

FIOCRUZ

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

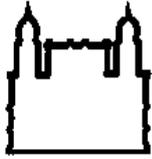
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANCESTRALIDADE GENÔMICA EM UMA
AMOSTRA DE PORTADORES DO HIV-1 DO
ESTADO DA BAHIA**

THAIS FERREIRA BOMFIM

**Salvador - Bahia – Brasil
2008**



FIOCRUZ

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

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

THAIS FERREIRA BOMFIM

**ANCESTRALIDADE GENÔMICA EM UMA
AMOSTRA DE PORTADORES DO HIV-1 DO
ESTADO DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadoras: Prof. Dra. Kiyoko Abé Sandes
Prof. Dra. Angelina Xavier Acosta

**Salvador - Bahia – Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Bomfim, Thais Ferreira
B695a Ascestralidade genômica em uma amostra de portadoresdo HIV-1 do estado
da Bahia / Thais Ferreira Bomfim. –2008.
105 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocopia)

**Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz. Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa,
2008.**

Orientadora: Profª. Drª. Kiyoko Abe Sandes.
Co-orientadora: Profª.Drª. Angelina Xavier Costa

1. Alelos específicos de população. 2. HIV. 3. Polimorfismos. I.Título.

CDU 616. 98: 575.113

"A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre".

Louis L'Amour

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para sua realização. Parentes, familiares, amigos, colegas... A cada uma das pessoas que fizeram e fazem parte do meu cotidiano, com suas particularidades e personalidades distintas, mas que juntas acrescentaram muito na minha formação pessoal e profissional. Sem cada um de vocês, seria impossível seguir em frente...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a força e a perseverança para ir em busca dos meus sonhos e meus objetivos e por ter me permitido chegar até aqui;

A minha família, meus pais, Lindinalva e Elpidio, minha irmã, Karine, e minha avó, Jaimira. A paciência e compreensão oferecida por vocês, além do amor incondicional, foram um dos alicerces para a conclusão deste trabalho;

A André Palma, por todo incentivo nos momentos finais deste trabalho, pela atenção, carinho, paciência, e apoio em todos os momentos da minha vida;

Aos amigos pessoais, a toda a família do Ballet Acadêmico da Bahia, a escola onde eu pude ter o privilégio de conhecer pessoas maravilhosas e que me ajudaram a tornar a jornada enfrentada nesses dois anos de curso, muito mais leve, divertida e prazerosa. Em especial agradeço a Mirela Dórea, por toda a força e incentivo e a Vilma Reis, minha amiga, companheira, ouvinte, parceira de todas as horas, por todos os momentos que estive do meu lado me ajudando a sempre seguir em frente;

A todos os colegas e amigos do Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), pela amizade, atenção, ensinamentos, companheirismo, e por todos os momentos compartilhados dentro e fora das dependências do laboratório;

Ao núcleo de Bioinformática do LASP, pelo suporte e disponibilidade de computadores para a elaboração dessa dissertação;

Ao GENLASP, grupo de pesquisa em Genética do LASP, do qual com muito orgulho faço parte, agradeço por todos os momentos de discussão, aprendizagem e lazer que compartilhei ao lado de vocês;

Aos amigos: Cínara (Ci), por todo carinho sempre demonstrado, Giselle (Gisa), por todos os conselhos, lições, puxões de orelha, mas também por ser essa amiga incrível, que só ela sabe ser; Fabiana (Bi), por ter sido sempre a nossa “chefe”, nos ensinando como organizar as melhores festas, mas também a ter toda a seriedade e compromisso com o trabalho; A Carol (U-R-P-I-A), por respirar Biologia do nosso lado, por sua extrema responsabilidade e por ter esse jeito “sem noção” que nos diverte tanto; Amália (Mamá), pela companhia, apoio, por ter estado sempre disponível para ajudar nas horas mais difíceis deste trabalho, pelas caronas, enfim, pela grande amizade; Tatiana (tia Tati), por nossas conversas intermináveis, regadas a muita pipoca de microondas; Ana Cláudia (Barbie) pela paciência, ensinamentos, e grande atenção em todos os nossos encontros; Marcela (Kelly Key), por

ser sempre tão gentil; Aline, por ter esse jeitinho meigo de encarar a vida; Filipe (Lipinho) pela convivência diária, Raimundo (Pretinho), pelas conversas e dicas e pela ajuda nos momentos de desespero; Cláudio Paulo (CP), por tudo, toda ajuda, todo apoio, por todas as vezes que me socorreu em situações difíceis, sua amizade é muito especial; Fernando (Little) que mesmo distante se faz presente sempre entre a gente; Ao meu eterno e sempre orientador, Rogério Grimaldi (Ró), por tudo, por ensinar, ouvir, acompanhar, atender, a estar sempre presente e ser sempre a pessoa indescritível que é. A vocês meu muitíssimo obrigado, sem o apoio e a presença de vocês em minha vida, não sei se seria o que sou hoje; Em especial, agradeço a Taisa Machado, por toda a convivência, amizade, aprendizagem e parceria nos trabalhos e na vida. Sua amizade foi mais que uma conquista, foi uma dádiva; A diretoria do Centro de Referência Estadual em AIDS (CREAIDS), a Dra Fabiana, Erivelton e todos os profissionais que contribuíram para a realização deste trabalho; Ao Laboratório de Retrovírus do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (HUPES/ UFBA) e a todos os seus profissionais, pela coleta das amostras deste estudo, e pelo apoio no trabalho; A Coordenação de Ensino do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pela administração do curso e suporte aos alunos; Ao Ministério da Saúde, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo auxílio financeiro; Aos professores que gentilmente aceitaram compor a banca para a avaliação deste trabalho; Aos professores do curso de Biotecnologia e Medicina investigativa por terem tornado, muitas vezes, as disciplinas ministradas em completos ninhos de amizade e saber. A Profa. Dra. Kiyoko Abé Sandes por toda a orientação, paciência, apoio, conselhos, e principalmente pelos ensinamentos biológicos, profissionais e de vida; A Profa. Dra. Angelina Xavier Acosta por todo apoio e atenção oferecidos ao longo de toda a minha trajetória em seu grupo de pesquisa. Grupo ao qual, com muito prazer e orgulho, faço parte; A Dr. Bernardo Galvão, chefe LASP, por ter me acolhido neste laboratório e assim permitido a realização deste trabalho; A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir este trabalho, meu muitíssimo obrigada!!

