

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Elis Amaral Rosa

**ESTUDO DE FATORES COMPORTAMENTAIS E SOLÚVEIS
ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AO HIV EM PARCEIROS
SORONEGATIVOS DE CASAS HIV SORODISCORDANTES.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências. Área de concentração: Microbiologia e Parasitologia.
Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Rosa, Elis Amaral

Estudo de fatores comportamentais e solúveis envolvidos na resistência ao HIV em parceiros soronegativos de casais HIV sorodiscordantes. [dissertação] / Elis Amaral Rosa ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto - Florianópolis, SC, 2012. 92 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Expostos e não soroconvertidos. 3. Quimiocinas. 4. Defensinas. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

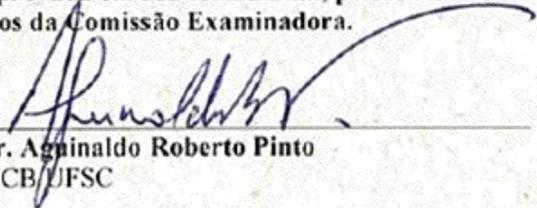
“Estudo de fatores solúveis e comportamentais envolvidos na resistência ao HIV em parceiros soronegativos de casais HIV-sorodiscordantes.”

POR

ELIS AMARAL ROSA

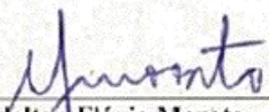
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:

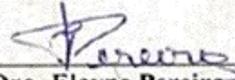


Prof. Dr. Aginaldo Roberto Pinto
MIP/CCB/UFSC

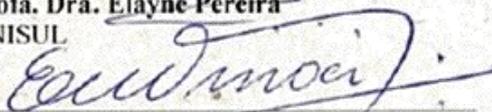
Comissão Examinadora:



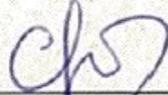
Prof. Dr. Edelson Flávio Morato
MIP/CCB/UFSC



Profa. Dra. Elayne Pereira
UNISUL



Profa. Dra. Edna Maria V. Reiche
Centro de Ciências da Saúde/
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC
Florianópolis, Junho de 2012.

Dedico esta dissertação aos casais participantes desta pesquisa, por serem a parte mais importante desse trabalho e por tudo que me ensinaram nas entrevistas.

AGRADECIMENTOS

Felizmente este trabalho pode contar com a colaboração de muitas pessoas. Aqui presto meus sinceros agradecimentos:

ao Prof. Aguinaldo, pela orientação e pela contribuição com a minha formação, bem como pela compreensão e pelo apoio na construção deste trabalho;

aos voluntários, pela disposição em colaborar com esse projeto e por me permitir conhecer um pouco mais de suas histórias;

à todos os profissionais de saúde do HEMOSC e do Hospital Dr. Homero de Miranda Gomes, sempre muito cordiais e solícitos em auxiliar nas coletas e no contato com os pacientes,

à Dra. Andrea Petry, nossa parceira no HEMOSC, por facilitar o nosso contato com este centro e pela realização dos testes NAT;

ao Dr. Luiz Gustavo Escada Ferreira, nosso parceiro no Hospital Dr. Homero de Miranda Gomes, pela disposição no recrutamento dos pacientes, bem como pela cordialidade e disponibilidade em participar deste e de outros trabalhos realizados por nosso grupo;

à Dra. Magali Chaves Luiz e Dr. Fábio Gaudenzi de Faria, nossos parceiros no Hospital Nereu Ramos, por receber tão bem nosso trabalho neste hospital e pelo auxílio no recrutamento dos casais sorodiscordantes;

à MsC. Ariadne da Cruz, sempre simpática e prestativa, pela disponibilidade em nos acompanhar nas coletas e realizar o teste odontológico PSR;

à Dra. Elayne Pereira, grata amizade que esse trabalho me trouxe de presente, pelas contribuições teóricas no início do projeto, por todos os cafés, almoços e conselhos;

à Prof. Dra. Malva Isabel Medina Hernandez, por me ensinar o pouco que sei sobre estatística e pela contribuição nas escolhas das análises realizadas neste trabalho;

às queridas MsC. Celina Yamanaka, MsC. Nicole Menezes de Souza e MsC. Bibiana Sgorla de Almeida, pelo auxílio indispensável nas coletas de sangue, sem vocês meninas, não teria conseguido tocar esse trabalho;

aos colegas do LIDI, pela parceria nos congressos de Imunologia e pela sempre disposição em colaborar comigo, em especial o Prof. André Báfica, pela permissão em utilizar equipamentos deste laboratório, o que foi fundamental para a conclusão do presente trabalho;

aos colegas de turma, Clei, Aline, Elisa, Celina, Nicole, Nana, Virgílio, Verônica, Álvaro, Eduardo, Adriane, que com descontração ajudaram a

suportar os intensos primeiros meses de disciplinas, e mais do que ninguém sabem como essa foi uma fase complicada no decorrer deste mestrado;

aos amigos do LIA, Carol, Nana, Luan, Yuri, Dudu, Duda, Kamille, Thaís, Anderson, Victor e Zanetti, que ao longo desse tempo de mestrado permitiram que eu me sentisse em casa nesse laboratório, tornando-o um lugar de trabalho e estudo, mas também de reflexões e sobretudo de amizade;

aos meus queridos moluscos, Pi e Dé, que acompanharam literalmente de perto todo o processo de confecção da dissertação e mais do que ninguém sofreram as influências das alterações de humor que ele me causou, obrigada por me aguentar e por me acolher sempre;

à todos os meus amigos que me acompanharam nesse período e estiveram sempre dispostos a compartilhar as alegrias e inseguranças dessa dissertação, especialmente meus amores Carol, Rubs, Tice, Luli, Fêrrr, Ricardo, Félix, Clara, Kika e Pri, por sempre estarem ali, seja para desabafar ou para tirar uma dúvida sobre uma análise, minha sincera gratidão;

aos meus pais e meu irmão, obrigada pela força e o suporte que me permitiram chegar até aqui, a vocês todo meu mais sincero amor.

“Quando os ventos da mudança sopram,
uns levantam barreiras, outros constroem
moinhos de vento.”
(Érico Veríssimo)

RESUMO

Existem indivíduos que mesmo expostos sexualmente ao HIV não são infectados, como no caso de casais sorodiscordantes. Apesar do contato com o vírus, o parceiro saudável permanece soronegativo e os mecanismos envolvidos nessa possível resistência seguem pouco esclarecidos. Fatores genéticos, imunológicos, virológicos e comportamentais podem estar envolvidos nesta proteção. Assim, o presente trabalho buscou comparar hábitos de vida e quantificar moléculas relacionadas ao sistema imune de 9 casais sorodiscordantes e 12 indivíduos saudáveis, os quais foram divididos em três grupos: parceiros soropositivos, parceiros soronegativos e controle. Os voluntários responderam a um questionário sócio-comportamental e cederam amostras de sangue periférico e saliva. No plasma e saliva foram quantificadas as β -defensinas HBD2 e HBD3 através de ensaios de ELISA e as β -quimiocinas RANTES, MIP1- β , eotaxina-1 e MCP-1 através de ensaios de CBA. Entre os grupos não houve diferença significativa na média de idade, tempo de relacionamento, gênero, índice de massa corporal, prática de atividade física e ingestão de álcool. O consumo de carne vermelha foi maior e o de cereais menor entre os indivíduos soronegativos. Somente entre os casais sorodiscordantes houve relatos de transfusões sanguíneas, tabagismo e uso de drogas ilícitas. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de HBD2 e MIP1- β entre os grupos avaliados. Os soropositivos apresentaram menores concentrações de HBD3 na saliva e maiores concentrações de RANTES no plasma do que os demais grupos. Não se observou expressão aumentada de HBD2, HBD3, RANTES ou MIP1- β entre os parceiros soronegativos embora tais moléculas tenham sido descritas como capazes de inibir a replicação viral. Em contrapartida, MCP-1 e eotaxina-1 foram observadas em maiores concentrações no plasma dos indivíduos soronegativos, indicando que estas moléculas podem estar relacionadas à proteção contra o HIV. Por conseguinte, a resistência ao HIV é potencialmente conferida por uma gama de fatores e estudos que demonstrem a contribuição de diferentes moléculas aos mecanismos de resistência são muito importantes na compreensão da dinâmica da infecção viral.

Palavras-chave: HIV; AIDS; casais sorodiscordantes; defensinas; quimiocinas.

ABSTRACT

Some individuals are exposed to HIV but not become infected, as in serodiscordant couples. Despite the contact with the virus, the healthy partner remains seronegative and the mechanisms involved in this resistance are poorly understood. Genetic, immunological, virological, and behavioral factors may be involved in this protection. Thus, this study aimed to evaluate and compare lifestyles and immunological molecules of 9 serodiscordant couples and 12 healthy individuals, which were divided into three groups: seropositive partners, seronegative partners and controls. The volunteers answered a social and behavioral questionnaire and donated peripheral blood and saliva samples. β -defensins HBD2 and HBD3 were quantified in plasma and saliva by ELISA assays and β -chemokines RANTES, MIP1- β , eotaxin-1 and MCP-1 by CBA. There was no significant difference among the groups related to averages of age, time of relationship, gender, alcohol consumption, body mass index and physical activity. The consumption of red meat was higher within seronegative group, while they consumed cereals less frequently. Only serodiscordant couples had received blood transfusion and consumed drugs or cigarettes. There were no significant differences in HBD2 and MIP1- β concentrations among the groups. The seropositive partners had lower concentrations of HBD3 in saliva and higher concentrations of RANTES in plasma. Although described in the literature as able to inhibit viral replication, an increased expression of HBD2, HBD3, RANTES or MIP1- β between the exposed seronegative individuals was not observed. However, eotaxin-1 and MCP-1 were observed in higher concentrations in plasma of seronegative partners. Therefore, the resistance to HIV is likely due to a range of factors, and studies that demonstrate the contribution of different molecules to the virus resistance mechanisms are considerably important to understand the dynamic of viral infection.

Keywords: HIV; AIDS; serodiscordants couples; defensins; chemokines..

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1: Quantificação de beta defensinas nas amostras de saliva..... 53
- Fig. 2: Quantificação de quimiocinas nas amostras de plasma..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características socioeconômicas, hábitos alimentares e de saúde dos indivíduos incluídos neste estudo.....	49
Tabela 2: Tempo de união do casal e uso de preservativo durante práticas sexuais dos indivíduos incluídos neste estudo	51
Tabela 3: Características clínicas dos indivíduos soropositivos dos casais sorodiscordantes	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolna-6- ácido sulfônico)
AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
BSA – Albumina de soro bovino
CBA – Matriz citométrica de microesferas (do inglês *Cytometric Bead Array*)
CCR5 – Receptor de quimiocina C-C do tipo 5
CXCR4 – Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4
DP – Desvio padrão
ENS – Expostos e não soroconvertidos
g – Unidades de gravidade
HBD2 – B- defensina 2
HBD3 – B- defensina 3
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HLA – Antígeno leucocitário humano
HNP-1 – Peptídeo de neutrófilos humanos (alfa defensina 1)
HRP – Avidina conjugada à peroxidase
IMC – Índice de massa corporal
MFI – Intensidade média de fluorescência
MCP-1 – Proteína-1 quimiotática de monócito
MIP1 α – Proteína-1 α inflamatória de macrófago
MIP1 β – Proteína-1 β inflamatória de macrófago
NAT – Teste de ácido nucléico
PBMC – Células mononucleares de sangue periférico
PE – Ficoeritrina
PSR – Registro periodontal simplificado
RANTES – Regulado após ativação, expresso por células T normais e secretado.
SDF1 – Fator secretado derivado de célula estromal 1
SHIV – Vírus quimérico da imunodeficiência humana e símia
SIV – Vírus da imunodeficiência símia
SUS – Sistema Único de Saúde
TARV – Terapêutica antirretroviral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	24
1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA.....	26
1.4 INDIVÍDUOS RESISTENTES AO HIV.....	28
1.5 FATORES ASSOCIADOS COM RESISTÊNCIA À INFECÇÃO PELO HIV.....	31
2. HIPÓTESE.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4. METODOLOGIA.....	41
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	41
4.2 LOCAL, POPULAÇÃO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO..	41
4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	41
4.4 DOSAGEM DE DEFENSINAS NO PLASMA E SALIVA.....	43
4.5 DOSAGEM DE QUIMIOCINAS NO PLASMA E SALIVA.....	43
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
5. RESULTADOS.....	47
5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	47

5.2 QUANTIFICAÇÃO β -DEFENSINAS.....	52
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS.....	53
6. DISCUSSÃO.....	56
7. SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	65
8. CONCLUSÃO.....	67
9. REFERÊNCIAS.....	69
10. APÊNDICES.....	83
10.1 APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	83
10.2 APÊNDICE 2: CARTAZ UTILIZADO PARA DIVULGAÇÃO.....	86
10.3 APÊNDICE 3: QUESTIONÁRIO SÓCIO-COMPORTAMENTAL.....	87

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem se configurado como uma das mais importantes e devastadoras epidemias contemporâneas. A partir da identificação dos primeiros casos, no início da década de 1980, observou-se ampla disseminação do vírus pelo mundo, representando atualmente uma importante pandemia (REYNOLDS & QUINN, 2010). A transmissão do HIV se dá através de relações sexuais desprotegidas, pelo compartilhamento de agulhas por usuários de drogas injetáveis, transmissão vertical durante a gravidez ou através do aleitamento e pelo uso de hemoderivados contaminados com o vírus, sendo a transmissão sexual a responsável pela maioria dos novos casos (LEVY, 2009; FOLKERS & FAUCI, 2010).

Graças ao desenvolvimento da terapêutica antirretroviral (TARV), a infecção pelo HIV passou a ser uma doença passível de controle, garantindo maior sobrevida a muitos pacientes. No entanto, o uso destes fármacos tem muitos efeitos colaterais, o que compromete a qualidade de vida do paciente, além de muitas vezes levar ao abandono do tratamento (LUCAS, 2012). Além disso, para a grande maioria das pessoas que vivem com HIV, a TARV ainda não é uma realidade, principalmente em países com poucos recursos financeiros, onde o HIV continua a devastar famílias, especialmente as de baixa renda (ABDOOL et al., 2010). Assim, mais estudos a respeito do HIV continuam sendo necessários a fim de encontrar novas alternativas terapêuticas, estratégias preventivas bem como uma possível cura.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Segundo o Programa das Nações Unidas para o HIV/AIDS (UNAIDS), em 2009 o número de pessoas vivendo com HIV em todo o mundo atingiu cerca de 32,8 milhões, sendo identificadas por volta de 2,6 milhões de novas infecções e 1,8 milhões de mortes causadas pelo HIV (UNAIDS, 2010). O grande número de pessoas vivendo com HIV reflete os efeitos combinados de taxas persistentemente altas de novas infecções e a influência benéfica do TARV. Nas Américas Central e do Sul existem aproximadamente 1,4 milhões de pessoas infectadas e cerca de 92 mil infecções aconteceram no ano de 2009, com 58 mil mortes em decorrência do vírus no mesmo ano. Aproximadamente um terço das pessoas que vivem com HIV nas Américas Central e do Sul residem no Brasil (UNAIDS, 2010).

No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS em 1980 até junho de 2011, foram notificados 608.230 casos da doença e 241.469 óbitos devido à infecção foram declarados (BRASIL, 2011). Em 2010 a taxa de incidência da infecção por HIV foi de 17,9 por 100.000 habitantes, enquanto que a prevalência se manteve em 0,6%. Do total de casos de HIV registrados no Brasil em 2010, 56,4% foram notificados na região Sudeste. Entretanto a taxa de incidência ao longo dos últimos anos nesta região tem diminuído, diferente da situação observada nas regiões Sul, Norte e Nordeste. O Sul do país foi, em 2010, a área com maior taxa de incidência da enfermidade, 28,8 casos a cada 100 mil habitantes. Neste ano a região contava com 14,4% da população brasileira, porém concentrava 23,1% dos casos de HIV do país, principalmente devido ao grande número de casos registrados nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (BRASIL, 2011).

Em Santa Catarina, desde a primeira ocorrência de AIDS notificada em 1984 até junho de 2011, o número de casos totaliza 30.284, sendo 25.950 casos em indivíduos acima dos 13 anos. Em 2010 a taxa de incidência de HIV em Santa Catarina foi de 30,2 por 100.000 habitantes, a quarta maior incidência dentre os estados brasileiros. A incidência do vírus no estado vem diminuindo, embora desde o ano 2000 permaneça figurando entre as maiores taxas do Brasil, com valores muito acima da média nacional. O vírus encontra-se amplamente difundido no território catarinense, sendo que dos seus 293 municípios, 252 (86%) notificaram pelo menos um caso de AIDS. Em 2010 a taxa de incidência de HIV em Florianópolis foi 57,9 por 100.000 habitantes, a segunda maior dentre as capitais brasileiras. São José, com taxa de incidência de 57,2 por 100.000 habitantes, e Biguaçu, 60,13 por 100.000 habitantes, ambas localizadas na região metropolitana de Florianópolis, também apresentaram altos índices de HIV em 2010, figurando junto com a capital entre as quinze cidades brasileiras com maior taxa de incidência do vírus neste ano (BRASIL 2011, SANTA CATARINA 2011).

