.*, 2007^a; DE WITTE *et al.*, 2007^b; FEINBERG *et al.*, 2010; SCHWARTZ, 2007; VAN DER VLIST & GEIJTENBEEK, 2010; WARD *et al.*, 2006).

A proteína CCR5 age como correceptor para as cepas R5 do HIV-1 e sofre modificações pós-traducionais em aminoácidos específicos dos domínios N- e C-terminais que são importantes para sua interação com a gp120 viral, levando à fusão entre as membranas e à infecção da célula-alvo. Por este motivo, mutações no gene *CCR5* que alteram aminoácidos nesses domínios proteicos podem interferir na habilidade de ligação da CCR5 à gp120 e afetar a entrada do HIV-1 (FARZAN *et al.*, 2000; O'BRIEN & MOORE, 2000; SAMSON *et al.*, 1996; SLATER-HANDSHY *et al.*, 2004).

Neste estudo, nós observamos a existência de três mutações na região promotora do gene *Langerina* (-577T>C, -517T>C e -160T>C) que, de acordo com as análises realizadas com a ferramenta MatInspector, levaram à criação de novos sítios de ligação para fatores de transcrição. Entretanto, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa quando as frequências alélicas e genotípicas das três mutações foram comparadas entre os indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1. Como o MatInspector é uma ferramenta que utiliza uma matriz com todos os sítios de ligação para fatores de transcrição já descritos, é possível que a criação dos novos sítios, sugeridos pela ferramenta após as substituições nucleotídicas, não tenham um verdadeiro impacto na função das LCs já que os fatores de transcrição que se ligam aos novos sítios de ligação criados por essas mutações podem não ser encontrados nas LCs. Além disso, não existem estudos funcionais que confirmem ou refutem os resultados apresentados pelas análises realizadas no MatInspector.

O estudo da região do gene *Langerina* que codifica para o CRD da proteína revelou a existência de três polimorfismos já descritos na literatura: c.941C>T (rs2080390), c.983C>T (rs13421115) e p.K313I (rs57302492). O SNP p.K313I resulta na substituição de uma lisina (K) por uma isoleucina (I) no final do CRD da Langerina (posição 313). Esta mutação aumentou os perfis de hidrofobicidade e de hélices transmembranares e diminuiu os perfis de hidrofiliabilidade, acessibilidade e antigenicidade no sítio protéico que envolve o polimorfismo, como resultado das análises físico-químicas realizadas, o que poderia diminuir o acesso da gp120 a esta região do CRD e afetar a entrada do HIV-1 através da Langerina nas LCs. Entretanto, a mutação p.K313I não alterou a predição da estrutura secundária da proteína e quando as frequências alélicas e genotípicas dos indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1 foram comparadas, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa, sugerindo que esta mutação não interfere na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 através da Langerina.

Em relação ao estudo da região do gene *CCR5* que codifica para o domínio N-terminal da proteína, foi observada uma mutação não-sinônima apenas em indivíduos não-infectados pelo HIV-1: a mutação p.L55Q. Esta mutação é caracterizada pela troca de um aminoácido apolar (leucina ou L) para um aminoácido polar (glutamina ou Q) que, de acordo com as análises físico-químicas e de modelagem por homologia da proteína realizadas, aumentou o perfil de flexibilidade desta região proteica e alterou a estrutura tridimensional da *CCR5* e a carga eletrostática, respectivamente. Esses resultados poderiam indicar que, uma vez que a mutação p.L55Q está localizada próxima à região da *CCR5* que de fato interage com a gp120 do HIV-1, a qual compreende o aminoácido 2 ao 18 do domínio N-terminal, essa mudança de aminoácido interfere na conformação do domínio N-terminal da *CCR5*, possivelmente afetando a região de interação viral e a ligação da gp120 a este domínio proteico, conseqüentemente.

Além disso, a mutação p.L55Q apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1 quando suas frequências alélicas e genóticas foram comparadas. Sendo assim, após a análise de todos esses resultados, pode-se sugerir que essa alteração de aminoácido poderia interferir na entrada do HIV-1 na célula através do correceptor *CCR5*. Entretanto, para confirmar essa hipótese e entender o verdadeiro papel da mutação p.L55Q na infecção pelo HIV-1 é necessária a realização de estudos adicionais com o intuito de comparar a frequência da mesma em indivíduos com diferentes perfis de infecção e verificar, através da realização de análises de ancoramento molecular, se essa mutação interfere na estabilidade da interação entre o domínio N-terminal da *CCR5* e a gp120 do vírus.