RESUMO

Dados históricos e genéticos mostram que a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, fruto de um processo de miscigenação entre os três principais grupos étnicos (ameríndios, europeus e africanos) formadores da nossa população. Entretanto a distribuição desses três grupos ao longo do território brasileiro não ocorreu de forma homogênea, ou seja, a proporção de africanos, ameríndios e europeus difere significativamente a depender da região geográfica. Na Bahia a proporção de afro-descendentes é de 77,5%, segundo autodenominação no censo do IBGE. Poucos trabalhos descrevem a diversidade genética na Bahia e são em sua maioria baseados em marcadores genéticos clássicos. Atualmente tem sido estimada mistura racial e diversidade genética através de marcadores moleculares que apresentam alelos com um diferencial de frequência acima de 30% entre populações geográfica e etnicamente distintas, que são conhecidos como Alelos Específicos de Populações (PSA). Além dos PSA, também são utilizados marcadores culturais, que através da análise de sobrenomes de família, são bastante úteis para inferir origem e mistura racial em populações miscigenadas como a da Bahia. Dados da literatura mostram que há um risco para o desenvolvimento de algumas doenças a depender do grupo étnico, como doenças cardiovasculares e infecciosas, como a AIDS. No Brasil, estima-se que até o final de 2004, o número de indivíduos infectados pelo HIV-1 foi de 362.364. A Bahia é o estado brasileiro que apresenta a 2ª maior incidência de AIDS. É sabido que o curso clínico da infecção pelo HIV-1 é determinado por complexas interações entre as características virais e os fatores do hospedeiro. Para estimarmos a contribuição dos grupos ancestrais nesta população foram analisados 517 indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia para 10 PSA (*AT3-I/D*, *APO*, *SB19.3*, *PV92*, *FYnull*, *LPL*, *CKMM*, *GC-F*, *GC-S* e *CYP3A4*) e para 2 marcadores de susceptibilidade ao HIV-1 (*CCR5-Δ32* e *CCR2-64I*). Foram investigadas as condições sócio-econômicas e a ancestralidade destes pacientes através da sua autodenominação e de uma análise fenotípica baseada em caracteres físicos, além disso, analisou-se os sobrenomes de família para identificação de sobrenomes de conotação religiosa. A estimativa de ancestralidade genômica mostrou que a população analisada apresentava uma maior contribuição africana de 48%, seguida da européia (35%) e ameríndia (17%), sendo as proporções bastante similares quando comparadas com a população de Salvador, não infectada pelo HIV-1. A análise fenotípica quando comparada com a autodenominação desses indivíduos, mostrou-se discordantes apenas na caracterização dos indivíduos negros. Encontrou-se também uma associação entre maior frequência de sobrenome de conotação religiosa com o aumento do fenótipo negróide, indicando que a análise de sobrenome é uma ferramenta importante para inferência de ancestralidade africana. A análise sócio-econômica mostrou que a população com menor nível de escolaridade e menor renda familiar tinha maior ancestralidade africana, sugerindo que a ancestralidade está influenciando numa maior susceptibilidade ao HIV/AIDS. Assim, este trabalho foi de grande importância para estimar a proporção de mistura entre grupos ancestrais na composição desta população, além de fornecer subsídios para auxiliar ações na área de saúde para melhor atender as necessidades desta população.

Palavras Chave: Alelos específicos de população, HIV, Polimorfismos

ABSTRACT

The Brazilian population is one of the most heterogenic of the world due to miscegenation between three main ethnical groups (Amerindians, Europeans and Africans) that make up this population. However the distribution of these three groups through the Brazilian territory was not homogeneous so that the ratios of Africans, Amerindians and Europeans differ according to the geographic regions. In Bahia, the African descendants ratio is 77,5% according to the self-denomination of IBGE census. Few studies describe the genetic diversity in Bahia and they are mostly based on classic "genetics markers". Nowadays racial mix and genetic diversity have been estimated by molecular markers known as Population Specific Alleles (PSA) whose frequency varies more than 30% between distinct geographic regions and distinct ethnical populations. Besides PSA, cultural markers are also used like family surnames that are very useful to study the origin and racial mix in miscegenated populations. Data of the literature show that some ethnical groups are at risk for some diseases such as heart and infectious diseases like AIDS. In Brazil, until the end of 2004, the number of individuals infected by HIV-1 was determined by complex interactions among virus features and the host factors. To estimate the contribution of ancestral groups in this population, 10 PSA (*AT3-I/D*, *APO*, *SB19.3*, *PV92*, *FYnull*, *LPL*, *CKMM*, *GC-F*, *GC-S* and *CYP3A4*) and 2 markers of susceptibility to HIV-1 (*CCR5-Δ32* e *CCR2-64I*) were analyzed in 517 individuals of Bahia infected by HIV-1. The social-economic conditions were analyzed as well as the ethnicity of those patients through self-determination and phenotypic analyze based on physical features. Besides, their surnames were also analyzed for religious connotation. The estimate of genomic ancestry showed that in this population the African contribution is more important (48%), followed by the European (35%) and Amerindian (17%) contributions. The respective ratios were similar to those of the HIV-1 negative population of Salvador. The phenotypic analyses matched with the results of self-determination except in the case of the blacks. A high frequency of religious- conotated surnames is associated with "black" phenotype, indicating that the analyze of surnames is an important tool for inference of African ancestry. The social-economic analyses showed that low educated populations and low familiar income have more African ancestry suggesting that the ancestry is related to higher susceptibility to HIV/AIDS. So, this study was really important to estimate the ratio of mixture among ancestral groups in the composition of this population. Moreover it provides information that will help to better take care of the health of this population.

Key words: Specific alleles of population, HIV, polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do HIV-1	25
Figura 2. Representação da entrada do HIV-1 nas células-alvo usando o co-receptor CCR5	26
Quadro I. Sobrenomes de conotação religiosa mais freqüentes na Bahia, segundo Tavares-Neto e Azevedo, 1977	34
Quadro II. <i>Loci</i> , tipo de polimorfismo analisado, localização cromossômica e população onde o alelo*1 é mais freqüente.....	39
Quadro III. Seqüência de <i>primers</i> e temperatura de pareamento (T.P.) para cada <i>Loci</i> analisado	40
Figura 3. Visualização dos fragmentos amplificados para o <i>locus AT3</i>	41
Figura 4. Visualização dos fragmentos amplificados para o <i>locus APO</i>	41
Figura 5. Visualização dos fragmentos amplificados para o <i>locus Sb19.3</i>	42
Figura 6. Visualização dos fragmentos amplificados para o <i>locus PV92</i>	43
Figura 7. Visualização dos fragmentos amplificados para o <i>locus CCR5</i>	43
Figura 1 (Manuscrito 1) Distribuição dos indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia em relação à mistura étnica com europeus, africanos e ameríndios.....	57
Figura 1 (Manuscrito 2) Gráfico de estimativa de mistura entre indivíduos com sobrenome de conotação religiosa e sem esse tipo de sobrenome	74
Figura 2 (Manuscrito 2) Gráfico de estimativa de mistura dos indivíduos infectados pelo HIV-1 com sobrenome de conotação religiosa agrupados como afro-descendentes e não afro-descendentes	75

LISTA DE TABELAS

Manuscrito nº 1

Tabela 1 – Dados sócio-econômicos de uma amostra de portadores do HIV-1 do estado da Bahia	52
Tabela 2 - Amostras analisadas, frequências genotípicas e frequência do alelo*1 para os marcadores de ancestralidade <i>AT3, Sb19.3, APO, PV92, FYnull, CKMM, LPL, CYP3A4 e GC</i> numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 na Bahia...	53
Tabela 3 - Frequências do alelo*1 para os <i>loci AT3, Sb19.3, APO, PV 92, FY NULL, CKMM, LPL, CYP3A4e GC</i> em indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia e não infectados de Salvador – BA e análise de diferenciação gênica entre as duas populações.....	54
Tabela 4 - Frequências dos alelos específicos de população em populações parentais e nos portadores de HIV-1.....	55
Tabela 5 - Proporções de marcadores africanos, europeus e indígenas em uma população infectada pelo HIV-1 da Bahia e entre não infectados da cidade de Salvador – BA	55
Tabela 6 - Estimativa de mistura nos indivíduos infectados pelo HIV-1 classificados quanto ao nível sócio-econômico.	58
Tabela 7 - Distribuição genotípica e frequência alélica das mutações <i>CCR5Δ32</i> e <i>CCR264I</i> numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia	59
Tabela 8 - Distribuição dos fenótipos entre os três <i>status</i> clínicos numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 na Bahia.	59