O perfil epidemiológico relacionado ao HIV vem se alterando ao longo do tempo, tanto nacionalmente, como no estado de Santa Catarina. Nos últimos anos, a transmissão heterossexual tem sido a principal via de infecção pelo HIV, acompanhada de uma expressiva participação das mulheres na dinâmica da epidemia, bem como uma marcada interiorização na ocorrência de casos da doença e pauperização das pessoas acometidas (BRASIL, 2011; SANTA CATARINA, 2011).

1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA.

Após o relato dos primeiros casos de AIDS, o HIV foi isolado em pacientes com linfadenopatia persistente por dois grupos independentes de pesquisadores (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; GALLO et al., 1983). Em 1986, outro tipo de retrovírus associado à imunodeficiência humana foi encontrado em pacientes com AIDS na África Ocidental (CLAVEL et al., 1986). Este novo vírus foi denominado HIV-2 e os isolados iniciais foram classificados como HIV-1. Os dois tipos de HIV, HIV-1 e HIV-2, possuem morfologia e tropismo celular semelhantes, porém diferem quanto à organização genômica, transmissibilidade, virulência e distribuição geográfica: enquanto os casos de infecção pelo HIV-2 permanecem quase restritos à África Ocidental, o HIV-1 dispersou-se por todos os continentes e é o responsável pela pandemia de AIDS (LEVY, 2009).

O HIV é um retrovírus envelopado pertencente à família dos *Lentivirus*, sendo seu genoma composto por quatro segmentos básicos, dentre os quais estão as regiões LTR (*long terminal repeats*) e os genes *gag*, *pol* e *env*. As regiões LTR estão localizadas nas duas extremidades do genoma dos retrovírus. Estes elementos contêm regiões importantes para a regulação da transcrição dos provírus. O gene *gag* codifica as proteínas do capsídeo viral, o gene *pol* as enzimas envolvidas no ciclo de replicação viral e o gene *env* as proteínas do envelope viral. O HIV-1 possui também seis genes adicionais regulatórios e acessórios cada um exercendo uma função importante durante a replicação viral: *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, e *nef* (FREED et al., 2001).

A penetração do vírus na célula hospedeira se inicia por meio da interação entre a proteína viral gp120 e a molécula CD4 na superfície celular. As células alvo são preferencialmente os linfócitos TCD4+, além de macrófagos, monócitos, células dendríticas e células da micróglia, que também expressam o receptor CD4. Após essa primeira interação, o vírus utiliza os receptores de quimiocinas CCR5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5) e CXCR4 (receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4), como correceptores na membrana da célula hospedeira para completar o processo de penetração, sendo essa ligação necessária para o sucesso da infecção viral (WU & YODER, 2009). Em seguida, ocorre a adsorção e conseqüente fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, permitindo que o capsídeo penetre no citoplasma. Ocorrendo a liberação do capsídeo no interior celular o genoma de RNA é transcrito em cDNA pela ação da enzima viral transcriptase reversa. O cDNA recém-sintetizado é transportado até o núcleo celular e integrado

ao genoma do hospedeiro, tornando-se um provírus (VANDEGRAAFF & ENGELMAN, 2007).

Como um componente integral do genoma celular, o provírus passa a utilizar o metabolismo da célula hospedeira para síntese de proteínas virais, replicação de cópias do material genético viral e montagem de novos vírus. Após a montagem, as novas partículas deixam a célula hospedeira pelo processo de brotamento através da membrana celular. Durante este processo o vírus pode também incorporar diferentes proteínas derivadas da membrana plasmática da célula hospedeira em seu envelope, tais como proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II ou proteínas de adesão que podem facilitar sua ligação a outras células-alvo (VANDEGRAAFF & ENGELMAN, 2007; ALCAMÍ, 2008).

1.3 EVOLUÇÃO DA DOENÇA

Após o contágio por HIV e na ausência de TARV a infecção passa por diferentes fases que podem culminar no desenvolvimento da AIDS. Inicialmente ocorre um período de incubação de poucas semanas em que há um grande aumento do título viral frente à lise e consequente diminuição numérica de linfócitos T CD4+. Durante este período, denominado fase aguda, a maior parte das pessoas infectadas apresenta um quadro clínico heterogêneo que pode se assemelhar à gripe. Os sintomas mais frequentes são a febre, *rash* máculo-papular, úlceras orais, linfadenopatia, artralgia, faringite, mal-estar geral, perda de peso, meningite asséptica e mialgia. A fase aguda dura de 7 a 10 dias e raramente se prolonga além de 14 dias. A gravidade e duração dos sintomas tem implicações prognósticas dado que quanto mais prolongados e graves forem os sintomas mais rápida é a progressão da doença (LEVY, 2009).

De uma forma geral, após a fase aguda atinge-se o equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro, ocorrendo um leve aumento na quantidade de células TCD4+. Muitos dos indivíduos infectados podem não apresentar manifestações clínicas durante anos, neste período denominado fase crônica. Mesmo na ausência de TARV, o período de latência clínica pode durar de 8 a 10 anos. Apesar do termo período de latência durante esse tempo ocorre replicação extremamente elevada do vírus e a destruição severa de células TCD4+ (FORD et al., 2009). No final da fase crônica os títulos virais estão novamente elevados e a quantidade de linfócitos TCD4+ muito baixa, podendo aparecer uma série sinais imunológicos e hematológicos, além de

sintomas inespecíficos, como febre, perda de peso, suores noturnos e diarreia. Nesta situação, o nível de 200 células T CD4+/mm³ no sangue revela-se um importante limite, abaixo do qual se considera um quadro de AIDS. Nessa fase existe grande risco de desenvolvimento de doenças oportunistas, entre as quais se encontram várias infecções e certos tipos de câncer, que podem acabar levando o paciente à óbito. No entanto, o curso da infecção pode variar drasticamente sendo determinado por diferentes fatores do hospedeiro (MARSDEN & ZACK, 2009; LANE, 2010).

1.4 INDIVÍDUOS RESISTENTES AO HIV

A partir da infecção inicial pelo HIV à progressão para a AIDS leva um tempo variável. De acordo com esse tempo, os indivíduos infectados com o vírus tem sido classificados como progressores rápidos, progressores típicos, progressores lentos e controladores de elite. Aproximadamente 5% a 15% dos indivíduos assintomáticos são considerados progressores rápidos, pois tem um acentuado declínio no número de células TCD4+, evoluindo para AIDS 2 a 5 anos após o contágio. Para progressores típicos essa transição ocorre geralmente dentro de 8 a 10 anos após a infecção (VERGIS & MELLORS, 2000). Entretanto, cerca de 2% a 5% das pessoas soropositivas mesmo sem o uso de TARV permanecem livres de sintomas provocados pela infecção durante períodos acima de 10 anos, com uma contagem das células TCD4+ acima de 500 células/mm³ e são classificados como progressores lentos. Apesar de apresentarem um lento declínio no número de linfócitos TCD4+ muitos progressores lentos mantém uma baixa, porém detectável, viremia e acabam progredindo para AIDS depois de muito tempo de infecção. Existe um grupo restrito dentre estes indivíduos, menos de 1% dos soropositivos, que apesar de infectado com HIV demonstra capacidade de manter muito baixa a carga viral em seu organismo. São os chamados controladores de elite, indivíduos nos quais os níveis de HIV no plasma se mantém indetectáveis, abaixo de 50 cópias/mL, mesmo na ausência de tratamento por até 25 anos, constituindo uma evidência da capacidade duradoura do controle do vírus (OKULICZ et al, 2009).

Contudo, essa resistência ao HIV não é observada apenas em indivíduos infectados. Existe uma porcentagem da população que mesmo frente à constante exposição ao HIV não se infecta, o que sugere a existência de mecanismos capazes de impedir a entrada do vírus em seus organismos (PIACENTINI et al., 2008), são os chamados

indivíduos expostos e não soroconvertidos (ENS). O primeiro relato de indivíduos ENS é de 1989, no qual Ranki e colaboradores (1989) identificaram linfócitos T HIV-específicos em indivíduos soronegativos que eram parceiros de indivíduos sabidamente HIV-positivos (RANKI et al, 1989). Uma série de outros estudos confirmou esta observação inicial (CLERICI et al, 1991; CLERICI et al, 1992; CLERICI et al, 1993), indicando que possivelmente ocorrera contato sexual desprotegido que não culminou em infecção. Atualmente indivíduos repetidamente expostos ao HIV e não infectados foram documentados em diversas populações, incluindo parceiros homossexuais e heterossexuais de pacientes soropositivos (SHACKLETT et al, 2002; SUY et al, 2007), profissionais do sexo (BALTZER et al, 2009) e bebês saudáveis nascidos de mães HIV positivas (FARQUHAR et al, 2008).

A existência de indivíduos com estas características sugere a existência de mecanismos de resistência naturais ao HIV e o estudo destas coortes pode colaborar na compreensão destes mecanismos. No entanto, ao avaliar determinados grupos de ENS, como profissionais do sexo, é muitas vezes difícil determinar o grau de exposição ao vírus e correlacioná-lo com possíveis fatores antivirais. Porém tal avaliação é possível em estudos com casais sorodiscordantes. O termo sorodiscordante é utilizado para designar casais heterossexuais ou homossexuais nos quais um dos parceiros é portador de HIV/AIDS e o outro não. Muitas vezes estes casais não adotam todas as práticas recomendadas quanto ao sexo seguro, exercendo um comportamento de alto risco de exposição ao HIV (REIS & GIR, 2005). Nesta situação os parceiros saudáveis são considerados ENS, sendo possível correlacionar aspectos de sua biologia, com as informações referentes aos seus parceiros(as) HIV positivos, os quais atuam como fonte de exposição. Aspectos da infecção do parceiro HIV positivo, tais como estágio da doença, carga e subtipo viral podem influenciar na condição de resistência à infecção por parte do parceiro saudável (HASSELROT^b et al, 2010).

Dentre os estudos realizados com casais sorodiscordantes a primeira abordagem utilizada foi relacionar a resistência ao HIV com a presença de linfócitos T HIV-específicos e a secreção de citocinas (PIACENTINI et al, 2008). Neste âmbito foram avaliadas diferentes coortes nos Estados Unidos (JOHN et al, 2004), Canadá (BERNARD et al, 1999), Itália (LO CAPUTO, 2003), Inglaterra (EYESON et al, 2003), Tailândia (PROMADEJ et al, 2003), Uganda (KEBBA et al, 2004) e Índia (PALLIKKUTH et al, 2007). Estes estudos sugeriram

que uma maior produção de interleucina 2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), bem como a presença de linfócitos T citotóxicos específicos, poderiam conferir um efeito protetor nestes indivíduos (PIACENTINI et al, 2008).

No Brasil foram realizados poucos estudos com coortes de casais sorodiscordantes para HIV. Melo e colaboradores (2008) estudaram uma coorte de casais heterossexuais com sorologia discordante na cidade de Porto Alegre (RS), indicando TARV como fator protetor na prevenção da transmissão do vírus entre os parceiros. REICHE e colaboradores (2006 e 2008) avaliaram presença dos alelos CCR5- Δ 32 e SDF1-3'A em indivíduos saudáveis, indivíduos HIV positivos e indivíduos ENS (dentro os quais casais sorodiscordantes) residentes no estado do Paraná. O alelo CCR5- Δ 32 é encontrado no gene que codifica o receptor de quimiocina CCR5 e o alelo SDF1-3'A encontrado no gene que codifica a quimiocina ligante do receptor de quimiocina CXCR4. As moléculas CCR5 e CXCR4 são utilizadas pelo HIV como correceptores para sua adsorção na célula hospedeira e a presença dos alelos CCR5- Δ 32 e SDF1-3'A esta relacionada à resistência ao HIV. Apesar da maior frequência do alelo SDF1-3'A ter sido observada entre os ENS, essa diferença não foi estatisticamente significativa em comparação com os demais grupos (REICHE et al, 2006), enquanto que o alelo CCR5- Δ 32 foi encontrado em homozigose em apenas um, dentre os 145 indivíduos ENS avaliados, não estando presente nos demais grupos (REICHE et al, 2008).

A presença do alelo CCR5 Δ 32, que contém uma deleção de 32 nucleotídeos no gene que codifica o receptor de quimiocina 5 (CXCR5), é atualmente o fator protetor considerado mais relevante na infecção por HIV. A presença deste alelo codifica para uma proteína CCR5 mal formada, incapaz de chegar até a superfície celular (SAMSON et al, 1996). Indivíduos homozigotos para o alelo CCR5- Δ 32 possuem resistência à infecção por HIV-1. Esta proteção é parcial em heterozigotos e quando indivíduos com esse genótipo são infectados pelo HIV ocorre atraso significativo no aparecimento da AIDS (O'BRIEN & MOORE, 2000). Entretanto, como demonstrado por diferentes grupos de pesquisa (LIU et al, 2004; ZAPATA et al, 2006; HASSELROT et al, 2010; TABORDA et al, 2012) a presença do alelo CCR5- Δ 32 em muitos casos não é suficiente para explicar a resistência de determinados indivíduos ao HIV e outros fatores podem estar envolvidos nesse fenômeno.

1.5 FATORES ASSOCIADOS COM RESISTÊNCIA À INFECÇÃO PELO HIV

Observa-se que entre os indivíduos infectados com HIV existem diferentes padrões de progressão da doença, assim como existem indivíduos que se expõem repetidamente ao vírus e não se infectam. Essa variabilidade de comportamento sugere que existem mecanismos de resistência naturais contra a infecção, os quais podem variar entre diferentes indivíduos. Apesar de ainda não existir uma explicação clara para esta baixa suscetibilidade, uma série de prováveis “fatores protetores” tem sido reportados, dentre os quais se encontram fatores genéticos, humorais, celulares, componentes da imunidade inata ou exposição a vírus com baixa capacidade infectiva (PIACENTINI et al., 2008; MIYAZAWA et al., 2009; TOMESCU et al., 2011).

A exposição a baixas cargas virais ou vírus defectivos poderia explicar os casos de resistência e/ou controle da infecção por HIV. Quanto menor a carga viral de um soropositivo, menor sua capacidade de transmitir a doença, principalmente por contato sexual. Um estudo realizado em Uganda acompanhou 415 casais sorodiscordantes por 30 meses. Nesse período 90 parceiros inicialmente soronegativos foram infectados e todos os parceiros soropositivos envolvidos nos eventos de soroconversão apresentavam carga viral acima das 1.500 cópias/mL. (QUINN et al, 2000). Entretanto, é importante ressaltar que a carga viral presente no sangue nem sempre pode ser correlacionada com a carga viral em outros fluídos corporais (KALICHMAN et al., 2008). Ademais, estudos demonstram evidências de que indivíduos de sorologia negativa para HIV que se relacionam com pacientes soropositivos desenvolvem respostas contra o vírus, como células T HIV-específicas (RANKI, 1989) ou anticorpos IgA HIV-específicos (KAUL et al, 1999), e alguns fatores relacionados à resistência ao HIV, como a homozigose para o alelo CCR5 Δ 32, tem sido recorrentemente encontrados em coortes de indivíduos constantemente expostos ao HIV e não soroconvertidos. Assim, evidencia-se que os indivíduos classificados como ENS podem contar com mecanismos biológicos capazes de limitar o HIV.

Além da presença do alelo CCR5 Δ 32, outros genes relacionados à resistência ao HIV estão envolvidos em diferentes momentos da infecção, desde a penetração pelas barreiras orgânicas, passando pela ligação às células alvo, integração ao genoma hospedeiro e finalmente a expressão de genes virais (MIYAZAW et al., 2009). O alelo polimórfico SDF1-3'A tem sido avaliado como possivelmente capaz de conferir resistência ao HIV. Trata-se de uma substituição G-por-A em uma

sequência conservada da região não traduzida (UTR) 3' do gene que codifica para o fator derivado de célula estromal 1 (SDF1/CXCL12), um ligante natural do receptor de quimiocinas CXCR4, outra molécula que funciona como correceptor na penetração celular pelo vírus HIV (SORIANO et al. 2002). Acredita-se que a presença do alelo SDF1-3'A em homozigose regula positivamente a produção de SDF1, que por sua vez é capaz de se ligar ao receptor CXCR4 e também regular negativamente sua expressão. Dessa forma a entrada do vírus nas células alvo seria inibida tanto por competição direta, quanto pela diminuição destes receptores nas superfícies celulares (WINKLER et al. 1998). Assim como observado para SDF1, o aumento da produção de CCL3L1 também pode inibir a replicação viral (MOORE & KLASSE, 2007). A molécula CCL3L1 é um ligante natural do receptor de quimiocinas CCR5, utilizado pelo HIV como correceptor para sua entrada na célula. Trabalhos demonstram que um maior número de cópias do gene que codifica para a proteína CCL3L1 está fortemente associado a uma maior proteção à infecção por HIV (MACKAY, 2005), tanto em estudos realizados com mães soropositivas na transmissão vertical do vírus (PILOTTI et al, 2007), quanto em estudo comparativo entre indivíduos ENS, pacientes controladores de elite e voluntários saudáveis (KUHN et al, 2007).