As três mutações observadas na região do gene *CCR5* que codifica o domínio C-terminal da proteína (c.3,765C>T, c.3,777A>T e c.3,831A>G) não causaram alteração na sequência de aminoácidos da proteína. O número de mutações detectadas nessa região gênica demonstra que a mesma é mais divergente do que a região que codifica o domínio N-terminal da proteína, sugerindo que o domínio C-terminal da *CCR5* sofre uma menor pressão seletiva quando comparado com o domínio N-terminal, provavelmente, devido a sua localização na região citoplasmática da célula.

Em resumo, os resultados apresentados por esse estudo sugerem que as mutações detectadas na região promotora do gene *Langerina*, na região codificante do CRD da proteína *Langerina* e na região do gene *CCR5* que codifica o domínio C-terminal da proteína não

apresentam um papel na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e que a mutação p.L55Q, encontrada no domínio N-terminal da CCR5 em indivíduos não-infectados pelo HIV-1, pode afetar a infecção pelo vírus por um mecanismo ainda não completamente compreendido. Sendo assim, novos estudos de variações genéticas humanas devem ser realizados com o intuito de se compreender melhor o papel da Langerina e da mutação p.L55Q do domínio N-terminal da CCR5 na infecção pelo HIV-1.

7.0- CONCLUSÕES

- A mutação *missense* p.L55Q identificada na proteína CCR5:
 - Não alterou nenhum sítio de modificação pós-traducional nem a estrutura secundária da proteína;
 - Aumentou os perfis de acessibilidade e flexibilidade da proteína;
 - Alterou a estrutura tridimensional da proteína e a carga eletrostática do domínio N-terminal da CCR5
 - Apresentou diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre os indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1.
- As mutações silenciosas c.3,765C>T, c.3,777A>T e c.3,831A>G identificadas no gene *CCR5* não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação às frequências alélicas e genotípicas entre os indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1, sendo que as mutações c.3,765C>T e c.3,777A>T caracterizaram-se como sítios polimórficos nas populações analisadas.
- As mutações 577T>C, -517T>C e -160T>C foram identificadas na região promotora do gene da Langerina, sendo que:
 - A mutação -577T>C criou um sítio de ligação para o fator de transcrição HOXB9.01 com similaridade de 1.0;
 - A mutação -517T>C criou um sítio de ligação para o fator de transcrição NFAT5 com similaridade de 1.0;
 - A mutação -160T>C criou sítios de ligação para os fatores de transcrição STAT6.01 e ETV1.02 com similaridades de 0.94 e 0.961, respectivamente, e excluiu os sítios de ligação para os fatores de transcrição MEL1.03 e NF1.01;
 - Não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre os indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1.
- Das mutações observadas na região codificante do CRD da Langerina (p.K313I, c.941C>T e c.983C>T):
 - A mutação p.K313I aumentou a hidrofobicidade e hélices transmembranares e reduziu os perfis de hidrofobicidade, acessibilidade e antigenicidade.

- A mutação p.K313I não alterou nenhum sítio de modificações pós-traducionais nem a estrutura secundária da proteína.
- Não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre os indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV-1.

8.0- REFERÊNCIAS

- Abbas AK & Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- Acharya P, Dogo-Isonagie C, Lam SN *et al.* Structure-based identification and neutralization mechanism of tyrosine sulfation mimetics that inhibit HIV-1 entry. *ACS Chem Biol*. Epub ahead of print 2011.
- Alves-Silva J, Santos M, Guimaraes PE *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444–461, 2000.
- Argos P, Rao JK, Hargrave PA. Structural prediction of membrane-bound proteins. *Eur J Biochem* 15: 565-575, 1982.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201, 2006.
- Atchison RE, Gosling J, Mionteclaro FS, Franci C, Digilio L, Charo IF, Goldsmith MA. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science*. 274:1924-1926, 1996.
- Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat*. Versão 5.0, Sociedade Civil Mamiraua, MCT-CNPq, Belém, Pará, Brasil, 2005.
- Bannwarth S, Gatignol A. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res*. 3(1):61-71, 2005.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220(4599):868-71, 1983.
- Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J *et al.* Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J Biol Chem*. 274:34719-34727, 1999.