Manuscrito nº 2

Tabela 1 - Sobrenomes de conotação religiosa mais frequentes na Bahia, segundo Tavares-Neto e Azevedo, 1977	69
Tabela 2 - Comparação entre a auto-definição dos indivíduos portadores do HIV-1 e a classificação fenotípica baseada em características físicas	70
Tabela 3 - Estimativa de mistura étnica entre os indivíduos analisados nas classificações auto referida e fenotípica	70
Tabela 4 - Comparação da autodenominação x classificação fenotípica x % de marcadores africanos dos indivíduos infectados pelo HIV-1.....	71

Tabela 5 - Sobrenomes mais freqüentes e de conotação religiosa encontrados em uma população infectada pelo HIV-1 da Bahia x sobrenomes de conotação religiosa encontrados na Bahia (Tavares-Neto e Azevedo, 1977).....	72
Tabela 6 - Comparação entre os sobrenomes de conotação religiosa encontrados mais frequentemente em uma amostra da população geral de Salvador – BA e numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia	72
Tabela 7 - Sobrenomes de conotação religiosa x classificação fenotípica x % de marcadores africanos.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Adenina

AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

C - Citosina

dbSNP – *database Single Nucleotide Polymorphism* (Banco de dados de polimorfismos de único nucleotídeo)

CPqGM – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

DNAmt - Ácido Desoxirribonucléico Mitocondrial

FA – Frequência Alélica

FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz

G – Guanina

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HTLV – *Human T-cell Lymphotropic Virus* (Vírus Linfotrópico das Células T Humanas)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Kb – Kilobases

LASP – Laboratório Avançado de Saúde Pública

LPL – Lipoproteína Lipase

Mp – Marcador de Peso Molecular

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informação Biotecnológica).

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PSA – *Population Specific Alleles* (Alelos Específicos de População)

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

SINE – Short Interspersed Nuclear Elements (Curtos Elementos de Inserção Nuclear)

SNP – *Single Nucleotide Polimorphism* (Polimorfismo de Único Nucleotídeo)

T – Timina

VLDL – *Very low density lipoproteins* (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)

VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats* (Número Variável de Sequências Repetidas Consecutivamente).

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Colonização da Bahia	15
1.2 Diversidade Genética da População	16
1.3 PSA – Alelos Específicos de População	18
1.4 Sobrenome e Origem Racial	19
1.5 Ancestralidade x Doenças x Status Social	20
1.6 Infecção pelo HIV-1	21
1.7 JUSTIFICATIVA	26
1.8 OBJETIVOS	27
1.8.1 Objetivos Gerais	27
1.8.2 Objetivos Específicos	27
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 Fluxograma	28
2.2 Amostras	29
2.2.1 Indivíduos Infectados pelo HIV-1	29
2.2.2 - População de Salvador	30
2.2.3 – Populações Parentais	31
2.3 Análise de Sobrenomes	31
2.4 Extração de DNA Genômico.....	32
2.5 Marcadores Analisados	32
2.5.1 <u>Inserção/Delecção (AT3-I/D)</u>	32
2.5.2 <u>Inserções <i>Alu</i> (SB19.3, APO e PV 92)</u>	32
2.5.3 SNP (Polimorfismo de Único Nucleotídeo)	34
2.5.3.1 <u>FY-Null</u>	34
2.5.3.2 <u>CKMM</u>.....	35
2.5.3.3 <u>LPL</u>	35
2.5.3.4 <u>GC</u>	35
2.5.3.5 <u>CYP3A4</u>	36
2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	37
2.7 Coloração com Nitrato de Prata e Secagem do Gel	40
2.8 Genotipagem dos SNP: PCR em Tempo Real	41
2.9 Análises Estatísticas.....	42

3.0 Considerações Éticas.....	43
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO (Sumarizados em 2 artigos, ainda não publicados, e com tabelas e gráficos completos adicionados aos apêndices)	44
Manuscrito 1: Estimativa de ancestralidade genômica em uma amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia e sua relação com o nível sócio-econômico e vulnerabilidade ao HIV-1/ AIDS	45
- INTRODUÇÃO	45
- MATERIAL E MÉTODOS	47
- População de Estudo	47
- Classificação Clínica dos Indivíduos	47
- Extração do DNA Genômico	48
- Marcadores Analisados	48
- Análise Laboratorial	48
- Análises Estatísticas	48
- RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
Manuscrito 2: Associação entre ancestralidade auto-referida, análise fenotípica de caracteres morfológicos e sobrenomes de conotação religiosa com a ancestralidade genômica em uma amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia	63
- INTRODUÇÃO	63
- MATERIAL E MÉTODOS	64
- População de Estudo	64
- Autodenominação por raça/ cor	65
- Análise Fenotípica	65
- Sobrenomes	65
- Estimativa de Mistura Étnica	66
- RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
5.0 CONCLUSÃO.....	74
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
APÊNDICES.....	86
ANEXOS	94

1.0 INTRODUÇÃO

Após 500 anos de miscigenação entre ameríndios, africanos e europeus, originou-se uma das populações mais heterogêneas do mundo, a população brasileira. Até 1500, segundo dados do IBGE (2000), viviam no Brasil aproximadamente 2,4 milhões de ameríndios, agregando-se, após esta data, europeus, africanos e asiáticos. Entretanto a contribuição de cada grupo étnico na formação da nossa população foi diferente, e segundo Callegari-Jacques e Salzano (1999) dos imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1972, 58% eram europeus, 40% africanos e 2% asiáticos. Além disso, a proporção sexual entre os europeus foi também muito diferenciada, sendo a contribuição quase que exclusivamente masculina. Dados históricos e genéticos mostram que a distribuição desses três grupos étnicos ao longo do território brasileiro não ocorreu de forma homogênea, ou seja, a proporção de africanos, ameríndios e europeus difere significativamente a depender da região geográfica.

1.1 Colonização da Bahia

A história do povoamento da Bahia tem duas fases distintas, a primeira iniciou-se com a chegada dos primeiros habitantes descendentes dos Mongóis na América, estimada entre 12.000 e 19.000 anos (Silva-Jr *et al.*, 1999; 2003). A segunda fase iniciou-se após o descobrimento do Brasil, em meados do século XVI, com a chegada dos portugueses e negros africanos (Azevedo, 1979).

A colonização da Bahia começou no recôncavo, uma região de solo favorável ao plantio de cana-de-açúcar que circunda a Baía de Todos os Santos (Prado, 1935). O sucesso do cultivo da cana como atividade econômica foi proporcional ao número de negros africanos que vieram trabalhar como escravos nessas lavouras baianas, fazendo com que o estado absorvesse $\frac{1}{4}$ de todos os escravos que chegaram ao Brasil (Viana Filho, 1988).