Alguns dos genes mais influentes na composição do sistema imune do organismo são os que integram o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), uma vez que são responsáveis pela ligação e apresentação de epítomos antigênicos. Para as moléculas MHC humanas, conhecidas como antígeno leucocitário humano (HLA), são definidos grupos funcionais conhecidos como “supertipos”, baseados em critérios como estrutura, motivo de ligação a peptídeos e apresentação de epítomos similares (CASTELLINO et al., 1997; MAFFEI et al., 1997). O supertipo HLA A2/6802 composto por *A*0202*, *A*0205*, *A*0214*, e *A*6802* tem demonstrado significativa associação com resistência a infecção ao HIV em um estudo conduzido com habitantes de Nairóbi (Quênia), tanto em uma coorte de profissionais do sexo, quanto em recém-nascidos de mães HIV positivas (CARRINGTON & O'BRIEN, 2003). Também no Quênia, Hardie e colaboradores (2008) encontraram uma associação de resistência ao HIV com alelo HLA-DQB1. Além disso, o alelo HLA-B57 está associado com respostas particularmente eficazes de linfócitos citotóxicos e uma redução da carga viral nos indivíduos infectados (MIYAZAW et al. 2009). Esses estudos indicam que as moléculas HLA podem estar

envolvidas na resistência à transmissão do HIV, e permitem inferir um possível papel para a resposta imune celular nessa resistência (CARRINGTON & O'BRIEN, 2003).

Diversas proteínas também tem sido apontadas como envolvidas nos mecanismos de proteção ao HIV, como nos casos de Murr-1 (COMMD1), TRIM5 α e APOBEC3G (GANESH et al. 2003; PIACENTINI, et al. 2008; MIYAZAW et al. 2009), proteínas com ação celular capazes de interagir com o vírus. A proteína Murr1 é detectada em células T CD4+ primárias não ativadas sendo capaz de interferir com a ativação do fator de transcrição kappa β - (NF κ β). O genoma do HIV tem múltiplos locais de ligação para o NF κ β , e essa interação induz a expressão de proteínas e posterior replicação viral. Sendo assim, a ação inibitória de Murr1 sob NF κ β pode inibir a replicação do HIV (GANESH et al. 2003). A proteína TRIM5 α tem um domínio com atividade semelhante a E3 ubiquitina ligase e é capaz de interferir no ciclo da infecção do HIV ligando-se ao capsídeo viral levando à sua desmontagem prematura (NAKAYAMA & SHIODA, 2010). Por fim, a proteína APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*) pertence a uma família de enzimas intracelulares que atuam na fase de encapsulamento de novas partículas virais. APOBEC3G é capaz de desaminar especificamente a citosina em uracila no RNA viral, assim resultando num acúmulo de mutações que levam à incapacidade de replicação das partículas virais formadas a partir deste RNA (STREBEL et al. 2009). Entretanto, em estudo recente Mous e colaboradores (2012) não observaram expressão aumentada de TRIM5 α e APOBEC3G em coorte senegalesa de indivíduos ENS.

Apesar da evidência de fatores genéticos e intracelulares envolvidos nos mecanismos de resistência, o HIV tem sido classificado como um vírus bastante sensível a substâncias presentes nos fluidos do hospedeiro. Há duas décadas encontraram-se as primeiras evidências de que fatores solúveis poderiam estar envolvidos na supressão do HIV quando experimentos *in vitro* demonstraram que moléculas secretadas por linfócitos TCD8+ estariam envolvidas na diminuição da replicação viral em cultura (DEVICO & GALLO, 2004). Recentemente vários fatores presentes no plasma, saliva e secreção cervicovaginal tem sido identificados em estudos clínicos e *in vitro* como possíveis responsáveis pela resistência ao vírus (TOMESCU et al., 2011).

Entre os fatores solúveis que possivelmente estariam envolvidos com a resistência ao HIV destacam-se as β -quimiocinas, como a quimiocina Regulada sob Ativação e Normalmente Expressada e

Secretada por células T (RANTES/CCL5), a proteína inflamatória de macrófago alfa (MIP1- α /CCL3) e a proteína inflamatória de macrófago beta (MIP1- β /CCL4). Essas moléculas são ligantes naturais do receptor CCR5 utilizado pelo HIV para a infecção celular e o mecanismo pelo qual se acredita que inibam a infecção viral é através de bloqueio competitivo: ao ocupar os sítios de ligação destes receptores, impedem sua interação com o HIV, inibindo a entrada do vírus na célula. Além disso, o aumento da concentração sérica dos ligantes naturais de CCR5 induz a regulação negativa de sua expressão (KALINKOVICH et al, 1999).

RANTES, MIP1- α e MIP1- β são β -quimiocinas produzidas tanto por células da imunidade inata, como adquirida, tais como macrófagos, células dendríticas, células NK, células T $\square\square$, e linfócitos T CD8⁺. A principal função biológica destas quimiocinas é sua atividade quimiotática sobre linfócitos, mastócitos, eosinófilos e monócitos. Adicionalmente, estimulam a diapedese, a liberação de elastases por neutrófilos de ribonucleases por eosinófilos e de histamina por basófilos, além de induzirem a polimerização de actina, incrementar o cálcio intracelular e a atividade citotóxica das células NK (ROLLINS, 1997). Trabalhos que comparam a concentração de RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β secretadas por células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e linfócitos TCD8⁺ *in vitro* com a situação clínica de seus doadores indicam que altos níveis de MIP-1 α e MIP-1 β estão relacionadas com prognósticos mais favoráveis (DEVICO & GALLO, 2004). Além disso, estudos em adultos e crianças HIV-positivos sugerem que o aumento no nível destas três β -quimiocinas retarda a progressão da doença (COCCHI et al, 2000, WASIK et al, 2000). Outros estudos também sugerem que indivíduos ENS expressam uma concentração maior destas β -quimiocinas em comparação à indivíduos não expostos ao HIV (SHIEH et al, 2001; JOHN et al., 2004; IQBAL et al, 2005; HIRBOD, et al 2006).

Além dos ligantes naturais dos receptores utilizados pelo HIV, outras quimiocinas podem estar relacionadas com a resistência à infecção pelo vírus, como eotaxina-1 (CCL11) (HASSELROT^b et al., 2010; PROMADEJ-LANIER et al., 2010) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1/ CCL2) (DESHMANE et al., 2009). A eotaxina-1 é um potente quimioatratador para eosinófilos, basófilos, mastócitos e células Th2 e está relacionada com a resistência de símios à infecção por SHIV, um vírus quimérico que combina os genomas de HIV e SIV (PROMADEJ-LANIER et al, 2010). MCP-1 é um forte quimioatratador

para monócitos e células TCD4+, produzido por monócitos/macrófagos, células dendríticas, astrócitos, células endoteliais e fibroblastos, sendo monócitos/macrófagos a principal fonte da molécula no sangue periférico. MCP-1 está envolvido na regulação da migração e infiltração de monócitos, linfócitos TCD4+ de memória e células NK (ANSARI et al, 2011), devido a esse papel poderia contribuir com a disseminação do vírus pelo organismo e diferentes estudos tem correlacionado níveis elevados de MCP-1 com aumento da viremia em indivíduos soropositivos (VICENZI et al, 2000; ANSARI et al, 2007; MUKURA et al, 2012). Entretanto, alguns estudos indicam que uma quantidade elevada de MCP-1 poderia inibir a ligação do HIV à molécula CCR5 (DESHMANE et al., 2009). Além disso, Hasselrot^b e colaboradores (2010) encontraram níveis significativamente altos de ambas quimiocinas na saliva de homens soronegativos que mantinham relações de sexo oral com parceiros soropositivos, indicando que essas moléculas podem ter um papel protetivo importante nas mucosas.

Algumas das proteínas solúveis com potencial antiviral mais estudadas nos últimos anos são as defensinas. De maneira geral são classificadas como defensinas peptídeos catiônicos e anfipáticos, de tamanho reduzido (18 a 42 aminoácidos e de 3 a 5 kDa) com atividade contra um amplo grupo de patógenos, incluindo bactérias, protozoários, fungos e vírus (YANG et al., 2002). As defensinas são produzidas principalmente por células epiteliais e células do sistema imune, tanto de forma constitutiva, quanto em resposta a infecções. As defensinas presentes em mamíferos são classificadas em α , β e θ , entretanto apenas α e β são expressas na espécie humana. Ambas têm ação anti-HIV, com mecanismos de ação variáveis (KLOTMAN & CHANG, 2006).

Estudos demonstram que as α -defensinas 1 (HNP-1) e β -defensinas 2 (HBD-2) são capazes de bloquear a replicação viral após a formação do cDNA, sendo ambas capazes de regular negativamente a expressão de CXCR4 e inativar diferentes cepas de HIV (SEIDEL et al. 2010). HNP-1 é capaz ainda de interferir com a importação nuclear e transcrição do vírus (CHANG et al. 2005), além de induzir a expressão das citocinas MIP-1 α e MIP-1 β , ligantes naturais do correceptor CCR5, em macrófagos (GUO et al.,2004). Em estudo de uma coorte de mulheres ENS, Trabattoni e colaboradores (2004) encontraram expressão de α -defensinas 1-3 em linfócitos TCD8+ periféricos e de mucosa dez vezes maior do que a encontrada em indivíduos controle não expostos ao HIV, sugerindo um importante papel das α -defensinas na resistência ao vírus (TRABATTONI et al., 2004).

Experimentos *in vitro* demonstraram que moléculas recombinantes de β -defensina HBD-2 e HBD-3 são capazes de se unir diretamente ao vírus e inibir sua replicação sem efeito citotóxico visível. Ademais, HBD-3 também é capaz de modular negativamente a expressão do receptor CXCR4 (FENG et al, 2006). Somado a isso, a presença de HBD-2 e 3 em dose similar à encontrada na mucosa oral de indivíduos saudáveis foi capaz de inibir a infecção por HIV em PBMC (SUN et al., 2005). Zapata e colaboradores (2008) encontraram uma associação entre HBD-2 e 3 e resistência ao HIV ao estudarem uma coorte de indivíduos ENS que apresentaram expressão oral significativamente maior destas defensinas em comparação à indivíduos não expostos ao vírus (ZAPATA et al. 2008).

Além de alterações moleculares pontuais no organismo, hábitos de vida tais como prática de exercícios, consumo de álcool, tabagismo, utilização de drogas ilícitas, excesso de estresse, depressão e a maneira que o indivíduo aceita a doença podem influenciar a progressão da infecção pelo HIV (ULLA & REMOR, 2002; CARVALHO et al., 2007; GORE-FELTON & KOOPMAN, 2008). Assim, vários fatores biológicos, psicológicos e comportamentais podem estar envolvidos na infecção por HIV e, portanto, podem influenciar na resistência ao vírus. Apesar dos diversos trabalhos realizados com coortes ENS a condição de resistência à infecção presente nessas pessoas segue como uma grande oportunidade para estudo da dinâmica viral, bem como da interação do HIV com seu hospedeiro, principalmente no caso de casais sorodiscordantes. Frente à diversificada gama de aspectos envolvidos nesses mecanismos, estudos que avaliem e correlacionem um maior número de fatores que possam estar influenciando na manutenção da condição soronegativa do parceiro ENS são fundamentais, tanto pela busca em esclarecer essa condição de resistência ao vírus, quanto pela possibilidade de indicar novas estratégias antivirais.

2. HIPÓTESE

A resistência natural ao HIV observada em indivíduos que se relacionam com pacientes HIV-positivos e não se infectam é multifatorial e esta associada a aspectos ambientais, comportamentais, virológicos e imunológicos. Sugere-se que esses indivíduos possuam maior expressão de fatores solúveis com potencial antiviral e/ou mantenham padrões de comportamento que podem estar relacionados ao controle da infecção.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar diferentes aspectos possivelmente envolvidos na resistência ao HIV entre indivíduos expostos e não soroconvertidos, indivíduos positivos para HIV (membros de casais sorodiscordantes) e um grupo controle composto por indivíduos não expostos ao vírus.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar as quimiocinas RANTES, MIP1- β , eotaxina-1 e MCP-1 em amostras de plasma e saliva;
- b) Quantificar as defensinas HBD2 e HBD3 em amostras de plasma e saliva;
- c) Avaliar aspectos relacionados a hábitos de vida dos indivíduos estudados;
- d) Identificar fatores que possam conferir resistência à infecção por HIV.

4. METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse trabalho foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 1063/2011. A participação dos indivíduos recrutados para este projeto foi voluntária e ocorreu mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

4.2 LOCAL, POPULAÇÃO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.

Este foi um estudo transversal. Foram recrutados casais hetero ou homossexuais segundo os seguintes critérios de inclusão: em união estável por no mínimo 12 meses, sorodiscordantes para a infecção por HIV e com episódios de relação sexual (anal e/ou vaginal e/ou oral) desprotegida. Os casais foram recrutados junto ao Hospital Nereu Ramos (Florianópolis, SC) e Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes (São José, SC), ambos pertencentes ao Sistema Único de Saúde (SUS), tendo sido feito um cartaz para a divulgação do projeto de pesquisa (Apêndice 2). A soronegatividade para HIV dos parceiros dos pacientes foi comprovada pelo Teste de Ácido Nucléico (NAT), um método de biologia molecular fabricado pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-manguinhos e pelo teste de quimioluminescência Architect® anti-HIV Combo, um método para teste sorológico, ambos realizados pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC, Florianópolis, SC). Todos os casais sorodiscordantes incluídos no estudo foram orientados a adotar o uso de preservativo em suas práticas sexuais. Como grupo controle foram recrutados doadores de plaquetas por aférese, provenientes do HEMOSC. Os voluntários escolhidos para compor o grupo controle também mantinham relacionamento estável por no mínimo 12 meses.

4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os participantes desse estudo foram entrevistados individualmente, pelo Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto ou pela Bióloga Elis A. Rosa, quando responderam a um questionário sócio-comportamentais (Apêndice 3), e em seguida cederam amostras de

sangue e saliva. As informações a respeito de peso e altura foram utilizadas para o cálculo do índice de massa corporal (peso / altura²) e as categorias utilizadas seguiram classificação sugerida para adultos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012). Além disso, os prontuários dos pacientes foram consultados a fim de se obter informações a respeito de carga viral, contagem de linfócitos TCD4+ e esquema terapêutico utilizado. As informações de prontuário coletadas foram referentes à data mais próximas das coletas de material para este estudo.

A produção de saliva foi estimulada aplicando-se uma gota de solução de ácido cítrico 2% na região sublingual e após 30 s o voluntário foi convidado a depositar a saliva em tubo de fundo cônico contendo 5 µL de *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich). Este procedimento foi repetido três vezes com intervalos de 30 s, sendo as amostras mantidas em gelo e posteriormente centrifugadas a 2.800 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante armazenado a -80°C. A condição periodontal dos indivíduos dos casais sorodiscordantes foi avaliada através do teste de Registro Periodontal Simplificado (PSR, do inglês *Periodontal Screening and Recording*), aplicado pela odontologista Ariadne Cristiane Cabral da Cruz. O teste consiste na utilização de sonda periodontal específica e avaliação de dentes índices a fim de indicar a saúde periodontal do paciente. O diagnóstico é realizado através de códigos que variam de 0 a 4, no qual 0 está relacionado à ausência de problemas periodontais e quanto maior a pontuação, mais comprometida a saúde periodontal do paciente (SANTOS et al., 1998).

A coleta de 30 mL de sangue periférico foi realizada por profissionais da saúde habilitados utilizando-se tubos Vacutainer® (BD Bioscience) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. A partir destas amostras de sangue foram separados plasma e as populações de linfócitos TCD4+ e monócitos através, respectivamente, dos kits *RosetteSep*TM coquetel de enriquecimento de células TCD4+ humanas e *RosetteSep*TM coquetel de enriquecimento de monócitos humanos (SciencePro). O sangue foi incubado por 20 min com o reagente do kit *RosetteSep*TM apropriado para cada tipo celular. Essa mistura foi diluída duas vezes em PBS acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) sendo então submetida a um gradiente de densidade com Ficoll-PaqueTM (SciencePro) por centrifugação a 300 x g por 20 min a 25°C. Plasma e células foram recolhidos e armazenados a -80°C, sendo as células armazenadas para análises futuras.