Blanpain C, Lee B, Tackoen M, Puffer B, Boom A, Libert F, Sharron M, Wittamer V, Vassart G, Doms RW, Parmentier M. Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations. *Blood*. 96(5):1638-1645, 2000.

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV entry. *Nature*. 382:829-833, 1996.

Brelot A, Heveker N, Pleskoff O et al. Role of the first and third extracellular domains of CXCR4 in HIV co-receptor activity. *J Virol*. 71, 4744-4751, 1997.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 34(2):207-217, 2000.

Brumme ZL, Chan KJ, Dong W, Hogg R, O'Shaughnessy MV, Montaner JS, Harrigan PR. CCR5Delta32 and promoter polymorphisms are not correlated with initial virological or immunological treatment response. *AIDS*. 15(17):2259-66, 2001.

Bürglin TR. Homeodomain Proteins. In Meyers, R.A. (ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 179-222, 2005.

Callegari-Jacques SM, Salzano FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciencia Cult J Braz Assoc Adv Sci* 51:166-174, 1999.

Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien S, Dean M. Novel alleles of the Chemokine-Receptor Gene *CCR5*. *Am. J. Hum. Genet*. 61:1261-1267, 1997.

Carrington M, Dean M, Martin MP, O'Brien SJ. Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Genet*. 8(10):1939-45, 1999.

Cartharius K, Frech K, Grote K et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 21(13): 2933-2942, 2005.

Choe H, Li W, Wright PL, Vasilieva N et al. Tyrosine Sulfation of Human Antibodies Contributes to Recognition of the CCR5 Binding Region of HIV-1 gp120. *Cell*. 114, 161-170, 2003.

Clegg AO, Ashton LJ, Biti RA, Badhwar P, Williamson P, Kaldor JM, Stewart GJ. CCR5 promoter polymorphisms, CCR5 59029A and CCR5 59353C, are under represented in HIV-1-infected long-term non-progressors. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS*. 14(2):103-8, 2000.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 270(5243):1811-5, 1995.

Coetzer M, Nedellec R, Salkowitz J, Mclaughlin S, Liu Y, Heath L, Mullins JI, Mosier DE. Evolution of CCR5 use before and during coreceptor switching. *J Virol*. 82:11758-11766, 2008.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: Implications for genetics variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 267:483-489, 1995.

Combet C, Blanchet C, Geourjon C and Deléage G. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS*. 25(3):147-150, 2000.

Connie H. Jen, Kevin L Moore, and Julie A Leary. The pattern and temporal sequence of sulfation of CCR5 N-terminal peptides by tyrosylprotein sulfotransferase-2 an assessment of the effects of N-terminal residues. *Biochemistry*. 48(23):5332-8, 2009.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S and Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1 -infected individuals. *J Exp Med*. 185, 621-628, 1997.

Cormier EG, Persuh M, Thompson DA, Lin SW, Sakmar TP, Olson WC, Dragic T. Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(11):5762-5767, 2000.

Costa GC, Alcantara LC, Azevedo R *et al*. Frequency distribution of XbaIG>T and HaeIIIT>C GLUT1 polymorphisms among different Brazilian ethnic groups. *Mol Biol Rep* 37:75–79, 2010.

Cox ED, Hoffmann SC, DiMercurio BS *et al*. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation* 72:720–726, 2001.

de RodaHusman AM, Koot M, Cornelissen M, Keet IP, Brouwer M, Broersen SM, Bakker M, Roos MT, Prins M, de Wolf F, Coutinho RA, Miedema F, Goudsmit J, Schuitemaker H. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 127:882-90, 1997.

de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MAW, de Gruijl T, Piguet V, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nature Medicine.* 13(3):367-371, 2007a.

de Witte L, Nabatov A, Geijtenbeek TBH. Distinct roles for DC-SIGN+ dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends in Molecular Medicine.* 14(1):12-19, 2007b.

de Witte L, Bobardt M, Chatterji U, Degeest G, David G, Geijtenbeek TB, Galloway P. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 04(49):19464-9, 2007c.

Dean M, Carrington M, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science.* 273: 1856-62, 1996.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 381: 661-666, 1996.