No início do século XVIII, com a descoberta de minas de ouro na Chapada Diamantina, interior do estado, muitos brancos que viviam da exploração da cana no litoral baiano foram atraídos para essa localidade, levando consigo seus escravos. A exploração das minas foi intensa e a exaustão das riquezas das mesmas levou de volta muitos brancos enriquecidos para o litoral, contudo os descendentes dos escravos (ascendência africana) permaneceram no interior dando início ao processo de

miscigenação com os povos nativos que já habitavam essa região (Azevedo *et al.*, 1987).

Posteriormente, com o desenvolvimento das lavouras de cacau e sua crescente importância econômica, muitos brancos novamente foram atraídos para o sul do estado levando muitos escravos para trabalharem neste novo atrativo. Contudo, a grande maioria de escravos permaneceu no litoral até o final da escravidão.

A geografia de mistura racial na Bahia hoje demonstra coerência com a sua história migratória, que mostra que quanto maior o afastamento do litoral, menor é a mistura com negros (Azevedo *et al.*, 1982).

As características biossociais desse contato tri-racial constituem os marcos iniciais da modelagem antropogenética da população atual. Cada um desses povos tinha língua própria, cultura, religião e valores distintos e eram frutos de suas próprias tradições, além de ter constituição genética peculiar e aspectos físicos diferentes.

Na fase inicial dos cruzamentos entre esses três grupos étnicos, não havia mulheres brancas, e assim o fluxo gênico aconteceu do homem branco para mulheres negras e índias. Posteriormente, vieram as mulheres brancas e o processo de mistura racial se propagou entre os grupos, difundindo-se por quase toda a população, e o processo de transculturação também adquiriu características próprias, formando assim, uma população baiana com uma grande mistura cultural e gênica dos povos que lhe deram origem (Azevedo, 1979).

1.2 Diversidade Genética da População

Poucos estudos têm sido desenvolvidos na Bahia com o objetivo de descrever a diversidade genética da nossa população e a contribuição de cada grupo ancestral na sua formação. Dados do IBGE de 2000 revelam que na Bahia, 77,5% da população (10.095.282 indivíduos) é composta por afro-descendentes, sendo que em Salvador 79,8% são negros ou pardos, conforme a auto-classificação de raça ou cor. Entretanto, esta estimativa é toda baseada na autodenominação étnica. Os trabalhos genéticos existentes datam da década de 80 e são todos baseados em marcadores protéicos, que devido ao baixo polimorfismo, tem um poder reduzido para quantificar esta diversidade. Diversos estudos demonstram que os melhores marcadores para fazer este tipo de avaliação são os polimorfismos moleculares, devido à sua grande diversidade. Recentemente, Abé-Sandes *et al.* (2004), analisaram amostras de quatro populações

afro-descendentes (duas populações compostas de indivíduos semi-isolados da Bahia, e duas urbanas, sendo uma de Ribeirão Preto-SP e outra de Salvador-BA); uma amostra de descendentes de europeus (Ribeirão Preto) e uma amostra de asiáticos (descendentes de japoneses, também de Ribeirão Preto). Os dados revelaram uma maior diversidade dos afro-descendentes bem como um maior grau de mistura com outros grupos étnicos. Este estudo revelou que mesmo os indivíduos fenotipicamente negros, que afirmavam não existência de mistura étnica nos quatro avós, apresentaram entre 23 - 53% de cromossomos Y de origem européia. Outro estudo demonstrou um forte direcionamento entre os tipos de casamentos, sendo mais freqüentes as uniões entre homens europeus e mulheres africanas ou ameríndias. Resultados semelhantes foram também observados em estudos realizados com populações do Sul e Sudeste (Bortolini *et al.*, 1998).

Estudos do polimorfismo Y em brasileiros brancos mostraram pequena contribuição de cromossomos Y típicos da África revelando que a maioria da patrilinhagem brasileira é de origem européia (Abé-Sandes *et al.*, 2004). Estudos do DNA mitocondrial em brasileiros brancos mostraram 33% das linhagens como sendo de origem ameríndia, 28% de origem africana e 39% européia. Quando estratificado por região do país, observou-se, como esperado, que a maioria das matrilineagens no Norte era de origem ameríndia (54%), no nordeste eram africanas (44%) e no sul as linhagens maternas eram principalmente européias (66%) (Alves-Silva *et al.*, 2000).

Outro estudo realizado em uma comunidade isolada, remanescente de quilombo, na Bahia, analisou microssatélites (STR), características fenotípicas e sobrenomes de conotação religiosa. Os resultados encontrados nestas análises para os dados moleculares foram 81% de contribuição africana e 19% de contribuição ameríndia. Para características fenotípicas, observou-se um índice de fenótipo negróide (NPI) de 0,98, um índice cultural negróide (NCI) de 0,24 (com dados de sobrenome de conotação religiosa) (Barbosa *et al.*, 2006).

Um estudo demonstrou que as características morfológicas apenas, especialmente a cor da pele, não são bons indicadores de ancestralidade africana (Parra *et al.*, 2003), sendo mais adequado o uso de marcadores biparentais (PSA - Alelos Específicos de Populações), para estimar mais fidedignamente a ancestralidade em populações miscigenadas.

1.3 PSA – Alelos Específicos de População

Sabe-se que populações bem definidas e geograficamente distintas, compartilham alelos em qualquer *locus* e que os alelos que são mais freqüentes em uma população também são encontrados em altas frequências em outras populações. Nesse contexto, a literatura mostra que a maioria (de 80% a 90%) da variação genética que ocorre entre humanos é interindividual e que somente 10% a 20% da variação total é devida à diferenças populacionais (Nei, 1987; Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Deka *et al.*, 1995).

Alguns *loci* de marcadores clássicos, tais como grupos sanguíneos, proteínas e imunológicos ou de DNA têm demonstrado ser tanto população-específicos ou possuem grandes diferenciais de frequência entre populações definidas geográfica ou etnicamente. Este alto grau de similaridade genética reflete a divergência recente da espécie humana em grupos continentais (Shriver *et al.*, 1997).

Em um estudo com 15 *loci* de marcadores clássicos, realizado por Neel, 1973 testou-se indivíduos de seis tribos indígenas diferentes, encontrou-se pelo menos 10 variantes diferentes, e os denominou como privados. Posteriormente, Chakraborty *et al.*, (1991) denominaram de “alelos únicos”, as variantes genéticas que são encontradas apenas em uma população. Em 1997, Shriver e colaboradores usaram a denominação “alelos específicos de população” (PSAs, do inglês *population-specific alleles*), para designar os marcadores genéticos que apresentam grandes diferenciais (δ) de frequência entre populações. Tanto os alelos únicos quanto os alelos específicos de populações são úteis para a investigação forense, estimativa de mistura étnica, ou estudos de mapeamento genético (Reed, 1973; Chakraborty *et al.*, 1992; Stephens *et al.*, 1994).