4.4 DOSAGEM DE DEFENSINAS NO PLASMA E SALIVA

As defensinas HDB-2 e HBD-3 presentes na saliva e no plasma foram quantificadas através da técnica de Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizando-se kits comerciais (PeproTech). A reação foi realizada em microplacas de poliestireno de alta afinidade com 96 poços (BD Bioscience) sensibilizadas com 5 µg de anticorpos anti-HBD2 ou anti-HBD3 por cavidade à temperatura ambiente durante 16 h. Todas as demais etapas foram realizadas nessa mesma temperatura. O bloqueio dos sítios livres foi feito com tampão fosfato-salino (PBS - NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 1,7 mM, Na₂HPO₄ 9,1 mM, pH 7,4) acrescido de 1% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) por 1 h, para então realizar-se a incubação das amostras. Amostras de saliva diluída cinco vezes e plasma diluído duas vezes, ambos diluídos em PBS acrescido de 0,01% de BSA (Sigma), foram incubados por 2 h para posterior adição de 2,5 µg/poço de anticorpos anti-HBD-2 ou anti-HBD-3 conjugados com biotina, também por 2 h. Em seguida adicionou-se 1 µg/poço de avidina conjugada com peroxidase (HRP) (Sigma) por 30 min seguido da adição de substrato enzimático composto de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiozolino)-6-sulfônico (ABTS) (Sigma) diluído em tampão citrato pH 4,0 (ácido cítrico 0,05 M) acrescido de 0,01% de H₂O₂, sendo a leitura realizada após 10 min no equipamento Infinite M200 (Tecan) a 450nm. Foram realizadas lavações com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (Sigma) entre todas as etapas. Como controle negativo utilizou-se PBS acrescido de 0,1% de BSA e como controle positivo HBD2 e HBD3 recombinantes (PeproTech) utilizadas em concentrações conhecidas para definição da curva padrão.

4.5 DOSAGEM DE QUIMIOCINAS NO PLASMA E SALIVA

As quimiocinas RANTES, MIP1- α , MIP1- β , eotaxina-1 e MCP-1 presentes na saliva e no plasma foram quantificadas através da técnica de Matriz Citométrica de Microesferas (CBA, do inglês *Cytometric Bead Array*) (BD Bioscience), segundo protocolo indicado pelo fabricante. A reação foi realizada em placa de poliestireno de 96 poços com fundo em “u” (BD Bioscience) com utilização de microesferas recobertas com anticorpos específicos para as quimiocinas a serem dosadas.

As microesferas foram agitadas vigorosamente, centrifugadas em *wash buffer* durante 5 min a 200 x g à temperatura ambiente e então

suspensas em *capture bead diluent*. Todas as demais etapas foram realizadas nessa mesma temperatura. Após agitação durante 5 min a 500 rpm, as microesferas foram incubadas por 1 h com as amostras de saliva pura ou plasma diluído duas vezes em PBS acrescido de 2% de SFB. Foram então adicionados anticorpos secundários específicos para as quimiocinas a serem dosadas conjugados com ficoeritrina (PE), sendo a placa novamente agitada por 5 min a 500 rpm, com subsequente incubação por 2 h protegida da luz. Depois desse período as amostras foram centrifugadas a 200 x *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se *wash buffer* e foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições. Em seguida as microesferas foram suspensas em *wash buffer* e acondicionadas em tubos de citometria (BD Bioscience). Como controle positivo e para a definição da curva padrão foram utilizadas concentrações conhecidas de RANTES, MIP1- α , MIP1- β , eotaxina-1 e MCP-1 recombinantes previamente diluídos em *assay diluent*, o qual foi também utilizado como controle negativo da reação.

A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Bioscience) por meio do programa FACS DIVA (BD Bioscience), sendo que os dados foram analisados através do programa FlowJo (Tree Star) versão 8.6.3, a fim de se obter o valor de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para cada amostra.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente foram realizados os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene* a fim de verificar respectivamente, normalidade e homocedasticidade dos valores encontrados nas dosagens das diferentes moléculas para os grupos controle, parceiros HIV positivos e parceiros ENS. No caso de indivíduos que possuíam concentração de determinada molécula abaixo da sensibilidade dos métodos aplicados repetiu-se o valor da menor concentração encontrada para tal molécula. Uma vez respeitadas tais condições (valores de $p > 0,05$ para ambos os testes), aplicou-se uma Análise de Variância (ANOVA) “*one-way*”, com o intuito de inferir se os valores médios dessas dosagens foram significativamente diferentes entre esses três grupos. Sendo o teste de ANOVA significativo (valores de $F > 1$ e $p < 0,05$), realizou-se uma análise *a posteriori* por meio do teste de *Dunnet*, elucidando se os valores encontrados diferiam dos valores observados no grupo controle. A fim de verificar se existia correlação entre a quantidade de quimiocinas e defensinas no plasma e na saliva nos indivíduos do mesmo grupo realizou-se um teste de correlação linear simples (correlação de *Pearson*). Nos casos em que não foi

possível observar homocedasticidade ou normalidade dos dados aplicou-se os testes equivalentes para dados não paramétricos: *Kruskal–Wallis* na comparação das médias entre os grupos com o teste de *Dunn’s* como análise *a posteriori* e correlação de postos de *Spearman*. As análises estatísticas e confecção dos gráficos foram realizadas com auxílio dos programas *Statistica 7.0* (StatSoft®) e *GraphPad 5.01* (Prism®).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

O recrutamento de voluntários e coleta de amostras ocorreu de junho a dezembro de 2011. Foi aplicado um questionário composto de questões abertas e fechadas (Apêndice 3) a fim de se obter informações socioeconômicas e hábitos de vida dos indivíduos participantes deste estudo. Essas informações foram analisadas qualitativamente por análise de frequência. Trinta pessoas responderam ao questionário, sendo doze do grupo controle, nove parceiros soronegativos e nove parceiros ENS. Um dos voluntários do grupo controle não respondeu todas as questões.

O grupo controle foi composto por seis homens (50%) e seis mulheres (50%), doadores de plaqueta por aférese, com idade média de $35,9 \pm 12,6$ anos, todos declaradamente heterossexuais, dos quais sete (58,4%) possuíam o ensino médio completo e cinco (41,7%) curso superior completo. De acordo com o Índice de Massa Corporal dois (16,7%) indivíduos foram classificados com obesidade tipo I, quatro (33,4%) com sobrepeso e os 6 demais (50%) com peso normal. Com exceção de um indivíduo (9,1%) que atuava como prestador de serviço autônomo, os demais voluntários (90,9%) possuíam emprego fixo, sendo a renda familiar média deste grupo de $7,3 \pm 4,9$ salários mínimos.

O grupo experimental foi composto por 9 casais sorodiscordantes, sendo 8 heterossexuais (88,9%) e 1 casal homossexual masculino (11,2%). Dentre os parceiros soropositivos a idade média foi de $41,7 \pm 9,2$ anos, sendo este grupo composto por 4 mulheres (44,5%) e 5 homens (55,6%). De acordo com o valor de IMC um (11,2%) dos indivíduos estava com obesidade do tipo I, outro (11,2%) com sobrepeso e os 7 demais (77,8%) possuíam peso normal. Quanto à escolaridade, 2 indivíduos (22,4%) possuíam nível fundamental enquanto que os 7 demais (77,8%) possuíam nível médio. No momento da entrevista 2 (22,4%) parceiros HIV positivo se encontravam com empregos fixos, 2 (22,4%) eram prestadores de serviço autônomos, 2 (22,4%) aposentados e 3 (33,4%) encontravam-se sem ocupação. Os parceiros ENS tinham idade média de $38,6 \pm 9,0$ anos, sendo 5 homens (55,6%) e 4 mulheres (44,5%). De acordo com o IMC um dos indivíduos (11,2%) estava abaixo do peso, três (33,4%) estavam com sobrepeso e os demais (55,6%) possuíam peso normal. Com relação à escolaridade, um parceiro HIV negativo (11,2%) possuía nível superior, quatro (44,5%) possuíam nível médio e quatro (44,5%) nível fundamental. Cinco (55,6%) parceiros tinham situação profissional

estável, com emprego fixo, enquanto 3 (33,4%) eram aposentados e 1 se encontrava sem ocupação. A renda familiar média dos casais foi de $3,8 \pm 2,3$ salários mínimos.

Somente entre os casais sorodiscordantes houve transfusões sanguíneas, tabagistas e usuários de drogas ilícitas. Indivíduos com tatuagem foram observados nos três grupos, com maior ocorrência entre os parceiros soropositivos, grupo no qual 4 indivíduos (44,5%) possuíam tatuagem. Entre os três grupos foi relatada insuficiência de sono, sendo que pelo menos 45% dos indivíduos de cada grupo relataram dormir menos do que consideravam necessário. Voluntários dos grupos controle, parceiros soropositivos e parceiros ENS consumiam alimentos fritos, além de verduras, frutas e legumes, com frequência similar, uma vez que mais de 45% dos indivíduos de cada um dos grupos consumiam esses alimentos semanalmente. Entretanto, enquanto no grupo controle 9 indivíduos (81,8%) entrevistados relataram consumir cereais regularmente, 4 indivíduos (44,5%) tanto dos parceiros soropositivos, quanto dos parceiros ENS não consumiam esse tipo de alimento. Entre os voluntários do grupo controle e os parceiros ENS respectivamente 45,4% e 55,6% dos indivíduos praticavam atividade física semanalmente, frequência maiores do que a observada para os parceiros soropositivos. O consumo de carne vermelha e tabagismo foi maior entre os indivíduos dos casais sorodiscordantes (Tabela 1).

Tabela 1: Características socioeconômicas, hábitos alimentares e de saúde dos indivíduos incluídos neste estudo.

	Grupo controle n (%)	Parceiros HIV+ n (%)	Parceiros HIV- n (%)
Sexo			
Masculino	6 (50%)	5 (55,6%)	5 (55,6%)
Feminino	6 (50%)	4 (44,5%)	4 (44,5%)
Idade ± DP (anos)	35,9 ± 12,6	41,7±9,2	38,7± 9,0
IMC			
Abaixo do peso	0 (0%)	0 (0%)	1 (11,2%)
Peso normal	6 (50%)	7 (77,8%)	5 (55,6%)
Sobrepeso	4 (33,4%)	1 (11,2%)	3 (33,4%)
Obesidade tipo I	2 (16,7%)	1 (11,2%)	0 (0%)
Escolaridade			
Ensino fundamental	0 (0%)	2 (22,4%)	4 (44,5%)
Ensino médio	7 (58,4%)	7 (77,8%)	4 (44,5%)
Ensino superior	5 (41,7%)	0 (0%)	1 (11,2%)
Renda familiar média ± DP (n°. salários mínimos)	7,2 ± 4,9	4,0 ± 2,4	3,6 ± 2,0
Prática de atividade física			
Regularmente (semanal)	5 (45,4%)	3 (33,4%)	5 (55,6%)
Raramente	2 (18,1%)	0 (0%)	0 (0%)
Não pratica	4 (36,3%)	6 (66,7%)	4 (44,5%)
Dormem menos do que consideram necessário	5 (45,4%)	5 (55,6%)	6 (66,7%)
Consumo de verduras, frutas e legumes			
Regularmente (semanal)	11 (100%)	7 (77,8%)	6 (66,7%)
Raramente	0 (0%)	2 (22,3%)	3 (33,4%)
Não consome	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Consumo de cereais			
Regularmente (semanal)	9 (81,8%)	0 (0%)	3 (33,4%)
Raramente	2 (18,1%)	5 (55,6%)	2 (22,3%)
Não consome	0 (0%)	4 (44,5%)	4 (44,5%)
Consumo de carne vermelha			
Regularmente (semanal)	8 (72,7%)	8 (88,9%)	9 (100%)
Raramente	3 (27,3%)	0 (0%)	0 (0%)
Não consome	0 (0%)	1 (11,1%)	0 (0%)
Consumo de alimentos fritos			
Regularmente (semanal)	5 (45,4%)	6 (66,7%)	7 (77,8%)
Raramente	5 (45,4%)	3 (33,4%)	2 (22,3%)
Não consome	1 (9,1%)	0 (0%)	0 (0%)
Consumo de bebida alcoólicas			
Regularmente (semanal)	1 (9,1%)	1 (11,2%)	2 (22,3%)
Raramente	6 (54,5%)	4 (44,5%)	3 (33,4%)
Não consome	4 (36,4%)	4 (44,5%)	4 (44,5%)
Transusão sanguínea	0 (0%)	2 (22,3%)	1 (11,2%)
Possui tatuagem	3 (25,0%)	4 (44,5%)	1 (11,2%)
Tabagistas	0 (0%)	3 (33,4%)	4 (44,5%)
Uso de drogas de uso recreativo	0 (0%)	4 (44,5%)	2 (22,3%)

DP = Desvio padrão; IMC = índice de massa corporal

Outro aspecto de saúde avaliado foi a condição periodontal dos casais sorodiscordantes. A fim de excluir a possibilidade de que variações na concentração das moléculas estudadas na saliva estivessem ligadas a doenças periodontais, aplicou-se o teste PSR a 8 dos 9 casais sorodiscordantes estudados. Dentre os indivíduos avaliados 15 possuíam boa saúde periodontal (escore 0). Um dos parceiros ENS se encontrava com gengivite (escore 2). Além disso, um dos casais encontrava-se em tratamento para doenças periodontais no momento da coleta, apesar de seus testes indicarem escore 0.

O contato sexual desprotegido é uma das principais formas de transmissão do HIV. Sendo assim, aspectos da vida conjugal, bem como hábitos sexuais dos casais sorodiscordantes podem estar relacionados com o grau de exposição do indivíduo soronegativo ao HIV. A tabela 2 mostra dados relacionados a esses aspectos, sendo possível observar que os indivíduos dos casais sorodiscordantes não utilizam preservativo durante sexo oral e que apenas 2 (11,2%) deles sempre utilizaram preservativo para penetração vaginal ou anal. A ocorrência de sexo desprotegido foi relevante dentre os indivíduos do grupo controle, no qual 7 (58,4%) dos indivíduos não utilizava preservativo durante sexo oral, 5 (41,7%) não utilizava preservativo para penetração vaginal e entre os que afirmaram praticar sexo anal nenhum indivíduo utilizava preservativo.

Dentre os casais sorodiscordantes a prática de sexo com penetração anal foi mais recorrente. No grupo controle apenas 3 (25,0%) dos indivíduos realizava essa prática, enquanto entre os casais sorodiscordantes 16 (78,0%) dos indivíduos eram praticantes de sexo anal. No grupo controle 5 (41,7%) dos indivíduos encontravam-se em relacionamentos com menos de 2 anos de duração, e a mesma porcentagem de indivíduos encontravam-se em relacionamentos com mais de 10 anos, enquanto que entre os casais sorodiscordantes o tempo de relacionamento foi mais variável, com a maioria de 8 (44,5%) dos indivíduos em relacionamentos com mais de 10 anos (Tabela 2).

Tabela 2: Tempo de união do casal e uso de preservativo durante práticas sexuais dos indivíduos incluídos neste estudo.

	Grupo controle n (%)	Casais sorodiscordantes n (%)
Tempo de união		
Menos de 2 anos	5 (41,7%)	2 (11,2%)
De 2 a 5 anos	2 (16,7%)	4 (22,3%)
De 5 a 10 anos	0 (0%)	4 (22,3%)
Mais de 10 anos	5 (41,7%)	8 (44,5%)
Prática de sexo oral		
Uso esporádico do preservativo	2 (16,7%)	0 (0%)
Sem uso de preservativo	7 (58,4%)	16 (88,9%)
Não pratica	3 (25,0%)	2 (11,2%)
Prática de sexo com penetração vaginal		
Sempre com uso de preservativo	2 (16,7%)	2 (11,2%)
Uso esporádico do preservativo	5 (41,7%)	6 (33,4%)
Sem uso de preservativo	0 (0%)	2 (11,2%)
Não pratica		
Prática de sexo com penetração anal		
Sempre com uso de preservativo	0 (0%)	2 (11,2%)
Uso esporádico do preservativo	0 (0%)	6 (33,4%)
Sem uso de preservativo	3 (25,0%)	6 (33,4%)
Não pratica	9 (75,0%)	4 (22,3%)

Além dos hábitos sexuais, aspectos da infecção do parceiro HIV positivo pode influenciar o grau de exposição do parceiro ENS. Assim, foram também coletadas informações clínicas do parceiro soropositivo, que podem ser observadas na tabela 3. Todos os parceiros soropositivos possuíam cargas virais indetectáveis e sete recebiam TARV. A média de tempo de diagnóstico foi $9,2 \pm 4,9$ anos e a contagem média de linfócitos T CD4+ foi $519,3 \pm 287,5$ células/mm³ (Tabela 3).

Tabela 3: Características clínicas dos indivíduos soropositivos dos casais sorodiscordantes.