Desgranges C, Carvajal P, Afani A, Guzman MA, Sasco A, Sepulveda C. Frequency of CCR5 gene 32-basepair deletion in Chilean HIV-1 infected and non-infected individuals. *Immunol Lett.* 76(2):115-7, 2001.

Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology.* 235: 179-190, 1997.

Doranz B, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG and Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell.* 85: 1149-1158, 1996.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* 381: 667-673, 1996.

Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxuel E, Smith SO, Sakmar TP, Moore JP. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:5639-5644, 2000.

Fahrback K, Barry S, Ayehunie S *et al*. Activated CD34-Derived Langerhans Cells Mediate Transinfection with Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*. 81(13), 6858-6868, 2007.

Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P *et al*. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*. 96:667-676, 1999.

Farzan M, Vasilieva N, Schnitzler CE, Chung S, Robinson J, Gerard NP, Gerard C, Choe H, Sodroski J. A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry. *J Biol Chem*. 275(43):33516-21, 2000.

Federspiel B, Melhado IG, Duncan AM. Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics*. 16(3):707-712, 1993.

Feinberg H, Powlesland A, Taylor ME, Weis WI. Trimeric Structure of Langerin. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(17):13285–13293, 2010.

Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M *et al*. A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. *Science*. 317(5840):944-947, 2007.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 272(5263):872-7, 1996.

Finn RD, Mistry J, Tate J, Coghill P, Heger A *et al*. The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res*. 38:211-222, 2010.

Gallo RC & Wong-Staal F. A human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*. 103(5):679-89, 1985.

Galvão J. 1980-2001: uma cronologia da epidemia de HIV/AIDS no Brasil e no mundo. - Rio de Janeiro: ABIA, 2002.

Gayle H & Koplan JP. Prevention Perinatal AIDS transmission declines while deaths level off AIDS. *Policy Law*.16:5, 2001.

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 100(5):587-97, 2000.

Gerard C & Gerard NP. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. *Curr. Opin. Immunol*. 6:140-145, 1996.

Gorry PR & Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*. [Epub ahead of print], 2010.

Grimaldi R, Shindo N, Acosta AX, Dourado I, Brites C, de Melo Carvalho O, Brito I, Bou-Habib DC, Galvão-Castro B. Prevalence of the CCR5Delta32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. *Hum Genet*. 111(1):102-4, 2002.

Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul W, Picker L. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as importante as what it destroys. *Nature Medicine*. 12(3): 289-295, 2006.

Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp P. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*. 287: 607-614, 2000.

Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 41:95-98, 1999.

Herzog H, Hort YJ, Shine J. Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation. *DNA Cell Biol*. 12(6):465-71, 1993.

Hirbod T, Kaldensjo T, Lopalco L, Klareskog E, Andersson S *et al*. Abundant and Superficial Expression of C-type Lectin Receptors in Ecotocervix of Women at Risk of HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 51 (3), 239-247, 2009.

- Hoffman NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol.* 76(8):3852-64, 2002.
- Hopp TP, Woods KR. Physico-chemical profiles: A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol Immunol* 20: 483-489, 1983.
- Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins (1979). *Nature* 277:491-491.
- Kawamura T, Kurtz SE, Blauvelt A, Shimada S. The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV. *J Dermatol Sci.* 40(3):147-55, 2005.
- Kawashima Y, Pfafferot K, Frater J, Matthews P, Payne R *et al.* Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature.* 458 (7238):641-645, 2009.
- Kogowa K, Nagafuchi S, Katsuta H, Kudoh J, Tamiya S *et al.* Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage. *Immunol Lett.* 80(3):195-198, 2002.
- Kyte J, Doolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132, 1982.
- Land A & Braakman I. Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie.* 83:783-790, 2001.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS and Thornton JM: PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 1993; 26:283–291.
- Lee GM, Donaldson LW, Pufall MA *et al.* The structural and dynamic basis of Ets-1 DNA binding autoinhibition. *J. Biol. Chem.* 280 (8): 7088–99, 2005.
- Lewandowska M , Jagodzinski PP, Trzeciak WH. Decreased density of the CCR5 receptor on the surface of CD4+ lymphocytes and monocytes/macrophages is associated with the CCR5-59653T transition in the promoter region. *Folia Histochem Cytobiol.* 40(2):101-2, 2002.
- Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature.* 434:1148-1152, 2005.

Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M, Martina C, Olivieri F, Cavallone L, Giovanietti S, Masliah E, Franceschi C. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging*. 24(7):921-6, 2003.

Littman DR. Chemokine receptors: key to AIDS pathogenesis? *Cell*. 93: 677-680, 1998.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 86(3):367-377, 1996.

Lu Z, Berson JF, Chen Y *et al*. Evolution of HIV-1 co-receptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94, 6426-6431, 1997.

Mangano A, Prada F, Roldán A, Picchio G, Bologna R, Sen L. Distribution of CCR-5 delta32 allele in Argentinian children at risk of HIV-1 infection: its role in vertical transmission. *AIDS*. 12(1):109-10, 1998.

Martin MP, Dean M, Smith MW, Carrington. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science*. 282(4):1907-1911, 1998.

McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleebereger CA, Leitman SF, MACS and Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *The Lancet*. 352:866-870, 1998.

McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol*. 41:1109-1121, 2004.

McMichael AJ, Borrow O, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 10:11-23, 2010.

Meenagh A, Williams F, Ross OA *et al*. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum Immunol* 63:1055–1061, 2002.

Meunier JC, Fournillier A, Choukhi A, Cahour A, Cocquerel L, Dubuisson J, Wychowski C. Analysis of the glycosylation sites of Hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J. Gen. Virol*. 80(4):887-896, 1998.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, AIDS e Hepatites virais. Boletim epidemiológico – AIDS e DST. Em http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/45974/vers_o_final_15923.pdf, acessado em 02 de Fevereiro de 2012. Brasil, Ministério da Saúde, 2010.

Mogensen T, Melchjorsen J, Larsen C, Paludan S. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 7:54-73, 2010.

Montecarlo FS & Charo IF. The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP1-alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *J. Biol. Chem.* 271:19084-19092, 1996.

Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J Biol Chem.* 272(49):30662-71, 1997.

Nazari R & Joshi S. CCR5 as Target for HIV-1 Gene Therapy. *Current Gene Therapy*. 8 (4), 264-272, 2008.

Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS*. 4:14, 1997.

Nomura H, Nielsen BW, Matsushima K. Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int Immunol* 5(10):1239-49, 1993.

Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arezana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 382:833-835, 1996.

O'Brien SJ & Dean M. In search of AIDS-resistance genes. *Scientific American*. 28-36, 1997.

O'Brien TR, Winkler C, Dean M *et al.* HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5Δ532. *Lancet*. 349:1219, 1997.

O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev.* 177:99-111, 2000.

Pantaleo G & Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:825-854, 1996.

Ometto L., Zanchetta M, Cabrelle A, Esposito G, Mainardi M, Chieco-Bianchi L, De Rossi A. Restriction of HIV type 1 infection in macrophages heterozygous for a deletion in the CC-chemokine receptor 5 gene. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 15:16, 1441-1452, 1999.

Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry.* 25: 5425-5431, 1986.

Passos GA Jr, Picanço VP. Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunol Lett.* 61(2-3):205-7, 1998.

Peterlin BM & Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol.* 3(2):97-107, 2003.

Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, Gezelter S, Schuler G, Steinman RM. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell.* 78(3):389-98, 1994.

Rabut GE, Konner JA, Kajumo F *et al.* Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 72, 3464-3468, 1998.

Raymon M & Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86:248-249, 1995.

Reece JC, Handley AJ, Anstee EJ, Morrison WA, Crowe SM, Cameron PU. HIV-1 selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin. *J Exp Med.* 187(10):1623-31, 1998.

Regoes RR & Bonhoeffer S. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol.* 13(6), 269-277, 2005.

Rinne A, Banach K, Blatter LA. Regulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in vascular endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 47(3):400-410, 2009.

Roberts JD, Benbenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science.* 242:1171-1173, 1988.

Rogers F, Lim SY, Sundsvold TJ, Chan T, Hsu A, Letvin NL. Variability in a dominant block to SIV early reverse transcription in rhesus monkey cells predicts *in vivo* viral replication and time to death. *Virology Journal.* 7:79-90, 2010.

Roman F, Franck N, Burgy C, Servais J, Zimmer JM, Mossong J, Goubau P, Schneider F, Hemmer R, Schmit JC. Prevalence of HIV co-receptor polymorphisms in HIV-infected patients and uninfected volunteers in Luxembourg. *HIV Clin Trials.* 3(3):195-201, 2002.