Os valores de (δ) médios, para *loci* bialélicos, entre os principais grupos étnicos estão entre 15-20%, sendo que a grande maioria (>95%) dos *loci* bialélicos arbitrariamente identificados possuem (δ) < 50% (Dean *et al.*, 1994). Portanto, um valor de (δ) > 50% é considerado como um “grande” diferencial de frequência, e os marcadores que apresentam esta características entre quaisquer duas populações definidas geográfica ou etnicamente são considerados como PSA.

Marcadores que apresentam grandes diferenciais entre grupos étnicos são os ideais para estimativas de mistura populacional (Parra *et al.*, 1998 e 2001). Utilizando nove *loci* PSA autossômicos (*APO*, *AT3-ID*, *GC (IS e IF)*, *FY-null*, *LPL*, *OCA2*, *RB2300* e *Sb19.3*, *ICAM*), Parra *et al.* (2003), determinou a contribuição européia, africana e

ameríndia na formação da população brasileira. Foram analisados 200 indivíduos das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, que se autodenominaram como brancos e em uma amostra composta por 173 indivíduos da comunidade rural de Queixadina (Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais), classificados fenotipicamente como brancos, negros e intermediários. Dados das populações de Portugal, da cidade de Santana (arquipélago de São Tomé) (Tomás *et al.*, 2002) e de uma amostra de 10 indivíduos de três tribos da Amazônia (Karitiana, Suruí e Ticuna) foram tomadas como representativas das frequências parentais européia, africana e ameríndia, respectivamente. Os resultados revelaram que no Brasil a cor da pele é um pobre indicador de ancestralidade genômica africana.

1.4 Sobrenome e Origem Racial

A abordagem científica ao estudo dos nomes de família para reconstruir a história cultural de um povo foi uma ferramenta importante para inferir mistura étnica e identificar a origem racial em populações miscigenadas (Tavares-Neto e Azevedo, 1977).

Mesmo em populações tri-racial como a do Nordeste do Brasil, a frequência de sobrenomes de origem africana e de origem indígena é baixa e isso sugere que além da herança, fenômenos sócio-culturais na formação da sociedade brasileira influenciaram a distribuição dos nomes de famílias entre os indivíduos.

Os estudos de nomes de famílias na Bahia identificaram três categorias de sobrenomes: de conotação religiosa, animal-planta, e outros sobrenomes, que estão associados com ancestralidade africana, indígena e européia, respectivamente (Azevedo *et al.*, 1982). Os nomes de conotação religiosa mais frequentes no Brasil não apresentam a mesma frequência em Portugal, demonstrando que esses sobrenomes foram adquiridos por batismo dos filhos de mulheres negras e índias (Tavares-Neto e Azevedo, 1977).

Uma revisão dos tipos de sobrenomes adquiridos pelos escravos nos séculos XVIII e XIX, através das análises de suas cartas de alforria, demonstrou uma alta proporção de sobrenomes de conotação religiosa diferentes dos sobrenomes dos seus “senhores feudais” (Azevedo e Fortuna, 1983).

A adoção de sobrenomes de natureza religiosa pelos negros é explicada pelas suas fortes tradições religiosas e assimilação do cristianismo dos colonizadores portugueses e

de um sincretismo entre santos católicos e deuses africanos, uma vez que eles não podiam adotar as suas próprias práticas religiosas. A adoção de sobrenomes de animal/planta pelos índios também foi resultado de aspectos culturais (Alves *et al.*, 2005).

A adoção não hereditária de sobrenomes é fato histórico reconhecido e característico dos escravos que só adquiriram um nome após a sua libertação, uma vez que quando da abolição da escravatura em 1888, 800.000 escravos foram libertos de uma única vez, e assim era imprescindível adquirir um sobrenome por razões sociais (Azevedo, 1979).

A frequência de sobrenome com conotação religiosa se eleva à medida que aumentam as proporções de mistura racial negróide, e por apresentar ainda uma maior frequência em mulheres à adoção do nome religioso, corrobora a idéia da não hereditariedade dos sobrenomes no Brasil (Azevedo, 1979).

1.5 Ancestralidade x Doenças x Status Social

Dados da literatura apontam a existência de risco diferencial no desenvolvimento de algumas doenças a depender do grupo étnico ou geográfico, e nível sócio-econômico, podendo ocorrer uma associação para algumas doenças como, por exemplo, doenças cardiovasculares, tromboembólicas, câncer de próstata, hiperhomocisteína e até mesmo doenças infecciosas. Estudos relativos à saúde da população na Bahia têm demonstrado diferenças nas prevalências entre diferentes grupos raciais e ou ambientais, apontando uma maior prevalência de algumas doenças e ou complicações mais frequentes na raça negra. Entre essas doenças destacam-se a anemia falciforme, a infecção pelo HTLV-1, hipertensão arterial, obesidade, desnutrição, entre outras. Salvador possui a maior prevalência (1,8%) de infecção pelo vírus linfotrópico das células T humanas tipo I (HTLV-1) do Brasil (Dourado *et al.*, 2003). Estudos demonstram que esse vírus é oriundo da África, e sabendo-se que grande parte da população da Bahia é afrodescendente, justifica-se essa alta prevalência (Pena, 2005).

O *status* sócio-econômico tem sido considerado, por diversos investigadores, como variável de confusão quando se pretende analisar a relação de raça e doença. Essa relação é evidenciada nos grupos minoritários pelas maiores taxas de morbidade e mortalidade, menor expectativa de vida, dificuldade de acesso a serviços de saúde, menor taxa de saneamento básico nas moradias e menor renda familiar, levando a uma

diferença substancial na incidência de certas doenças e na resposta ao seu tratamento (Witzig *et al.*, 1996).

Além do nível sócio-econômico, aspectos culturais e ambientais também são apontados como determinantes não genéticos para diferenças raciais na susceptibilidade para doenças, pois são fatores que atuam diretamente sob o modo de vida dos indivíduos, podendo modificar as respostas diante de exposições e riscos ao aparecimento de determinadas patologias (Alves *et al.*, 2005).

Vários estudos genéticos relatam diferenças nas frequências de certas doenças em relação à raça e tentam atribuir isso a uma explicação baseada em genótipo. Mas o que se sabe, é que nenhuma doença genética é restrita a determinado grupo populacional, o que varia é a sua frequência (Burchard *et al.*, 2003).

Portanto, a depender da sua constituição étnica, sócio-econômica, cultural e ambiental, uma população pode estar mais vulnerável ao desenvolvimento de certas doenças, visto que algumas delas também estão associadas à pobreza e no Brasil a pobreza é predominantemente negra. Assim, populações compostas por um contingente grande de afro-descendentes, como a Bahia, podem apresentar um risco diferencial para determinadas doenças, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

O quadro da epidemia da AIDS é de disseminação global. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2006), o número total de pessoas infectadas com HIV/AIDS é de aproximadamente 40 milhões. O número de casos novos de infecção pelo HIV em 2006 foi de 4,3 milhões, sendo que 3 milhões de pessoas morreram com AIDS (UNAIDS/WHO, 2006). No Brasil, a estimativa do número de indivíduos infectados com HIV/AIDS, até o final de 2004 foi de aproximadamente 362.364. O Nordeste do país apresenta taxa de 680.000 habitantes e tem no estado da Bahia a 2ª maior incidência de AIDS da região com 596 casos novos, com uma taxa de 440.000 habitantes. Salvador ocupa a 10ª posição entre os 100 municípios do Brasil com maior número de casos notificados (3.307 casos) (Brasil, MS 2003 e 2004).