Média de tempo de diagnóstico \pm DP (anos)	9,2 \pm 4,9
Uso de antirretroviral no momento da coleta	
Sim	77,7% (8)
Não	22,3% (1)
Carga viral indetectável	100% (9)
Média de contagem de linfócitos T CD4+ (cels/mm ³) \pm DP	519,3 \pm 287,5

5.2 QUANTIFICAÇÃO β -DEFENSINAS

As defensinas HBD-2 e HBD-3 foram quantificadas em amostras de plasma e saliva provenientes dos indivíduos do grupo controle e dos casais sorodiscordantes através de um ensaio de ELISA. As concentrações médias \pm erro padrão de HBD-2 no grupo controle, parceiros soropositivos e parceiros ENS foram, respectivamente, $0,36 \pm 0,07$ ng/mL, $0,26 \pm 0,06$ ng/mL e $0,16 \pm 0,03$ ng/mL no plasma e $2,35 \pm 0,18$ ng/mL, $2,25 \pm 0,29$ ng/mL e $2,15 \pm 0,33$ ng/mL na saliva. Não foi observada diferença significativa entre os valores encontrados. . As concentrações médias encontradas no plasma para HBD-3 foram de $0,47 \pm 0,07$ ng/mL para o grupo controle, $0,38 \pm 0,07$ ng/mL para os parceiros soropositivos e $0,46 \pm 0,07$ ng/mL para os parceiros ENS, enquanto que os valores para a concentração de HBD-3 na saliva foram de $58,04 \pm 9,89$ ng/mL para o grupo controle, $28,96 \pm 10,73$ para os parceiros soropositivos e $55,03 \pm 11,56$ para os parceiros ENS. Para os três grupos observou-se uma concentração de HBD-3 maior do que HBD-2, tanto no plasma quanto na saliva. A concentração de HBD-3 na saliva dos parceiros soropositivos foi significativamente menor do que no grupo controle e parceiros ENS ($p = 0,01$) (Figura 1). Não houve correlação entre a concentração de β -defensinas na saliva e no plasma de nenhum dos grupos avaliados. Para HBD2 os valores de p variaram de 0,2 a 0,6 e de r de 0,4 a 0,16, enquanto que para HBD3, p variou de 0,4 a 0,8 e r de 0,06 a 0,2.

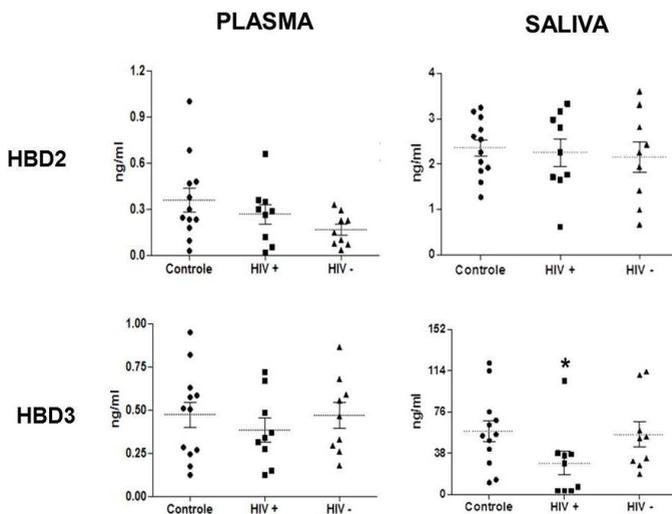


Fig. 1: Quantificação de β -defensinas nas amostras de plasma e saliva. Amostras dos voluntários do grupo controle (●), parceiros soropositivos (■) e parceiros ENS (▲) foram coletadas e processadas conforme descrito na seção Metodologia e as β -defensinas foram quantificadas através de um ensaio de ELISA. Pontos ilustrados no gráfico demonstram concentração de β -defensinas em cada um dos indivíduos analisados, enquanto marcação em pontilhado horizontal denota média e marcação em traço vertical o erro padrão em cada grupo. O resultado mostrado é representativo de três experimentos independentes. *indica diferença significativa, $p < 0,05$.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS

As quimiocinas RANTES, MIP1- β , eotaxina-1 e MCP-1 foram quantificadas em amostras de plasma e saliva provenientes dos indivíduos do grupo controle e dos casais sorodiscordantes através do ensaio de CBA. Dois experimentos foram realizados para quantificar cada uma das quimiocinas e na Figura 2 está demonstrado o resultado de um experimento representativo. As concentrações médias \pm erro padrão de quimiocinas encontradas na saliva dos indivíduos do grupo controle foram $8,66 \pm 1,86$ pg/mL de MIP1- β , $8,41 \pm 1,60$ pg/mL de Eotaxina-1 e $238,60 \pm 45,36$ pg/mL de MCP-1. Entre os casais sorodiscordantes, os parceiros soropositivos apresentaram média \pm erro padrão de $8,50 \pm 3,66$ pg/mL de MIP1- β , $6,74 \pm 1,97$ pg/mL de Eotaxina-1 e $155,50 \pm 18,62$ pg/mL de MCP-1 na saliva, enquanto nos parceiros ENS esses valores foram $6,14 \pm 2,11$ pg/mL de MIP1- β , $3,45 \pm 0,17$ pg/mL de Eotaxina e $346,30 \pm 78,72$ pg/mL de MCP-1 (Figura 2). Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações salivares destas quimiocinas,

entretanto a concentração de Eotaxina-1 foi marginalmente menor ($p = 0,05$) na saliva dos parceiros ENS. Não foi possível quantificar RANTES nas amostras de saliva.

As concentrações médias \pm erro padrão encontradas no plasma dos indivíduos do grupo controle foram $2,97 \pm 0,40$ ng/mL de RANTES, $57,28 \pm 23,44$ pg/mL de MIP1- β , $26,98 \pm 9,67$ pg/mL de Eotaxina-1 e $19,70 \pm 5,21$ pg/mL de MCP-1. Nas amostras de plasma provenientes dos parceiros soropositivos os valores médios \pm erro padrão encontrados foram $4,48 \pm 0,45$ ng/mL de RANTES, $86,81 \pm 22,70$ pg/mL de MIP1- β , $51,40 \pm 16,64$ pg/mL de Eotaxina-1 e $33,31 \pm 14,73$ ng/mL de MCP-1. Entre parceiros ENS as médias \pm erro padrão das concentrações encontradas foram $3,78 \pm 0,57$ ng/mL de RANTES, $106,9 \pm 30,01$ pg/mL de MIP1- β , $78,18 \pm 31,02$ pg/mL de Eotaxina-1 e $214,4 \pm 92,75$ pg/mL de MCP-1 (Fig. 2). A concentração de MCP-1 foi significativamente maior no plasma do grupo de parceiros ENS do que nos demais grupos ($p < 0,01$). Além disso foram observadas diferenças marginalmente significativas na concentração de RANTES, maior no plasma dos parceiros soropositivos ($p = 0,06$) e Eotaxina-1, maior no plasma dos parceiros ENS ($p = 0,08$). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de MIP1- β . Não houve correlação significativa entre a concentração de β -quimiocinas na saliva e no plasma entre todos os grupos (p variando entre 0,06 e 0,9 e r variando de 0,66 a 0,08).

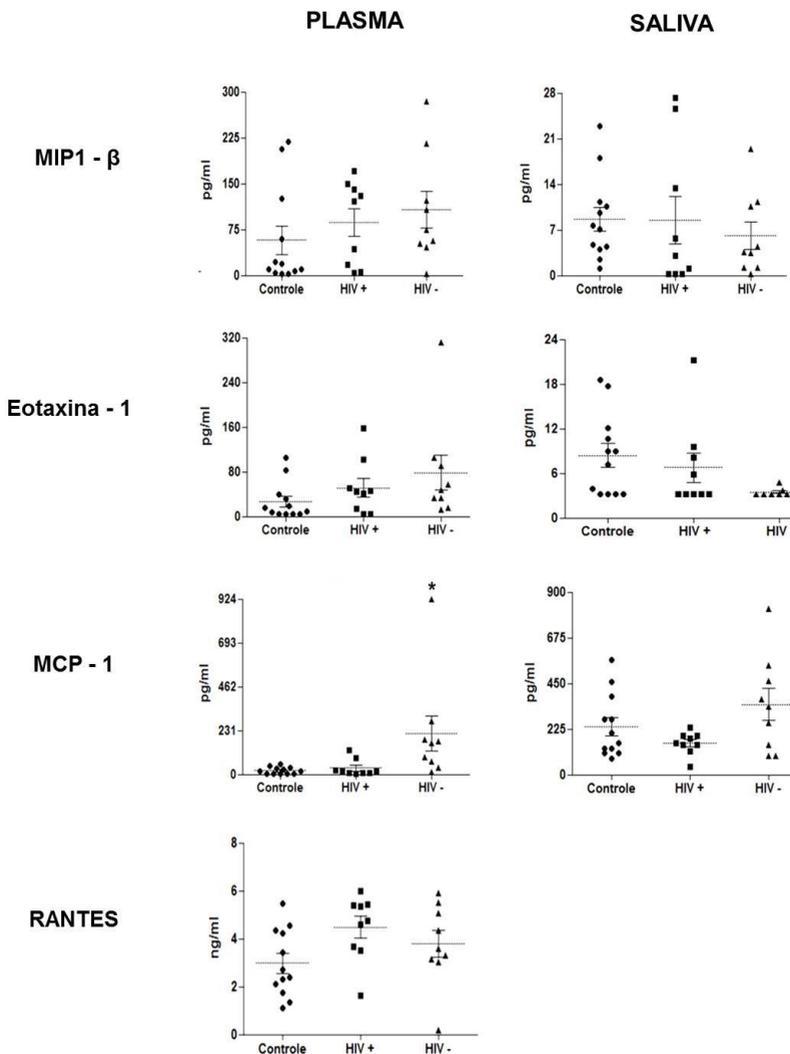


Fig. 2: Quantificação de quimiocinas nas amostras de plasma e saliva. Plasma proveniente dos voluntários do grupo controle (●), parceiros soropositivos (■) e parceiros ENS (▲) foi obtido e processado conforme descrito na seção Metodologia e as β -quimiocinas foram quantificadas através de um ensaio de CBA. Pontos ilustrados no gráfico demonstram individualmente a concentração de β - quimiocinas no plasma, enquanto marcação em pontilhado denota média e marcação em traço vertical o erro padrão dentro de cada grupo. Resultado representativo de dois experimentos independentes. *indica diferença altamente significativa $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

A infecção pelo HIV está entre as mais importantes epidemias contemporâneas, sendo atualmente o contato sexual desprotegido a principal via de transmissão. Há cerca de vinte anos surgiram os primeiros relatos de pessoas que apresentavam histórico de repetida exposição ao HIV mas permaneciam livres de infecção. A partir de então foram realizados diversos estudos com esses indivíduos, denominados expostos e não soroconvertidos (ENS), na tentativa de identificar fatores protetores capazes de controlar a infecção. Entretanto ainda hoje continuam pouco esclarecidos quais os mecanismos estão envolvidos nesta resistência.

Desde a década de 80 tem sido proposto que hábitos de vida e aspectos psicológicos podem influenciar o funcionamento do sistema imunológico (ADER, 1983; RABIN et al., 1989). Assumindo que variáveis ambientais atuando através de vias e mecanismos psicológicos podem ser capazes de alterar a bioquímica do organismo é importante considerar que esses aspectos podem influenciar na condição biológica de resistência ao HIV (GORE-FELTON & KOOPMAN, 2008). Uma vez que a resistência ao vírus pode ser multifatorial, neste trabalho buscamos comparar aspectos relacionados a hábitos de vida e a dosagem de β -quimiocinas e β -defensinas, moléculas relacionadas à resistência ao vírus, entre um grupo de indivíduos envolvidos em relacionamentos sorodiscordantes para HIV e indivíduos sem histórico de exposição ao vírus.

Participaram deste estudo nove casais sorodiscordantes para HIV e como grupo controle doze indivíduos doadores de plaqueta por aférese, todos em relacionamentos estáveis e residentes na região metropolitana de Florianópolis/SC. A idade dos participantes e proporção de homens e mulheres foi semelhante entre os três grupos avaliados. O grau de instrução e a renda familiar foram maiores entre os indivíduos do grupo controle, corroborando dados epidemiológicos que mostram pauperização da epidemia de HIV no estado de Santa Catarina (SANTA CATARINA, 2011). O preservativo foi pouco utilizado para práticas de sexo oral, anal e vaginal por todos os indivíduos participantes deste estudo, comportamento recorrente no país entre indivíduos que mantêm um relacionamento estável (CARRENO & COSTA, 2006; MAIA et al., 2008). Entre os casais sorodiscordantes, mesmo após o conhecimento da condição soropositiva do parceiro, a prática de relações sexuais sem uso do preservativo se manteve. A baixa frequência no uso de preservativo foi também demonstrada em outras

coortes de casais sorodiscordantes, tanto no Brasil, quanto em outros países (SKURNICK et al., 2002; MELO et al., 2008; MUJUGIRA et al., 2011; BUCHBINDER, 2011; SOLOMON & SOLOMON, 2012), caracterizando os parceiros soronegativos como eventualmente resistentes à infecção.

A possibilidade de avaliar características clínicas do parceiro soropositivo e relacioná-las como foco da exposição do parceiro ENS é uma vantagem no estudo de fatores de resistência ao HIV em casais sorodiscordantes. Todos os parceiros soropositivos envolvidos neste estudo possuíam cargas virais indetectáveis, o que potencialmente explicaria a não contaminação dos parceiros ENS. Porém, apesar da presença de dados contraditórios na literatura, acredita-se que a carga viral no sangue não pode ser diretamente relacionada com a carga viral em outros fluidos corporais (KALICHMAN et al., 2008) e sêmen com cargas virais indetectáveis se mantém potencialmente infeccioso (VERNAZZA et al. 1997). Há também evidências da presença de cepas resistentes no trato genital, que não estariam presentes no sangue (LIUZZI et al., 2004). Além da possibilidade de contato com o HIV mesmo na presença de cargas virais baixas, é importante ressaltar que quatro casais que nunca haviam utilizado preservativo descobriram a condição de sorodiscordância no decorrer do relacionamento e todas as descobertas aconteceram frente à ocorrência de sintomas clínicos dos parceiros soropositivos, um indício da presença de maiores cargas virais na época. Ademais, os dados clínicos foram coletados segundo últimas análises registradas em prontuário e a maioria dos casais mantinham relacionamentos desprotegidos há mais de 5 anos (66,8%).

A fim de avaliar aspectos comportamentais os participantes deste estudo responderam um questionário que abordava diferentes temas, dentre os quais hábitos alimentares. A influência da nutrição sobre o sistema imune tem sido proposta a muito tempo por diversos autores (CHANDRA^a, 1987; CHANDRA^b, 1991; CHANDRA^c, 2002; WOLOWCZUK et al., 2008; KIECOLT-GLASER, 2010; MONK et al., 2011) e acredita-se que componentes da dieta podem modular várias vias metabólicas, incluindo a atividade do sistema nervoso simpático, estresse oxidativo, via do fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- κ B), e produção de citocinas pró-inflamatórias (KIECOLT-GLASER, 2010). Os hábitos alimentares avaliados foram semelhantes entre os grupos estudados neste trabalho. Entretanto, notou-se uma tendência de maior consumo de carne vermelha e de alimentos fritos, além de menor consumo de frutas, verduras, legumes e cereais entre os parceiros ENS. O alto consumo de lipídeos, presentes tanto em alimentos fritos como na

carne de gado, está relacionado com uma modulação negativa do sistema imune, sendo capaz de afetar a atividade de células dendríticas, macrófagos e linfócitos T (WOLOWCZUK et al., 2008). Além disso, dietas ricas em gorduras saturadas e pobre em antioxidantes naturais e fibras estão relacionadas a um aumento na produção de mediadores inflamatórios (MONK et al., 2011).

A obesidade também é um fator que pode influenciar e comprometer funções importantes do sistema imune (MARTÍ et al., 2001), e por isso o índice de massa corporal (IMC) dos indivíduos estudados foi calculado afim de verificar se os mesmos encontravam-se em seu peso considerado ideal. A maioria dos participantes do estudo não apresentava problemas de obesidade, sendo que pelo menos 50% dos indivíduos de cada um dos grupos avaliados tinha peso normal. Foram observados apenas três indivíduos com obesidade tipo I, sendo dois pertencentes ao grupo controle e um ao grupo dos parceiros soropositivos. A obesidade é considerada um fator de risco para pacientes soropositivos, sendo associada a uma maior morbidade na infecção por HIV (AMOROSA et al., 2005). Em contrapartida, a prática de atividade física, especialmente aeróbica, é descrita como importante na melhora da condição imunológica destes pacientes (LAPERRIERE et al., 1989; GORE-FELTON & KOOPMAN, 2008). Apesar da prática moderada de exercícios estar relacionada ao aumento da resistência a infecções virais e bacterianas (NIEMAN, 2000), a atividade física regular foi muito semelhante entre os grupos avaliados, não permitindo realizar inferências a respeito de sua influência na resistência ao HIV. Outro aspecto relativo aos hábitos de vida que influencia o sistema imune é o repouso (BOLLINGER et al., 2010), entretanto em todos os grupos houve indivíduos que relataram dormir menos do que consideravam necessário, não sendo observada uma prevalência deste tipo de comportamento em nenhum dos grupos.

Usuários de drogas ilícitas e fumantes foram observados apenas entre os casais sorodiscordantes e ambos os comportamentos podem ter efeitos sob o sistema imune (DOMAGALA-KULAWIK, 2008; IGNATOWSKA-JANKOWSKA et al., 2009). O tabagismo foi mais frequente entre os parceiros ENS, enquanto que a utilização de drogas ilícitas mais frequente entre os parceiros soropositivos. A droga mais utilizada pelos parceiros soropositivos foi cocaína (dados não mostrados). Esse tipo de entorpecente tem a capacidade de regular positivamente a replicação do HIV e seu uso está relacionado com uma progressão mais rápida da doença (RAFIE et al., 2011). Entre os parceiros ENS a única droga utilizada foi maconha (dados não

mostrados). Os canabinóides, grupo de componentes presentes na maconha, tem efeito anti-inflamatório, induzem diminuição do número de linfócitos circulantes e indução de células T regulatórias (IGNATOWSKA-JANKOWSKA et al., 2009).