Rucker J, Samson M, Doranz BJ, Libert F, Berson JF, Yi Y, Smyth RJ, et al. Regions of β -chemokines receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell.* 87:437-446, 1996.

Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SEF, Usuku K, Bangham CRM, Osame M. Polymorphism in the Interleukin-10 Promoter Affects Both Provirus Load and the Risk of Human T Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis. *J. Infect Dis* 190: 1279-85, 2004.

Sali A & Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234:779-815, 1993.

Salzano FM, Freire-Maia N. Imigração e Miscigenação. In: Companhia Editora Nacional (ed) Populações Brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo-Brasil, pp 32–39, 1967.

Samson M, Libert F, Doranz BJ *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382:722-725, 1996.

Scarlata S, Carter C. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta.* 1614(1):62-72, 2003.

Schwartz O. Langerhans cells lap up HIV-1. *Nature Medicine.* 13:245-246, 2007.

Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science*. 283(5403):857-860, 1999.

Seibert C, Cadene M, Sanfiz A, Chait BT, Sakmar TP. Tyrosine sulfation of CCR5 N-terminal peptide by tyrosylprotein sulfotransferases 1 and 2 follows a discrete pattern and temporal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(17):11031-6, 2002.

Sierra S, Kaiser R, Thielen A, Lengauer T. Genotypic coreceptor analysis. *Eur J Med Res*. 12(9):453-462, 2007.

Simmonds P, Balfe P, Ludem CA, Bishop JO, Leigh-Brown AJ. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 64:5840-5850, 1990.

Slater –Handshy T, Droll DA, Fan X, Di Bisceglie AM, Chambers TJ. HCV E2 glycoprotein : mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology*. 319 :36-48, 2004.

Stambach NS & Taylor ME. Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology*. 13(5):401-10, 2003.

Tada Y, Riedl E, Lowenthal M, Liotta L, Briner D, Crouch E, Udey M. Identification and Characterization of endogenous Langerin ligands in Murine Extracellular Matrix. *Journal of Investigative Dermatology*. 126:1549-1558, 2006.

Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Strina A *et al*. Sentinel areas: a monitoring strategy in public health. *Caderno de Saúde Pública*. 18(5):1189-1195, 2002.

Thépaut M, Valladeau J, Nurisso A, Kahn R, Arnou B, Vivès C, Saeland S, Ebel C, Monnier C, Dezutter-Dambuyant C, Imberty A, Fieschi F. Structural studies of langerin and Birbeck granule: a macromolecular organization model. *Biochemistry*. 48(12):2684-98, 2009.

Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stössel H, Romani N, Piatak M Jr, Lifson JD, Pope M, Cunningham AL. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 103(6):2170-9, 2004.

Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol.* 7 :144-149, 1999.

UNAIDS and WHO. AIDS epidemic update 2009. Em <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/epidemiology/2009aidsepidemicupdate>, acessado em 02 de Fevereiro de 2012. Geneva, UNAIDS, 2010.

Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin J, Kissenpfennig A et al. Identification of Mouse Langerin/CD207 in Langerhans Cells and Some Dendritic Cells of Lymphoid Tissues. *The Journal of Immunology.* 168: 782-792, 2002.

van der Vlist M & Geijtenbeek T. Langerin functions as an antiviral receptor on Langerhans cells. *Immunology and Cell Biology.* 88:410-415, 2010.

Veazey RS, Klasse PJ, Schader SM, Hu Q, Ketas TJ, Lu M, Marx PA, Dufour J, Colonno RJ, Shattock RJ, Springer MS, Moore JP Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion. *Nature.* 438(7064):99-102, 2005.

Verdijk P, Dijkman R, Plasmeijer EI, Mulder AA, Zoutman WH, Mommaas AM, Tensen CP. A lack of Birbeck granules in Langerhans cells is associated with a naturally occurring point mutation in the human Langerin gene. *J. Invest. Derm.* 124:714-717, 2005.

Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Kuriyan J. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279 (5353): 1048–52, 1998.

Walker BD: Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* 2007; 15:134-136.