1.6 Infecção pelo HIV-1

O HIV-1, Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1, pertence à família *Retroviridae*, pois seu material genético é constituído de duas cópias de RNA fita simples e apresenta uma enzima chamada transcriptase reversa, a qual transcreve o

RNA viral em cópias de DNA para que a informação genética viral se insira no genoma do hospedeiro (Simmonds *et al.*, 1990).

O processo de replicação do HIV-1 é muito rápido e o genoma do vírus sofre uma grande quantidade de mutações nesse processo devida à alta taxa de erro da enzima transcriptase reversa, além da própria dinâmica de produção de novas partículas. O resultado disto é o acúmulo de alterações no DNA viral que gera uma grande variabilidade genotípica e isso reflete em diferentes expressões fenotípicas que possibilitam aos vírus adquirirem resistência aos multiterápicos, dentre outras características (Simmonds *et al.*, 1990; Roberts *et al.*, 1988; Coffin, 1995).

A morfologia viral pode ser observada na Figura 1.

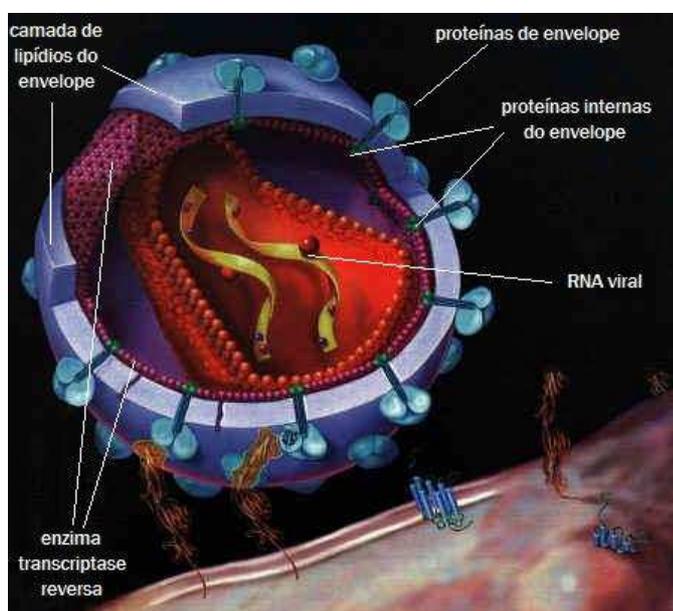


Figura 1 – Representação esquemática do HIV-1

Fonte: Adaptado de

http://eumesmo.nireblog.com/blogs/eumesmo/files/hiv_virus.jpg

O HIV-1 infecta as células do sistema imunológico que apresentam o marcador de membrana CD4⁺. As proteínas do envelope viral interagem com a molécula de CD4 para permitir a entrada do vírus na célula. Contudo, essa interação requer a presença de receptores de quimiocinas que são utilizados como co-receptores do vírus. O receptor de quimiocina utilizado pela maioria das cepas circulantes do HIV-1 é o CCR5. As cepas que usam esse co-receptor são conhecidas como macrófago trópicas (M-trópicas) ou cepas R5. Outro subtipo de cepa viral é conhecido como linfócito T trópica (T-trópica)

progressão da doença, contudo a ativação imune é um dos mais importantes fatores que determinam essas diferenças (Lindbäck *et al.*, 2000).

A ativação de células imune do hospedeiro tais como linfócitos TCD4⁺, macrófagos e células dendríticas, facilitam múltiplos passos do ciclo de vida viral e fatores celulares que são direta ou indiretamente ligados a ele. Isso inclui regulação de co-receptores virais CCR5 e CXCR4, baixa secreção de quimiocinas ligantes, intensa entrada e integração viral, bem como sua montagem e liberação das células infectadas. A ativação imune também dirige uma profunda mudança na rede de citocinas, aumentando a secreção das citocinas que participam desse ciclo celular. Além disso, a ativação imune está associada com vários graus de disfunções imune, hiporresponsividade e apoptose, todos levando a ativação da progressão para a deficiência imune e diminuição da sobrevivência (Bentwich *et al.*, 2000).

O curso clínico da infecção pelo HIV-1 é determinado por complexas interações entre as características virais e os fatores do hospedeiro (Fauci *et al.*, 1996). O tempo médio entre a infecção primária e o desenvolvimento de AIDS é de aproximadamente 10 anos, sem uso de terapia antiretroviral, e o aparecimento da síndrome de imunodeficiência, indicada pelo surgimento de infecções oportunistas, coincide com o novo aumento da replicação viral e declínio brusco das células T CD4⁺ (Fauci *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1999). Devido à heterogeneidade no curso clínico da AIDS, assim como o padrão de infecção pelo HIV-1 entre indivíduos expostos a este vírus, diversas pesquisas estão voltadas para essas questões, particularmente investigando os fatores que podem proteger os indivíduos da infecção pelo HIV-1 e/ou retardar a progressão da doença nos indivíduos infectados. Vários trabalhos têm sugerido que esse quadro resulta da variabilidade genética do HIV-1 e do hospedeiro (Liu *et al.*, 1996; De Roda Husman *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Bannwarth *et al.*, 2005).

Essas variações no hospedeiro, como mutações nos genes que codificam os receptores de quimiocinas, têm sido descritas como variações importantes para a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e na taxa de progressão para a AIDS. Dentre as variantes mais estudadas, está a deleção de 32 pares de base no gene do receptor de quimiocina CCR5 (CCR5-Δ32), que parece impedir a infecção por cepas R5 do HIV-1 quando em homozigose, ou retarda a progressão para a AIDS em indivíduos heterozigotos para essa deleção (O'Brien, 1998; Samson *et al.*, 1996). Essa mutação apresenta uma frequência de 5-15% em indivíduos caucasianos europeus e é muito baixa em africanos e asiáticos (Marmor *et al.*, 2006). Em Salvador, a frequência da

deleção foi de 2% segundo Grimaldi e colaboradores em 2002. Há ainda outras mutações no gene do CCR5 que também estão associadas à progressão da AIDS (McDermott *et al.*, 1998; Blanpain *et al.*, 2000).

Um outro receptor de quimiocina que é secundariamente utilizado como co-receptor pelo HIV-1 é o CCR2. No gene deste receptor já foi descrito um polimorfismo na posição 64 do gene (CCR2-64I), que tem sido associado com a diminuição na taxa de progressão para a AIDS por diminuir os níveis de CCR2 na superfície celular. Esta mutação apresenta variação na frequência alélica em diferentes etnias, sendo encontrada em 10% dos caucasianos europeus, 23% em africanos e 25% de asiáticos (Marmor *et al.*, 2006). Em Salvador a frequência dessa mutação foi de 14% (Acosta *et al.*, 2003).

Mutações no gene da quimiocina SDF-1, o principal ligante do co-receptor para o HIV-1, o CXCR4, também têm sido relatadas com alguma associação com a progressão para a AIDS, entre elas, a mutação SDF-1 3'A apresenta frequências de 21% em europeus, 2% em africanos e 26% em asiáticos. Além desses, polimorfismos do HLA e em genes de citocinas que são mediadores essenciais na resposta imunológica às infecções, têm sido relatados como associados à progressão para a AIDS. Tais variações foram observadas tanto em indivíduos expostos à infecção pelo HIV-1, mas que se mantiveram livres da infecção como também em indivíduos infectados pelo HIV-1 que não desenvolveram a AIDS (Marmor *et al.*, 2006).