O cigarro também tem efeito imunossupressor (DOMAGALA-KULAWIK 2008) e o tabagismo foi significativamente mais alto entre os casais sorodiscordantes, sendo mais recorrente entre os parceiros ENS (44,5%). Apesar de induzir uma resposta inflamatória local nos pulmões, o tabaco está relacionado com imunossupressão sistêmica que diminui a produção de anticorpos, a atividade de células NK e a atividade fagocítica de neutrófilos (SATO et al., 2011). Dieta rica em lipídeos e tabagismo, ambos frequentes entre os parceiros soronegativos, são associados à supressão de atividade imune, e a modulação negativa do sistema imunológico foi descrita por alguns autores como possível fator de resistência ao HIV. Ao avaliar o perfil de quimiocinas no lavado cervical em um grupo de profissionais do sexo do Quênia, Lajoei e colaboradores (2012) observaram uma tendência imunossupressora e propuseram que a baixa ativação do sistema imune acarretaria baixo recrutamento celular nas mucosas, reduzindo a disponibilidade de células alvo do HIV neste sítio.

Embora a modulação negativa do sistema imunológico possa estar envolvida na resistência ao HIV, muitas moléculas tem sido estudadas como possíveis fatores envolvidos na resistência ao vírus (DEVICO & GALLO, 2004). Na década de 90 estudos em cultura celular indicaram a inibição da replicação viral por mecanismos não citolíticos, sugerindo-se então que moléculas solúveis poderiam contribuir para a eliminação do vírus (MACKEWICZ & LEVY, 1994). Os primeiros fatores solúveis relacionados com a supressão do HIV foram as β -quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β (COCCHI et al., 1995). Essas moléculas são ligantes naturais de CCR5, utilizado pelo HIV como correceptor para sua entrada na célula e impedem a adsorção do vírus à célula alvo por competirem pelos sítios de ligação (KALINKOVICH et al., 1999).

Uma vez caracterizadas como capazes de inibir a replicação viral, diferentes grupos de investigadores buscaram avaliar a quantidade de β -quimiocinas ligantes de CCR5 em indivíduos expostos e não soroconvertidos. Assim, altas concentrações de RANTES e MIP-1 β foram observadas no plasma e saliva de indivíduos soronegativos sexualmente expostos ao HIV (SHIEH et al., 2001; HASSELROT^b et al., 2010) e profissionais do sexo africanas expressaram altos níveis de RANTES em lavado e biópsias cervicais (HIRBOD et al., 2006; IQBAL

et al., 2005). Contrariando estas evidências, no presente trabalho a expressão aumentada de RANTES e MIP-1 β não foi observada entre os parceiros ENS. Similarmente, Lajoie e colaboradores (2012) não observaram aumento destas moléculas em lavado cervico-vaginal de profissionais do sexo quenianas e Chuenchitra e colaboradores (2008) não encontraram diferenças na expressão de β -quimiocinas entre pacientes progressores rápidos e progressores lentos para HIV.

Assim como em outros trabalhos (HIRBOD et al., 2006; RAMALINGAM, et al., 2008; SACHDEVA et al., 2010; SISAY et al., 2011) no presente estudo observou-se uma maior expressão de RANTES no plasma de indivíduos soropositivos em comparação com indivíduos soronegativos (parceiros ENS e grupo controle). As β -quimiocinas ligantes de CCR5 tem sido observadas em altas concentrações também na mucosa intestinal (OLSSON et al., 2000) e no sêmen (LISCO et al., 2012) de indivíduos HIV positivos. O aumento da concentração destas quimiocinas parece fazer parte da dinâmica da infecção, pois *in vitro* diferentes cepas de HIV induzem macrófagos a produzir estas β -quimiocinas (WONKYU et al., 2001) e concentrações de MIP1 β e RANTES estão relacionadas com a progressão da doença (ZANUSSI et al., 1996; TARTAKOVSK et al., 1998; COCCHI et al., 2000).

Um dos resultados mais relevantes deste estudo foi a expressão aumentada de MCP-1 no plasma dos parceiros soronegativos. Com expressão induzida pelo HIV *in vitro*, a concentração plasmática de MCP-1 é relacionada com a carga viral em pacientes e após TARV observa-se queda na concentração plasmática desta molécula (ANSARI et al., 2006). Está também associada a um aumento da replicação viral e a piores prognósticos na infecção por HIV (ANSARI et al., 2011). Por outro lado, Marlin e colaboradores (2011) sugerem que quimiocinas produzidas pela decídua (mucosa do útero materno) estariam envolvidas com a baixa ocorrência de transmissão materno-fetal de HIV nos primeiros três meses de gestação e entre essas quimiocinas estiveram MIP1 α , MIP1 β , RANTES e MCP-1. Ademais, em resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho Hirbod e colaboradores (2008) observaram altas concentrações de MCP-1 na saliva de profissionais do sexo soronegativas com alto risco de exposição ao HIV em comparação com grupo de soronegativas com baixo risco de exposição e soropositivas. Altos níveis de MCP-1 foram observados também na saliva de homens soronegativos que praticavam sexo oral com parceiros soropositivos (HASSELROT^b et al., 2010). Corroborando com uma possível função dicotômica de MCP-1 na infecção por HIV, Gonzalez e colaboradores (2002) observaram em uma coorte de doadores de sangue

que a homozigose para o alelo *MCP-1* -2578G, relacionado com maior expressão de MCP-1, estava associada com redução do risco de contaminação pelo HIV. Entretanto, uma vez estabelecida a infecção, o mesmo genótipo foi associado com progressão acelerada da doença.

Assim como MCP-1, eotaxina-1 também não é comumente relacionada na literatura como fator de proteção ao HIV, porém no presente trabalho observou-se expressão aumentada desta molécula no plasma dos parceiros ENS. Dois relatos da literatura corroboram essa observação. Promadjed e colaboradores (2010) relacionaram maiores concentrações plasmáticas de eotaxina-1 com a resistência de símios a infecção por SHIV e Hasselrot^b e colaboradores (2010) observaram maiores concentrações desta molécula na saliva de homens soronegativos que realizavam prática de sexo oral com parceiros soropositivos. Apesar dos resultados observados neste trabalho indicarem uma menor concentração de eotaxina-1 na saliva dos parceiros ENS nota-se que a concentração desta molécula ficou abaixo do limite de sensibilidade do teste utilizado para sua dosagem em mais de 50% dos indivíduos estudados, denotando que não trata-se do método mais adequado para quantificação desta molécula em saliva.

Considerando as observações de que o HIV é capaz de induzir a expressão de MIP1 α , MIP1 β , RANTES, além de MCP-1, assim como altas concentrações destas moléculas são também detectadas em pacientes positivos, pode ser que as concentrações elevadas destas quimiocinas observadas em coortes de indivíduos expostos ao HIV e não soroconvertidos seja na verdade uma consequência da exposição ao vírus e que a resistência à infecção seja devido a outros fatores. Corroborando essa hipótese Sachdeva e colaboradores (2010) observaram que os níveis de β -quimiocinas no plasma e lavado cervical de pacientes soropositivos foi menor após TARV, possivelmente relacionados à redução da carga viral, enquanto que outros grupos de pesquisa observaram uma associação entre os níveis plasmáticos de β -quimiocinas e a carga viral (JENNES, et al., 2002; RAMALINGAM, et al., 2008). Além disso, os níveis de MIP1 β , MCP-1 e RANTES observados na saliva de indivíduos que mantinham relações de sexo oral sem proteção com parceiros soronegativos foram associados à frequência de eventos sexuais e consequentemente à exposição ao vírus (HASSELROT^b et al., 2010). Entretanto, os dados obtidos no presente trabalho não são suficientes para corroborar essa hipótese e novos estudos a fim de elucidar a questão devem ser realizados.

Outras moléculas solúveis que poderiam contribuir para a resistência dos parceiros soronegativos ao vírus são as β -defensinas,

pequenos peptídeos catiônicos secretados principalmente por células epiteliais e linfócitos polimorfonucleares, com ação contra um amplo grupo de patógenos (YANG et al., 2002). As β -defensinas HBD2 e HBD3 tem sido descritas como capazes de impedir penetração do HIV em células mononucleares de sangue periférico (SUN et al., 2005) e a replicação viral *in vitro* (FENG et al., 2006). Zapata e colaboradores (2008) observaram um maior número de cópias de RNAm destas moléculas na mucosa oral de indivíduos ENS em comparação à indivíduos não expostos. Entretanto essa diferença não foi observada na mucosa vaginal ou endocervical dos mesmos indivíduos. Em estudo semelhante, Levinson e colaboradores (2009) também não encontraram níveis aumentados de HBD2 ou HBD3 em secreções cervical e vaginal de profissionais do sexo no Quênia. No presente trabalho não se observou aumento de β -defensinas no plasma ou saliva dos parceiros ENS. Assim, apesar de bem caracterizadas como moléculas capazes de interferir com o ciclo do HIV, é preciso avaliar melhor a interação das β -defensinas com o HIV no organismo humano.

A única diferença significativa observada neste trabalho na expressão das β -defensinas foi uma menor concentração de HBD3 na saliva dos indivíduos soropositivos. Concentrações mais baixas de HBD3 foram observadas também na placenta de mães HIV positivas em comparação com mães HIV negativas na Colômbia (AGUILAR-JIMÉNEZ et al., 2011) e HBD2 esteve presente em maiores concentrações na mucosa oral de indivíduos saudáveis em comparação com indivíduos HIV positivos (SUN et al., 2005). Entretanto, dados contraditórios foram obtidos quando Hirbod e colaboradores (2006) avaliaram em biópsias cervicais uma maior expressão de HBD2 entre as HIV positivas, em comparação ao grupos de soronegativas e ENS. É relevante observar que a expressão de β -defensinas se comporta de forma particular em cada uma das diferentes regiões de mucosas avaliadas pelos trabalhos citados. Ademais, não foi observada correlação entre as concentrações de β -defensinas no plasma e saliva dos grupos avaliados neste trabalho. Em conjunto, essas informações podem sugerir a existência de mecanismos distintos entre a ação local e sistêmica destas moléculas, aspecto que pode ser importante na exploração das mesmas como medidas terapêuticas e profiláticas.

Assim, os resultados obtidos contribuem para reforçar o caráter multifatorial dos mecanismos de resistência ao HIV, uma vez que as β -defensinas HBD2 e HBD3, além das β -quimiocinas MIP1 β e RANTES, associadas à inibição da replicação viral, não foram encontradas em altas concentrações na saliva ou plasma dos parceiros ENS.

Corroborando com esta hipótese MCP-1 e eotaxina-1, moléculas pouco descritas na literatura como fatores anti-HIV, foram observadas em quantidades aumentadas no plasma desses indivíduos, apontando que essas quimiocinas também podem ter papel importante na tolerância ao HIV. Fatores comportamentais possivelmente também contribuem para os mecanismos de resistência, entretanto apesar da observação do tabagismo e alimentação rica em lipídeos como comportamentos mais recorrentes entre os sorodiscordantes, estudos com amostragens mais amplas são necessários a fim de relacionar esses comportamentos com a dinâmica viral.

7. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- A média de idade, tempo de relacionamento estável, gênero dos participantes, valores de IMC, prática de atividade física, sono e consumo de álcool foram semelhantes entre os indivíduos estudados. Somente entre os casais sorodiscordantes houve transfusões sanguíneas, tabagistas e usuários de drogas de ilícitas.
- Consumo de frutas, verduras e legumes, além de alimentos fritos foi similar entre os grupos. Entretanto observou-se uma tendência entre os parceiros ENS de menor consumo de vegetais e maior consumo de alimentos fritos em comparação aos demais grupos.
- Grau de escolaridade, renda familiar média e consumo de cereais foram maiores entre os indivíduos do grupo controle. Tabagismo e consumo de carne vermelha foram maiores entre os parceiros ENS.
- O preservativo foi pouco utilizado para prática de sexo oral, bem como sexo com penetração vaginal e anal em todos os grupos. Entre os casais sorodiscordantes a prática de sexo anal foi mais recorrente.
- Dos nove parceiros soropositivos envolvidos neste trabalho todos possuíam cargas virais indetectáveis e apenas dois não estavam realizando TARV. A média de tempo de diagnóstico destes pacientes foi $9,2 \pm 4,9$ anos e a contagem média de linfócitos T CD4+ foi $519,3 \pm 287,5$ cels/mm³.
- A concentração de HBD2, HBD3, MIP1 β , RANTES, MCP-1 e eotaxina-1 no plasma não foi correlacionada com a concentração das mesmas moléculas na saliva em nenhum dos grupos avaliados.
- Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de HBD2 e MIP1- β no plasma ou saliva dos indivíduos estudados.
- Não se observou expressão aumentada de HBD2, HBD3, RANTES ou MIP1- β no plasma ou saliva dos parceiros ENS.
- Os parceiros soropositivos apresentaram menores concentrações de HBD3 na saliva e maiores concentrações de RANTES no plasma.
- MCP-1 e eotaxina-1 foram observadas em maiores concentrações no plasma dos parceiros ENS.

8. CONCLUSÃO

As β -defensinas HBD2 e HBD3, além das β -quimiocinas MIP1 β e RANTES, associadas à inibição da replicação viral, não foram encontradas em altas concentrações na saliva ou plasma dos parceiros soronegativos de casais sorodiscordantes para HIV residentes na região metropolitana de Florianópolis. Em contrapartida, MCP-1 e eotaxina-1 foram observados em quantidades aumentadas no plasma desses indivíduos. Ademais foram observados padrões de nutrição mais recorrentes entre os parceiros soronegativos. Estes diferentes fatores podem estar influenciando a não infecção dos indivíduos expostos e não soroconvertidos da coorte estudada neste trabalho, corroborando com a hipótese de que a resistência ao HIV é multifatorial.

9. REFERÊNCIAS

- ABDOOL, K. Q.; SIBEKO, S.; BAXTER, C. Preventing HIV infection in women: a global health imperative. *Clinical Infectious Diseases*, v.15, p. 122-9, 2010.
- ADER, R. e COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosomatic Medicine*, v. 37, p. 333-40, 1975.
- AGUILAR-JIMÉNEZ W.; ZAPATA W.; RUGELES M. T. Differential expression of human β - defensins in placenta and detection of allelic variants in the DEFBI gene from HIV-1 positive mothers. *Biomedica*, v. 31, p. 44-54, 2011.
- ALCAMÍ, J. The HIV replication cycle. Established therapeutic targets and potential targets. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.26, p. 3-10, 2008.
- AMOROSA V., et al. A tale of 2 epidemics: the intersection between obesity and HIV infection in Philadelphia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 39, p. 557-61, 2005.
- ANSARI A. W., et al. CCL2: A potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. *European Journal of Immunology*, v. 41, p. 3412-18, 2011.
- ANSARI A. W., et al. Dichotomous effects of C-C chemokines in HIV-1 pathogenesis. *Immunology Letters*, v.110, p. 1-5, 2007.
- ANSARI A. W., et al. Host chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2) is differentially regulated in HIV type 1 (HIV-1)-infected individuals. *Internacional Immunology*, v. 10, p. 1443-51, 2006.
- BALTZER H., et al. Relative HIV resistance in kenyan sex workers is not due to an altered prevalence or mucosal immune impact of herpes simplex virus type 2 infection. *Current HIV Research*, v.7, p.504-7, 2009.
- BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science*, v.220, p.868-71, 1983.
- BERNARD, N. F. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 179, p. 538-47, 1999.

BOLLINGER, T., et al. Sleep, immunity, and circadian clocks: a mechanistic model. *Gerontology*, v. 56, p.574–80, 2010.

BRASIL – Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico AIDS – DST. Ano VIII, n.01, 2011.

BUCHBINDER, S. P. HIV epidemiology and breakthroughs in prevention 30 years into the AIDS epidemic. *Topics in Antiviral Medicine*, v.19, p. 38-46, 2011.

CARRENO, I. e COSTA J. S. D. Uso de preservativos nas relações sexuais: estudo de base populacional. *Revista de Saúde Pública*, v. 40, p. 720-6, 2006.

CARRINGTON, M. e O'BRIEN, S. J. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annual Review of Medicine*, v.54, p.535–51, 2003.

CARVALHO, F. T., et al. Protective factors and resilience in people living with HIV/AIDS. *Cadernos de Saúde Pública*, v.23, p. 2023-33, 2007.

CASTELLINO, F.; ZHONG, G.; GERMAIN, R. N. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Human Immunology*, v.54, p. 159–69, 1997.

CHANDRA^a R. K. Nutrition as a critical determinant in susceptibility to infection. *World Review of Nutrition and Dietetics*, v. 25, p. 166-88, 1976.

CHANDRA^b R. K. Nutrition and immunity: I. Basic considerations. II. Practical applications. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, v. 54, p. 193-7, 1987.

CHANDRA^c R. K. Nutrition and the immune system from birth to old age. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, p.73–76, 2002.