Ward E, Stambach N, DricKamer K, Taylor M. Polymorphisms in Human Langerin Affect Stability and Sugar Binding Activity. *The Journal of Biological Chemistry.* 281(22):15450-15456, 2006.

Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW *et al.* Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature.* 460, 711-716, 2009.

Yi Y, Shaheen F, Collman RG. Preferential use of CXCR4 by R5X4 HIV-1 isolates for infection of primary lymphocytes. *J Virol.* 79 :1480-1486, 2005.

Yoshikawa T, Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, Tanaka T, Yamaguchi M, Shigeta H, Ogata M, Nakamura N. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 19: 1000-1005, 2002.

Zhang M, Gaschen B, Blay W *et al.* Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*. 14(12):1229-1246, 2004.

Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol. Med* . 3(1):23-36, 1997.

9.0- APÊNDICE**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de pesquisa.

“Variabilidade genética dos isolados do HIV-1, em mulheres e crianças infectadas de Feira de Santana”.

Pesquisadores: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara (Orientador) e Dr Edson de Souza Santos.

Assino o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que foi por mim lido e entendido nos seguintes aspectos:

Que o presente estudo, pretende verificar as variedades genéticas dos isolados do vírus HIV-1, nas mulheres e crianças infectadas deste Centro de Referências de DST/HIV de Feira de Santana, possibilitando um melhor conhecimento da doença e sua relação com evolução clínica . Isto poderá trazer melhores benefícios para o acompanhamento dos pacientes. O presente estudo faz parte do trabalho de dissertação, para o Curso de Pós- Graduação em Medicina e Saúde Humana, nível de Mestrado, da Fundação para o Desenvolvimento da Ciência, Escola Bahiana de Medicina.

Inicialmente o pesquisador irá coletar 02 (dois) ml de sangue, no momento em que será coletada amostra para os exames de rotina das pacientes, os quais serão encaminhados ao LASP, Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz(CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz, localizado em Salvador à Rua Waldemar Falcão, em Brotas onde serão realizados os exames de biologia molecular, que permitirão identificar os variantes genéticos do HIV-1.

Após o conhecimento dos resultados, estes serão repassados aos médicos assistentes das pacientes, que as informarão no momento propício, no Centro de Referências DST/HIV

É importante ressaltar, que a realização desta pesquisa não acarretará nenhum custo aos pacientes envolvidos. É garantido também, que não será revelado em hipótese alguma o nome e/ou dados que possam identificar os envolvidos, mantendo-se o princípio da sigibilidade absoluta. A participação nesta pesquisa é voluntária e a qualquer momento o indivíduo poderá sair dela, além do que as dúvidas poderão ser tiradas, a respeito do tema, com os pesquisadores ou com as instituições envolvidas neste estudo, e com o Comitê de Ética da FBDC, Escola Bahiana de Medicina, localizado Av D.João VI, 274 Brotas, Salvador ,Ba, CEP, 40-290-000.

Os resultados deste estudo,serão publicados em revistas médicas e/ou congressos, mas o nome dos participantes não será citado . A recusa em participar desta pesquisa na me causará nenhum prejuízo,nem interrupção, ou alteração no tipo de assistência que venho recebendo.

Feira de Santana, -----de-----de 2007

Participante-----RG-----

Pesquisador-----RG-----

10.0- ANEXO



FUNDAÇÃO BAHIANA PARA DESENVOLVIMENTO DAS CIÊNCIAS
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Salvador, 22 de fevereiro de 2008.

DOC.N. 013/2008

REFERENTE AO PROTOCOLO N. 86/2007

*Variabilidade genética dos isolados do HIV-1 em mulheres e crianças infectadas de Feira de Santana

Pesquisador: Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, após a análise do ponto de vista bioético do Protocolo acima citado considera que o Protocolo atende aos princípios éticos em pesquisa em seres humanos, segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP CNS-MS). Diante do exposto julga o protocolo supracitado como APROVADO.

Lembramos a necessidade do envio de relatório anual do andamento da pesquisa, dentro do cronograma citado no mesmo protocolo.


Prof. Dra. Lucíola Maria Lopes Crisóstomo
Coordenadora do CEP/FBDC.

Ilmo. Sr.
PROF. LUIZ CARLOS JÚNIOR ALCÂNTARA
Rua Cícero Simões, 225 – Apart. 301 – Pituba
CEP.41.830-475 – Salvador-Bahia.