1.7 JUSTIFICATIVA

A população da Bahia e da cidade de Salvador apresenta um contingente considerável de afro-descendentes (77,5% e 79,8%, respectivamente) segundo dados do IBGE. Estas percentagens são baseadas na autodenominação de raça/cor da população. Entretanto um estudo genético demonstrou que a cor da pele não é um bom indicador de ancestralidade genômica (Parra *et al.*, 2003).

Sabe-se que algumas doenças são mais prevalentes em determinados grupos étnicos ou populações geográficas e ainda que algumas delas estão relacionadas à pobreza e que esta é predominantemente negra.

Sabe-se que o curso clínico da infecção pelo HIV-1 é delineado por interações entre fatores virais e do hospedeiro. Esses fatores genéticos do hospedeiro apresentam frequências diferentes dentro dos diversos grupos étnicos, podendo a associação desses alelos com a infecção pelo HIV-1 diferir dependendo da ancestralidade da população estudada. Estudar a influência desses fatores na infecção pelo HIV-1 é de fundamental importância para a elaboração de novas formas terapêuticas e profiláticas para o tratamento da AIDS.

O conhecimento da contribuição de cada população ancestral (africana, européia e ameríndia) na formação da nossa população será importante, por exemplo, nos estudos de associação caso/controle, permitindo avaliar se as diferenças nas frequências alélicas observadas se devem a uma relação causal ou estruturação populacional.

De posse dessas informações, é de fundamental importância a caracterização da contribuição de cada grupo étnico na nossa população, baseada não apenas nas características fenotípicas, mas também em marcadores genéticos. Esta caracterização será importante para avaliar o risco populacional para determinadas doenças a que estamos submetidos.

No presente estudo, estimamos biologicamente, a proporção de ancestralidade africana, européia e ameríndia nos portadores de HIV-1, observando se estas diferem na população não infectada pelo HIV-1, quando comparada com a população de Salvador. A determinação genética do grau de ancestralidade de uma população é muito importante não apenas para estimar o risco populacional para determinadas doenças, bem como fornecer subsídios para definição de políticas públicas de saúde, com o objetivo de melhor atender as populações com características étnicas distintas.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Geral

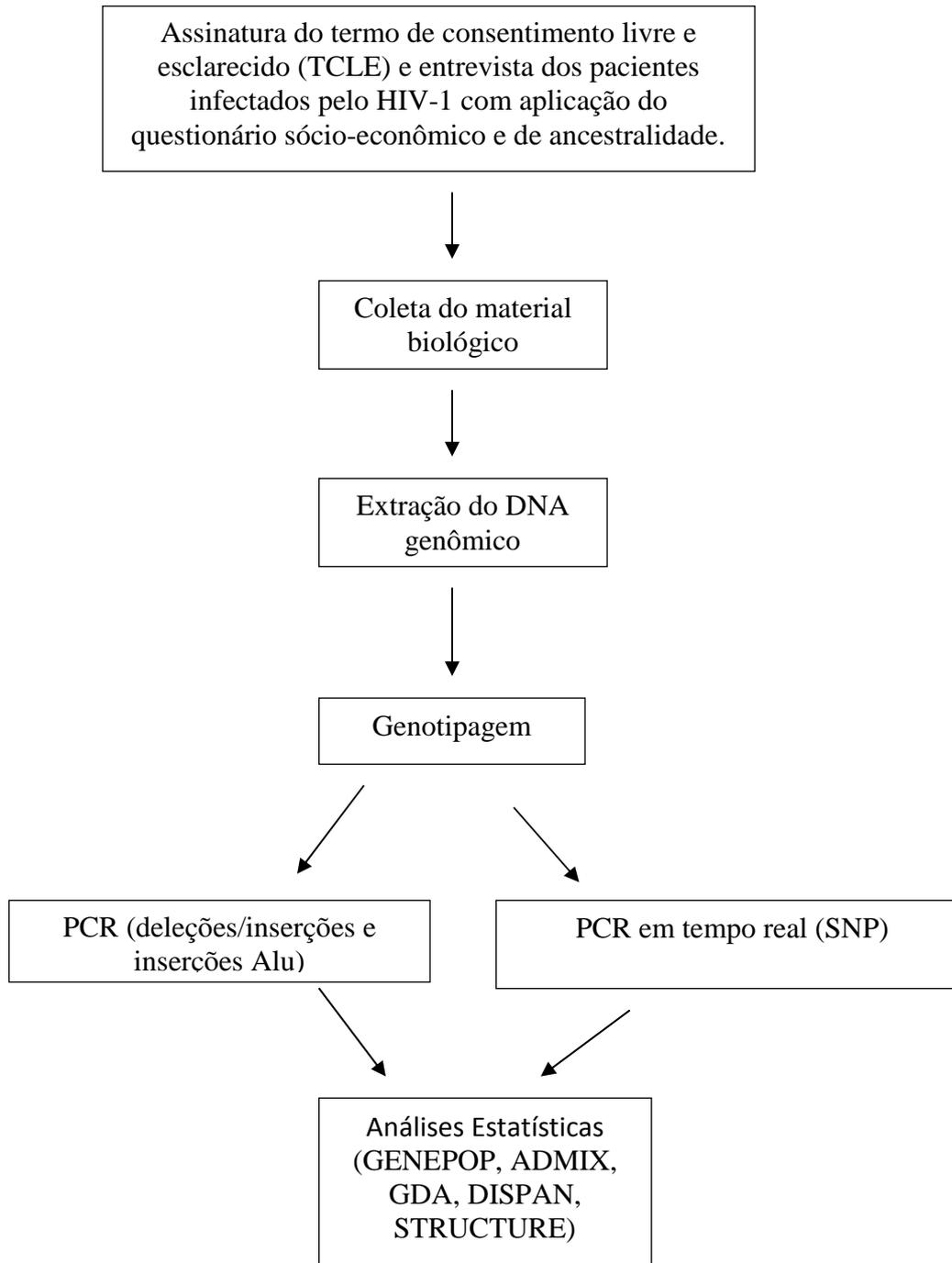
Estimar biologicamente a proporção de ancestralidade africana, europeia e ameríndia em uma amostra de portadores de HIV-1 do estado da Bahia, observando se estes diferem de população não infectada pelo HIV-1 de Salvador-BA.