CHANG, T. L., et al. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115, p.765-73, 2005.

CHUENCHITRA T., et al. Serum levels of MIP-1beta and RANTES in HIV-1 subtype CRF01_AE infected patients with different rates of disease progression. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, v. 39, p. 856-62, 2008.

CLAVEL, F., et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, v. 233, p.343, 1986.

- CLERICI, M., et al. Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 165, p. 1012–19, 1992.
- CLERICI, M., et al. Cellular immune factors associated with mother-to-infant transmission of HIV. *AIDS*, v.7, p. 1427–35, 1993.
- CLERICI, M., et al. Exposure to human immunodeficiency virus (HIV) type I indicated by HIV-specific T helper cell responses before detection of infection by polymerase chain reaction and serum antibodies. *The Journal of Infectious Diseases*, v.164, p.178–82, 1991.
- COCCHI F., et al. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1a and MIP-1b levels from CD81 T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 13812-7, 2000.
- COCCHI, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1a, and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, v. 270, p. 1811–15, 1995.
- DESHMANE S. L., et al. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon Cytokine Research*, v. 29, p. 313–26, 2009.
- DEVICO, A. L. e GALLO, R C. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p. 401-13, 2004.
- DOMAGALA-KULAWIK, J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v.59, p. 19–34, 2008.
- EYESON, J., et al. Evidence for Gag p24-specific CD4 T cells with reduced susceptibility to R5 HIV-1 infection in a UK cohort of HIV-exposed-seronegative subjects. *AIDS*, v. 7, p. 2299-311, 2003.
- FARQUHAR, C., et al. Salivary human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific immunoglobulin A in HIV-1-exposed infants in Kenya. *Clinical & Experimental Immunology*, v.153, p. 37–43, 2008.
- FENG, Z., et al. Cutting edge: human β - defensin 3 – a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *Journal of Immunology*, v.177, p.782-6, 2006.

FOLKERS, G. K. e FAUCI, A. S. Controlling and Ultimately Ending the HIV/AIDS Pandemic: A Feasible Goal. *The Journal of the American Medical Association*, v.304, p. 350-1, 2010.

FORD, E. S.; PURONEN, C. E.; SERETI, I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Current Opinion in HIV*, v.3, p. 206–14, 2009.

FREED E. O. HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, v. 26, p. 13-33, 2001.

GALLO, R.C., et al. Isolation of human T cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, p. 865-7, 1983.

GANESH, L., et al. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature*, v.426, p. 853-7, 2003.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *Comptes Rendus Biologies*, v.327, p.539-49, 2004.

GORE-FELTON, C. e KOOPMAN, C. Behavioral mediation of the relationship between psychosocial factors and HIV disease progression. *Psychosomatic Medicine*, v.70, p. 569–74, 2008

GUO, C.J., et al. Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS*, v. 18, p. 1217-8, 2004.

HARDIE, R. A., et al. Human leukocyte antigen-DQ alleles and haplotypes and their associations with resistance and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*, v. 23, p. 807-16, 2008.

HASSELROT^a, K., et al. HIV-1 exposed uninfected men who have sex with men have increased levels of salivary CC-chemokines associated with sexual behavior. *AIDS*, v.24, p. 1569–75, 2010.

HASSELROT^b, K., et al. Orally exposed uninfected individuals have systemic anti-HIV responses associating with partners' viral load. *AIDS*, v.24. p. 35-43, 2010.

HIRBOD, T., et al. Up regulation of interferon-alpha and RANTES in the cervix of HIV-1-seronegative women with highrisk behavior. *The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v.43, p.137—43, 2006.

- HIRBOD T., et al. HIV-1 neutralizing activity is correlated with increased levels of chemokines in saliva of HIV-1-exposed uninfected individuals. *Current HIV Research*, v. 6, p. 28-33, 2008.
- IGNATOWSKA-JANKOWSKA, B., et al. Cannabidiol-induced lymphopenia does not involve NKT and NK cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 60, p. 99-103, 2009.
- IQBAL S. M., et al. Elevated T Cell Counts and RANTES Expression in the Genital Mucosa of HIV-1-Resistant Kenyan Commercial Sex Workers. *The Journal of Infectious Diseases*, v.192, p. 728-38, 2005.
- JENNES W., et al. Positive association between β -chemokine-producing T cells and HIV type 1 viral load in HIV-infected subjects in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 18, p. 171-7, 2002.
- JOHN, R., et al. Risk associated HIV-1 cross-clade resistance of whole peripheral blood mononuclear cells from exposed uninfected individuals with wild-type CCR5. *The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v.35, p.1-8, 2004.
- KALICHMAN S. C.; DI BERTO, G. B. A.; EATON, L. M. A. Human Immunodeficiency Virus Viral Load in Blood Plasma and Semen: Review and Implications of Empirical Findings. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 35, p.55-60, 2008.
- KALINKOVICH, A., et al. Chemokines and chemokine receptors: role in HIV infection. *Immunology Letters*, v.68, p. 281-7, 1999.
- KAUL, R., et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS*, v.13, p 23-9, 1999.
- KEBBA, A., et al. HIV type 1 antigen-responsive CD4+ T-lymphocytes in exposed yet HIV Type 1 seronegative Ugandans. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 20, p. 67-75, 2004.
- KIECOLT-GLASER, J. K. Stress, food, and inflammation: psychoneuroimmunology an nutrition at the cutting edge. *Psychosomatic Medicine*, v. 72, p. 365-69, 2010.
- KLOTMAN, M. E. e CHANG, T. L. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Review Immunology*, v.6, p. 447-56, 2006.

- KUHN, L., et al. African infants' CCL3 gene copies influence perinatal HIV transmission in the absence of maternal nevirapine. *AIDS*, v. 21, p. 1753-61, 2007.
- LAJOIE J., et al. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal Immunology*, v. 5, p. 277-88, 2012.
- LANE, H. C. Pathogenesis of HIV Infection: Total CD4+ T-Cell Pool, Immune Activation, and Inflammation. *Topics in HIV medicine: a publication of the International AIDS Society, USA*, v. 18, p. 2-6, 2010.
- LAPERRIERE, A., et al. Exercise intervention attenuates emotional distress and Natural Killer cell decrements following notification of positive serologic status for HIV-1. *Biofeedback and Self-Regulation*, v. 15, p. 229-42, 1990.
- LEVINSON, A. P., et al. Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *AIDS*, v. 23, p. 309–17, 2009.
- LEVY, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS*, v.23, p. 147-60, 2009.
- LISCO A., et al. Semen of HIV-1–Infected Individuals: local shedding of herpesviruses and reprogrammed cytokine network. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 205, p.97–105, 2012.
- LIU, H., et al. Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, Stromal Cell–Derived Factor–1, RANTES, and dendritic cell–specific intercellular adhesion molecule–3–grabbing nonintegrin in seronegative Individuals repeatedly exposed to HIV-1. *The Journal of Infectious Diseases*, v.190, p.1055-8, 2004
- LIUZZI G., et al. Differences between semen and plasma of nucleoside reverse transcriptase resistance mutations in HIV-infected patients, using a rapid assay. *In Vivo*, v. 18, p. 509 –12, 2004.
- LO CAPUTO S., et al. Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. *AIDS*, v. 17, p. 531-9, 2003.
- LUCAS, S. Causes of death in the HAART era. *Current Opinion of Infectious Diseases*, v. 25, p. 36-41, 2012.

- MACKAY, C.R. CCL3L1 dose and HIV-1 susceptibility. *Trends in Molecular Medicine*, v.11, p. 203-6, 2005.
- MACKEWICZ, C. E. e LEVY, J. A. CD8+ cell anti-HIV activity: non cytolytic suppression of virus replication. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 8, p. 1039–1050, 1992.
- MAFFEI, A; PAPADOPOULOS, K; HARRIS, P. E. MHC Class I Antigen Processing Pathways. *Human Immunology*, v.54, p. 91–103, 1997.
- MAIA C.; GUILHEMI D.; FREITAS, D. Vulnerabilidade ao HIV/Aids de pessoas heterossexuais casadas ou em união estável. *Revista de Saúde Pública*, v. 42, p. 242-8, 2008.
- MARLIN, R., et al. Decidual soluble factors participate in the control of HIV-1 infection at the maternofetal interface. *Retrovirology*, v. 18, p. 58-62, 2011.
- MARSDEN, M. D. e ZACK J. A. Eradication of HIV: current challenges and new directions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.63, p. 7–10, 2009.
- MARTÍ, A.; MARCOS, A.; MARTÍNEZ, J.A. Obesity and immune function relationships. *Obesity Reviews*, v. 2, p. 131-40, 2001.
- MELO M. G., et al. Sexual transmission of HIV-1 among serodiscordant couples in Porto Alegre, southern Brazil. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 35, p. 921-5, 2008.
- MIYAZAWAA, M., et al. The ‘immunologic advantage’ of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS*, v. 14, p. 161–75, 2009.
- MONK, J. M.; HOU T. Y.; CHAPKIN, S. R. Recent advances in the field of nutritional immunology. *Expert Review of Clinical Immunology*, v. 7, p. 747–9, 2011.
- MOORE, J.P. e KLASSE, P.J. HIV-1 pathogenesis: the complexities of the CCR5-CCL3L1 complex. *Cell Host & Microbe*, v. 15, p. 281-3, 2007.
- MOUS, K., et al. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. *PLoS One*, v.7, p. e33934, 2012.

MUJUGIRA, A, *et al.* Characteristics of HIV-1 serodiscordant couples enrolled in a clinical trial of antiretroviral pre-exposure prophylaxis for HIV-1 prevention. *PLoS One*, v.6, p. e25828, 2011.

MUKURA, L. R., *et al.* Genital Tract Viral Load in HIV Type 1-Positive Women Correlates with Specific Cytokine Levels in Cervical-Vaginal Secretions But Is Not a Determinant of Infectious Virus or Anti-HIV Activity. *AIDS Research and Human Retroviruses*, Mar 23, Epub, 2012.

NAKAYAMA E. E. e SHIODA T. “Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha. *Reviews in Medical Virology*, v.20, p. 77-92, 2010.

NIEMAN, D.C. Exercise immunology: future directions for research related to athletes, nutrition, and the elderly. *International Journal of Sports Medicine*, v. 21, p. 61-8, 2000.

O’BRIEN, S. J. e MOORE, J. P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunology Reviews*, v.177, p.99–111, 2000.

OKULICZ, J. F., *et al.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term non progressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *The Journal of Infectious Diseases*, v.200, p. 1714–23, 2009.

OLSSON J. *et al.* Human Immunodeficiency Virus type 1: infection is associated with significant mucosal inflammation characterized by increased expression of CCR5, CXCR4, and β -chemokines. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 182, p.1625–35, 2000.

PALLIKKUTH, S., *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV) gag antigen-specific T-helper and granule-dependent CD8 T-cell activities in exposed but uninfected heterosexual partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, p. 1196-202, 2007.

PIACENTINI, L., *et al.* Not just sheer luck! Immune correlates of protection against HIV-1 infection. *Vaccine*, v. 26, p. 3002—7, 2008.

PILOTTI, E., *et al.* Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood*, v. 109, p. 1850-6, 2006.

PROMADEJ, N., *et al.* Broad human immunodeficiency virus (HIV)-specific T cell responses to conserved HIV proteins in HIV-seronegative

women highly exposed to a single HIV-infected partner. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 187, p.1053-63, 2003.

PROMADEJ-LANIER, N., et al. Resistance to simian HIV infection is associated with high plasma interleukin-8, RANTES and eotaxin in a macaque model of repeated virus challenges. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 53 p. 574–81, 2010.

QUINN, T. C., et al. Viral load and heterosexual transmission of HIV type 1. *The New England Journal of Medicine*, v.342, p.921-9, 2000.

RABIN, B.S., et al. Bidirectional interaction between the central nervous system and immune system. *Critical Review of Immunology*, v. 9, p. 279-312, 1989.

RAFIE, C., et al. Cocaine reduces thymic endocrine function: another mechanism for accelerated HIV disease progression. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 27, p. 815-22, 2011.

RAMALINGAM, S., et al. Chemokine profile among human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infected individuals from southern India. *Indian Journal of Medical Research*, v. 127, p. 133-9, 2008.

RANKI, A., et al. T cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV exposed sexual partners. *AIDS*, v3, p. 63–9, 1989.

REICHEE, E. M., et al. Frequency of CCR5- Δ 32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population. *International Journal of Molecular Medicine*, v.22, p. 669-75, 2008.

REICHEE, E. M., et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF1) genetic polymorphism in a sample of healthy individuals, seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and patients infected with HIV-1 from the Brazilian population. *Journal of Immunogenetics*, v.33, p. 127–33, 2006.

REIS, R.K. E GIR, E. Dificuldades enfrentadas pelos parceiros sorodiscordantes ao HIV na manutenção do sexo seguro. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 13, p. 32-7, 2005.

REYNOLDS, S. J, e QUINN T. C. Setting the stage: current state of affairs and major challenges. *Clinical Infectious Diseases*, v.50, p. 71-6, 2010.

ROLLINS, B.J. Chemokines. *Blood*, v.90, p. 909–28, 1997.

SACHDEVA R. K., et al. Effect of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors on cytokine, chemokine, and immunoglobulin profiles in serum and genital secretions of HIV-infected women. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 30, p. 299-310, 2010.

SAMSON, M., et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, v.382, p. 722-5, 1996.

SANTA CATARINA – Diretoria de vigilância epidemiológica. A Epidemia da AIDS em Santa Catarina. 2011.

SANTOS, F. A., et al. Registro Periodontal Simplificado (PSR): Um método rápido e simples de avaliação periodontal. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v.2, p.103-108, 1998.

SATO J., et al. Effect of alcohol drinking and cigarette smoking on neutrophil functions in adults. *Luminescence*, v. 26, p. 557-64, 2011.

SEIDEL, A., et al. Cyclic and Acyclic Defensins Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type-1 Replication by Different Mechanisms. *PLoS One*, v.5, p. 1-9, 2010.

SHACKLETT B. L., et al. Dendritic Cell Amplification of HIV Type 1-Specific CD81 T Cell Responses in Exposed, Seronegative Heterosexual Women. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.18, p. 805–15, 2002.

SHIEH B., et al. Detection of Elevated Serum b-Chemokine Levels in Seronegative Chinese Individuals Exposed to Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. 273–9, 2001.

SISAY Z., et al. Serum chemokine profiles in visceral leishmaniasis, HIV and HIV/ visceral leishmaniasis co-infected Ethiopian patients. *Ethiopian Medical Journal*, v. 49, p. 179-86, 2011.

SKURNICK J. H., et al. Correlates of nontransmission in US women at high risk of human immunodeficiency virus type 1 infection through sexual exposure. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 185, p. 428–38, 2002.

SOLOMON, S. e SOLOMON, S. HIV serodiscordant relationships in India: translating science to practice. *The Indian Journal of Medical Research*, v.134, p.904-11, 2011.

SORIANO, A., et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *The Journal of Infectious Diseases*, v.186, p. 922-31, 2002.

STREBEL, K.; LUBAN J.; JEANG, K. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Medicine*, v.16, p.48-52, 2009.

SUN, L., et al. Human β -defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *Journal of Virology*, v.79, p. 14318-29, 2005.

SUY, A., et al. Immunological Profile of heterosexual highly HIV exposed uninfected individuals: predominant role of CD4 and CD8 T-cell activation. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 196, p. 1191-201, 2007.

TABORDA, N. A., et al. Higher SLPI expression, lower immune activation, and increased frequency of immune cells in a cohort of colombian HIV-1 controllers. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v.60, p.12-9, 2012.

TARTAKOVSKY B., et al. Increased intracellular macrophage inflammatory protein-1beta correlates with advanced HIV disease. *Journal of Acquired Immune Deficiency syndromes and Human Retrovirology*, v. 19, p. 1-5, 1998.

TOMESCU, C.; ABDULHAQQ, S.; MONTANER, L.J. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). *Clinical and Experimental Immunology*, v. 164, p. 158-69, 2011.

TRABATTONI D., et al. Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v.35, p. 455-63, 2004.

ULLA, S. e REMOR, E. A. Psiconeuroimunologia e infecção por HIV: realidade ou ficção? *Psicologia: Reflexão e Crítica*, v.15, p. 113-9, 2002.

UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS) and WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2009. AIDS epidemic update. *UNAIDS*. 2009. Disponível em <http://www.unaids.org/en/default.asp> Acesso em maio de 2012.

VANDEGRAAFF, N. e ENGELMAN, A. Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v.9, p. 1-19, 2007.

VERGIS, E. N. e MELLORS, J. W. Natural history of HIV-1 infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.14, p. 809-25, 2000.

VERNAZZA P. L., et al. Effect of antiviral treatment on the shedding of HIV-1 in semen. *AIDS*, v. 11, p. 1249 –54, 1997.

VICENZI E., et al. Divergent regulation of HIV-1 replication in PBMC of infected individuals by CC chemokines: suppression by RANTES, MIP-1a, and MCP-3, and enhancement by MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 68, p. 405-12, 2000.

WASIK, T. J., et al. Association between HIV-specific T helper responses and CTL activities in pediatric AIDS. *European Journal of Immunology*, v.30, p.117-27, 2000.

WINKLER, C., et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science*, v.279, p. 389-93, 1998.

WOLOWCZUK, I., et al. Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2008, p. 1 – 19, 2008.

WONKYU, C., et al. Induction of rapid and extensive β -chemokine synthesis in macrophages by human immunodeficiency virus type 1 and gp120, independently of their coreceptor phenotype. *Journal of Virology*, v. 75, p. 10738-47, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Body Mass Index Classification. Disponível em: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html. Acesso em: junho de 2012.

WU, Y. e YODER, A. Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis. *PLoS Pathology*, v.5, p.7-86, 2009.

YANG, D., et al. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunology*, v.23, p.291-6, 2002.

ZANUSSI S., et al. Serum levels of RANTES and MIP-1 alpha in HIV-positive long-term survivors and progressor patients. *AIDS*, v. 10, p. 1431-2, 1996.

ZAPATA W., et al. Increased levels of human β -defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals. *Current HIV Research*, v. 6, p. 531-8, 2008.

ZAPATA, W., C. J. MONTOYA, E RUGELES M. T. Soluble factors with inhibitory activity against type 1 human immunodeficiency virus. *Biomédica*, v.26, p. 451-66, 2006.

10. APÊNDICES

10.1 APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Estudo de casais HIV-sorodiscordantes da região metropolitana de Florianópolis/SC.

Responsável: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto Pesquisadores: Bióloga Elis Amaral Rosa

Justificativa dos objetivos: Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que estamos realizando na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) a respeito do HIV que é o vírus causador da AIDS. Este vírus destrói as células responsáveis pela defesa do organismo e assim o corpo fica sem uma proteção natural. Ao se infectar com o vírus, nas primeiras semanas a pessoa pode apresentar sintomas parecidos com os de uma gripe comum. Porém esses sintomas logo desaparecem e o HIV pode ficar anos agindo no organismo sem apresentar sintomas. Após esse tempo, que pode variar muito de pessoa para pessoa, aparecem sintomas graves devido ao aumento da destruição das células de defesa. No período sem sintomas a pessoa infectada pelo HIV segue com uma vida normal inclusive mantendo relacionamentos estáveis, muitas vezes com pessoas que não são infectadas por HIV. Nessas situações são formados os chamados casais sorodiscordantes, em que um dos parceiros tem a infecção pelo vírus e o outro não. A principal via de transmissão do HIV é por atividade sexual sem uso de preservativo, o qual muitas vezes não é utilizado pelos os casais sorodiscordantes em suas relações sexuais. Esse comportamento expõe o parceiro não infectado com HIV ao risco de infecção pelo vírus. Porém ainda assim algumas vezes esse parceiro não se infecta com HIV. Essa é uma situação bastante peculiar e não existe uma explicação clara de porque essas pessoas não infectadas pelo HIV permanecem nesta condição mesmo entrando em contato com o vírus. O objetivo de nosso estudo é justamente tentar esclarecer essa questão. Iremos estudar alguns fatores biológicos que podem ser ativos contra o HIV. Buscaremos identificar se esses fatores estão presentes em maior quantidade nessas pessoas que são expostas ao vírus e não se infectam, em comparação a pessoas HIV positivas e pessoas que nunca tiveram contato com o vírus (chamado grupo controle). É importante ressaltar que mesmo com o grande conhecimento a respeito do HIV e os avanços nos tratamentos, a doença ainda não tem cura conhecida nem terapias preventivas (como vacinas) eficientes. Assim esperamos identificar alguns fatores que possam estar relacionados à resistência contra o HIV.

Metodologia: Se você voluntariamente decidir participar deste estudo após ter lido este termo de consentimento, a pesquisadora lhe pedirá que responda a um

questionário com perguntas relacionadas aos seus hábitos, seu relacionamento com seu parceiro(a), assim como de suas práticas sexuais. Todos os dados deste estudo são confidenciais. A participação dos pacientes neste estudo é voluntária, confidencial e nenhum nome será divulgado em qualquer tipo de publicação. Pedimos autorização para consultar seu prontuário médico e também lhe pediremos para coletar uma amostra de sangue (30ml, menos que um copinho de café) e uma amostra de saliva para que possam ser dosados diferentes fatores possivelmente capazes de impedir a infecção por HIV. A coleta deste material é importante pois os fatores a serem estudados só poderão ser quantificados utilizando essas amostras biológicas.

Riscos e desconfortos: O sangue será colhido da veia do seu braço, e pode acontecer, mas é raro, que apareçam pequenas manchas roxas no local da coleta. Este risco será reduzido ao mínimo porque quem realizará a coleta será um profissional treinado. O único desconforto presente é a picada no braço no momento da coleta do sangue. Para a coleta da saliva pingaremos em baixo de sua língua algumas gotas de uma solução a fim de incentivar a salivação. Em seguida lhe pediremos que permaneça 30 segundos sem engolir a saliva e depois para que deposite a saliva em um tubo.

Benefícios: Muito provavelmente nosso estudo não reverterá em nenhum benefício imediato a você. Porém fornecerá informações importantes que possivelmente servirão como base para futuras pesquisas, podendo contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias de combate ao HIV.

Diretos do Indivíduo Pesquisado:

1. Garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta: O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre o questionário aplicado ou sobre o estudo.

2. Liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si ou para seu tratamento: Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar em qualquer momento. Se você decidir não participar ou abandonar o estudo, não será penalizado de nenhuma maneira. Uma cópia do formulário lhe será dada e você pode ficar com ela.

3. Garantia de privacidade à sua identidade e do sigilo de suas informações: As perguntas feitas durante a entrevista ou as informações do seu prontuário médico ou dos seus exames serão confidenciais e apenas você, os investigadores do grupo de pesquisa, o Comitê de ética em Pesquisa da UFSC terão acesso a estas informações. Você não será identificado (a) em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo.

4. Garantia de que participação gratuita: Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo.

DÚVIDAS E ESCLARECIMENTOS:

Se você tiver qualquer pergunta futura sobre sua participação neste estudo ou quiser desistir de sua participação mesmo após a assinatura deste termo você pode contatar a Mestranda Elis Amaral Rosa no telefone (48) 9933 0904 ou pelo email elis.biologia@gmail.com. Caso você tenha alguma pergunta no que se refere a você como indivíduo pesquisado, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética – (48) 3721-9206.

CONSENTIMENTO

Eu recebi uma cópia e li (ou leram para mim) as informações referentes a esta pesquisa. Foram explicados todos os procedimentos deste estudo. Sei que posso perguntar o que desejar e compreendo exatamente que o meu sangue e saliva serão utilizados para realização de pesquisas sobre o HIV. Sei também dos possíveis desconfortos e benefícios com a participação neste estudo. Mantendo-se o sigilo dos dados autorizo toda documentação necessária, a divulgação e a publicação dos dados gerados com este estudo em periódicos, revistas bem como apresentação em congressos, simpósios e quaisquer eventos de caráter científico. Sou livre para autorizar ou não a minha participação neste estudo.

DECLARAÇÃO

Eu, _____
 CPF n.º. _____ declaro estar ciente de todas as
 informações acima, tendo lido atentamente e concordado com o todo teor.

Assinatura

Pesquisador responsável: _____
Prof. Dr. Aginaldo R. Pinto

Pesquisadora principal: _____
Bióloga Elis Amaral Rosa

Florianópolis, _____ de _____ de 20__.

10.2 APÊNDICE 2: CARTAZ UTILIZADO PARA DIVULGAÇÃO

**Estudo de casais HIV-
sorodiscordantes da região
metropolitana de Florianópolis/SC**



**O amor é maior
que qualquer
discordância**

**Se você vive um relacionamento
sorodiscordante (quando um parceiro é
soropositivo e o outro não) colabore
com nossa pesquisa e ajude a aumentar
o conhecimento sobre HIV.**

INFORME-SE COM SEU MÉDICO!

Uma parceria entre:



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA

HEMOSC

ISTA

10.3 APÊNDICE 3: QUESTIONÁRIO SÓCIO-COMPORTAMENTAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Avaliação Sócio-Comportamental

Data: __/__/__ **Horário:** _____ **Local:** _____
Coleta: () sangue () saliva **Entrevistador(a):** _____

DADOS PESSOAIS

Sexo: () M () F **Data de nascimento:** __/__/____ **Idade:** _____

Tipo de sangue: _____ **Peso:** _____ kg **Altura:** _____ cm

Escolaridade: () fundamental incompleto () fundamental completo () médio incompleto () médio completo () superior incompleto () superior completo

Estado Marital: () em relacionamento estável () em união estável () casado () divorciado () viúvo

Renda Familiar (Salário Mínimo = R\$ 545,00):

() até 1 salário mínimo () de 1 a 3 salários mínimos () de 4 a 6 salários mínimos () de 7 a 9 salários mínimos () de 10 a 12 salários mínimos

Situação Profissional: () do lar () sem ocupação () emprego fixo () autônomo

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente () Asiático descendente () Indígena descendente

Cor da pele: () negra () mulata () amarela () branca

A RESPEITO DE SEUS HÁBITOS

1. Você já recebeu transfusão de sangue?

() Sim () Não *A última ocorrência foi a quanto tempo?* _____

2. Você tem tatuagem?

() Sim () Não *A última ocorrência foi a quanto tempo?* _____

3. Você pratica atividade física? *Qual tipo?* _____

() Regularmente, 1 vez por semana () Regularmente, 2 a 4 vezes por semana

() Regularmente, 5 ou mais vezes por semana () Raramente ()

Não pratico atividade física

4. Você pratica meditação? *Quanto tempo?* _____
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente
 Não pratico meditação

5. Como é seu sono?
 Sempre durmo menos do que considero necessário.
 Na *maioria das vezes* durmo menos do que considero necessário.
 Raramente durmo menos do que considero necessário
 Durmo sempre o que considero necessário.

6. Você consome verduras, frutas e legumes?
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não

7. Você consome outros cereais além arroz e feijão? (granola, aveia, linhaça, lentilha)
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não

8. Você consome carne vermelha? (gado e/ou porco)
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não

9. Você consome alimentos fritos?
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não

10. Você consome bebidas alcoólicas?
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não
Quais? cerveja vinho vodca cachaça Outros _____

11. Você fuma? (cigarros, palheiros, charuto, cachimbo, etc)
Quantos cigarros por dia? _____
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não

12. Você utiliza drogas não injetáveis? (maconha, cocaína, ecstasy, LSD, etc)
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não este tipo de drogas
Quais? maconha cocaína ecstasy LSD craque Outros

13. Você utiliza drogas injetáveis?
 Regularmente, 1 vez por semana Regularmente, 2 a 4 vezes por semana
 Regularmente, 5 ou mais vezes por semana Raramente Não

14. **Caso positivo**, você já utilizou drogas injetáveis com compartilhamento de seringa?
 Sim Não *A última ocorrência foi a quanto tempo?* _____

A RESPEITO DE SEU RELACIONAMENTO:

15. Qual sua orientação sexual?
 Heterossexual Homossexual Bissexual Transexual

16. Você tem um relacionamento estável?
 Sim Não

17. Qual o sexo de seu(a) parceiro(a) nesse relacionamento?
 homem mulher

18. Há quanto tempo dura esta união?
 menos de 2 anos de 2 a 5 anos de 5 a 10 anos mais de 10 anos

19. Vocês conheciam sua condição sorodiscordante para HIV antes do início do relacionamento?
 Sim Não

20. **Caso a resposta anterior seja não**, há quanto tempo você e seu parceiro(a) conhecem sua condição de casal sorodiscordante para HIV?
 menos de 1 ano de 1 a 3 anos de 3 a 5 anos mais de 5 anos

A RESPEITO DE SUAS PRATICAS SEXUAIS COM SEU PARCEIRO(A):

21. Você e seu(a) parceiro(a) praticam sexo **oral**?
 Sim Não **Caso a resposta seja NÃO passe para a pergunta 26.**

Caso a resposta seja SIM:

22. Em geral, com qual frequência você realiza sexo **oral** em seu(a) parceiro(a)?
 1 a 2 vezes por semana 3 a 5 vezes por semana mais de 5 vezes

23. Enquanto você realiza sexo **oral** em seu(a) parceiro(a) com que frequência vocês fazem uso de **preservativo**?
 Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca
Se a resposta é “Sempre”, passe para a pergunta 26.

Caso contrário:

24. A última vez que você realizou **sexo oral sem preservativo** em seu(a) parceiro(a) foi a quanto tempo?

- menos de **1 semana** menos de **1 mês** menos de **6 meses**
 mais de 6 meses

Se seu parceiro for homem:

25. Enquanto **você** realiza sexo oral em seu parceiro **sem o uso de preservativo**, com que frequência ocorre **ejaculação** por parte dele?

- Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

26. Você e seu(a) parceiro(a) praticam **sexo com penetração VAGINAL**?

- Sim Não **Caso a resposta seja NÃO passe para a**

pergunta 31.

Caso a resposta seja SIM:

27. Com qual frequência você e seu parceiro(a) praticam **sexo com penetração VAGINAL**?

- 1 a 2 vezes por semana 3 a 5 vezes por semana mais de 5 vezes

28. Durante a prática de sexo com **penetração VAGINAL** com que frequência vocês fazem uso de **preservativo**?

- Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

Se a resposta é “Sempre”, passe para a pergunta 31.

Caso contrário:

29. Na realização de penetração **VAGINAL sem preservativo**, com que frequência ocorre **ejaculação**?

- Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

30. A última vez que vocês praticaram sexo com **penetração VAGINAL sem preservativo** foi a quanto tempo?

- menos de **1 semana** menos de **1 mês** menos de **6 meses**
mais de 6 meses

31. Você e seu parceiro(a) praticam **sexo com penetração ANAL**?

- Sim Não **Caso a resposta seja NÃO passe para a pergunta 40.**

Caso a resposta seja SIM:

32. Com qual frequência você e seu parceiro(a) praticam **sexo com penetração ANAL**?

- 1 a 2 vezes por semana 3 a 5 vezes por semana mais de 5 vezes

33. Durante a prática de sexo com **penetração ANAL** com que frequência vocês fazem uso de **preservativo**?

Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca
Se a resposta é “Sempre”, passe para a pergunta 40.

Caso contrário responda de acordo com a característica de seu relacionamento:

Se você mantém um relacionamento com uma pessoa do sexo OPOSTO:

34. Na realização de penetração ANAL **sem preservativo**, com que frequência ocorre **ejaculação**?

Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

35. A última vez que vocês praticaram sexo com **penetração ANAL sem preservativo** foi a quanto tempo?

menos de **1 semana** menos de **1 mês** menos de **6 meses**
 mais de 6 meses

Se você mantém um relacionamento com uma pessoa do MESMO sexo:

36. A prática de **sexo com penetração ANAL é recíproca**? Com que frequência?

Ambos praticamos com **igual** frequência.

Ambos praticamos, porém **meu parceiro** realiza penetração com maior frequência.

Ambos praticamos, porém **eu** realizo penetração com maior frequência.

Apenas eu realizo penetração.

Apenas **meu parceiro(a)** realiza penetração.

37. Quando **você** realiza **penetração ANAL** sem preservativo, com que frequência ocorre **ejaculação**?

Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

38. Quando **seu parceiro** realiza **penetração ANAL** sem preservativo, com que frequência ocorre **ejaculação**?

Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

39. A última vez que vocês praticaram sexo com **penetração ANAL sem preservativo** foi a quanto tempo?

menos de **1 semana** menos de **1 mês** menos de **6 meses**
 mais de 6 meses

A RESPEITO DE SUAS PRÁTICAS SEXUAIS:

40. Você fazia uso de preservativo durante **sexo oral** em outros relacionamentos que não eram sorodiscordantes?

Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

41. Você fazia uso de preservativo durante **sexo com penetração** em outros relacionamentos que não eram sorodiscordantes?

Sempre Na maioria das vezes Poucas vezes Nunca

42. Durante o período de seu relacionamento atual, você pratica/praticou sexo (oral ou com penetração) **sem preservativo com parceiros(as) eventuais (fora do relacionamento)?**

Sim Não **Caso a resposta seja NÃO encerre o questionário aqui.**

Caso a resposta seja SIM:

43. Durante seu relacionamento atual, você já praticou sexo **oral sem preservativo** com quantos(as) parceiros(as) eventuais?

1 pessoa 2 a 5 pessoas de 5 a 10 pessoas mais de 10 pessoas nenhuma

44. Durante seu relacionamento atual, você já praticou sexo com **penetração sem preservativo** com quantos(as) parceiros(as) eventuais?

1 pessoa 2 a 5 pessoas de 5 a 10 pessoas mais de 10 pessoas nenhuma

45. Quando foi a última vez que você praticou sexo **oral sem preservativo** com outras pessoas além de seu(a) atual parceiro(a) de relacionamento?

menos de 1 semana algumas semanas alguns meses mais de 6 meses

46. Quando foi a última vez que você praticou sexo com **penetração** sem preservativo com outras pessoas além de seu(a) atual parceiro(a) de relacionamento?

menos de 1 semana algumas semanas alguns meses mais de 6 meses