1.8.2 Específicos

- Estimar a ancestralidade genômica numa amostra de portadores do HIV-1;
- Comparar as frequências dos polimorfismos (PSA) observadas em indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia com as frequências nas populações ancestrais: africanas, europeias e ameríndias, e entre indivíduos não infectados pelo HIV-1 de Salvador-BA;
- Verificar a existência de associação entre maior percentagem de marcadores africanos e portadores do HIV-1, quando comparado com não portadores;
- Verificar se existe concordância entre a autodenominação, análise fenotípica (negros, mulatos, brancos e índios) e os percentuais de marcadores africanos, europeus e ameríndios;
- Verificar a associação entre sobrenomes e a ancestralidade nos indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia;
- Analisar marcadores de susceptibilidade ao HIV/AIDS nos indivíduos infectados pelo HIV-1
- Contribuir para programas de saúde pública em AIDS.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fluxograma



2.2 Amostras

2.2.1 – Indivíduos infectados pelo HIV-1

Neste estudo foram analisadas amostras de 517 indivíduos infectados pelo HIV-1, os quais realizaram exames periódicos no Laboratório de Retrovírus do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), no período entre julho a novembro de 2006. Por este ser um laboratório de referência na realização de exames para acompanhamento desta infecção, foram coletadas amostras de pacientes oriundos de diversos locais de atendimento médico, tais como CREAIDS (Centro de Referência Estadual de AIDS), HUPES, Hospital Roberto Santos e consultórios particulares, dentre outros, para realização de exames de contagem de células TCD4 e TCD8, carga viral e genotipagem viral. Portanto, as amostras coletadas para este estudo abrangeram de uma maneira geral a população infectada por este vírus no estado da Bahia.

A inclusão dos indivíduos neste estudo foi feita mediante a explicação da pesquisa, após o conhecimento da natureza do estudo, aqueles pacientes que concordavam em participar, assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e eram entrevistados para coleta de dados sócio-econômicos e de ancestralidade (TCLE e Questionário, vide apêndice). Neste questionário, os pacientes se autodenominavam (dentre as seguintes opções) como: negro, mulato/ moreno, branco ou outro. Após a auto-classificação, era realizada a caracterização fenotípica dos indivíduos levando em consideração as seguintes características:

- Cor da pele: branca, marrom ou preta.
- Textura de cabelo: liso, ondulado ou crespo.
- Nariz – base: achatada, média ou elevada.
- Nariz – corpo: largo, médio ou fino.
- Formato dos lábios: finos, médios ou grossos.

E ainda eram observados os caracteres secundários:

- Cor do Cabelo: loiro, castanho, ruivo ou preto.
- Cor dos Olhos: claro ou escuro.

De acordo com esses critérios, os indivíduos de pele branca, cabelo liso ou ondulado, nariz proeminente, arrebicado ou mediano, lábios finos ou medianos, independente da cor do cabelo ou pigmentação dos olhos, foram classificados como brancos. Os indivíduos de pele preta, cabelo crespo, olhos pretos e lábios grossos foram

classificados como negros. Os demais participantes foram classificados como mulatos em 3 categorias a depender da quantidade de características compartilhadas (mulatos claros, mulatos médio, mulatos escuros) (Azevedo *et al.*, 1982).

Além disso, os indivíduos eram questionados sobre seus antecedentes até a 3ª geração, perguntados sobre a existência de mistura com europeus, africanos e/ou ameríndios nos avós maternos e paternos. Quando os avós não eram conhecidos, investigavam-se os pais.

A classificação clínica em relação à infecção pelo HIV-1, foi feita a partir da coleta de dados nos prontuários médicos, através das informações quanto à evolução da infecção observando as contagens da carga viral e células TCD4⁺, a ocorrência de infecções oportunistas, o uso de terapia anti-retroviral. Com esses dados determinou-se o estadiamento clínico dos pacientes de acordo com o curso da infecção, utilizando os seguintes critérios: O intervalo entre o diagnóstico e o início do tratamento com anti-retrovirais (Hendel *et al.*, 1998; Mazzucchelli *et al.*, 2001; Magierowska *et al.*, 1999). A característica mais marcante foi a contagem de células CD4⁺ no intervalo do diagnóstico ao início da terapia. Os indivíduos que não se encaixaram nesses critérios foram tidos como ignorados.

Considerando todas as informações, os pacientes foram classificados em três grupos:

- Lento Progressor (LP) – CD4 > 500 cels/mm³ e com + de 8 anos de infecção sem tratamento.
- Típico Progressor (TP) – 500 < CD4 < 200 cels/mm³
- Rápido Progressor (RP) – CD4 < 200 cels/mm³ em até 3 anos de infecção ou óbito em até 5 anos após a infecção.

2.2.2 - População de Salvador

As amostras da população de Salvador, utilizadas neste trabalho como grupo controle não infectado pelo HIV-1, são provenientes da base de dados de um projeto de saneamento básico – Bahia Azul, que estimou a prevalência e incidência de marcadores sorológicos para agentes infecciosos entre residentes de distintos espaços intra-urbanos chamados de “áreas sentinelas”. O esquema amostral foi descrito com detalhes por Teixeira *et al.*, 2002 e as análises dos marcadores de ancestralidade realizadas no trabalho de Machado, 2008 (Comunicação Pessoal).

2.2.3 – Populações Parentais

As amostras utilizadas como parentais foram analisadas na Universidade da Pensilvânia, USA e os resultados cedidos gentilmente por Mark D. Shiver (Comunicação Pessoal).

2.3 Análise de sobrenomes

Os sobrenomes dos indivíduos estudados foram analisados para se identificar entre a quantidade de sobrenomes diferentes encontrados nesses indivíduos, quantos eram de conotação religiosa e, dentre estes, quais tinham maior incidência nessa população e, dessa forma, relacionar tais sobrenomes com a origem africana, de acordo com a classificação fenotípica desses indivíduos. No Quadro I, estão dispostos os sobrenomes de conotação religiosa mais frequentes na Bahia (Tavares-Neto e Azevedo, 1977).

Sobrenomes				
Aflitos	Bispo	Evangelista	Piedade	Santa Rita
Ajuda	Boa Morte	Hora	Prazeres	Santiago
Amor Divino	Bomfim	Jesus	Purificação	Santos
Amparo	Cardeal	Luz	Ramos	São Pedro
Anjos	Carmo	Mercês	Reis	Socorro
Anunciação	Chagas	Natividade	Ressurreição	Soledade
Arcanjo	Conceição	Nascimento	Rosário	Trindade
Assis	Cruz	Paixão	Sacramento	Virgem
Assunção	Encarnação	Palma	Santana	Virgens
Batista	Espírito Santo	Passos	Sant'Anna	Xavier

Quadro I – Sobrenomes de conotação religiosa mais frequentes na Bahia, segundo Tavares-Neto e Azevedo, 1977.

2.4 Extração do DNA Genômico

Foram coletados 6mL de sangue em tubo *vacuntainer* (Labnew Ltda. SP – BRA) e o DNA foi extraído a partir desse material biológico pela técnica de extração salina (Lahiri *et al.*, 1991).

2.5 Marcadores Analisados

No presente estudo foram analisados 10 marcadores de ancestralidade, sendo um polimorfismo de inserção/deleção - *AT3-I/D*, três inserções *Alu* - *SB19.3*, *APO* e *PV92*, 6 *SNP* – *FYnull*, *CKMM*, *LPL*, *GC-1F*, *GC-1S* e *CYP3A4* e 2 marcadores de susceptibilidade ao HIV/AIDS – *CCR5Δ* - 32 e *CCR2* - 64I. Os diferentes alelos encontrados nos marcadores de ancestralidade são denominados de alelo*1 e alelo*2. Nos polimorfismos do tipo *indel* e nas inserções *alu*, o alelo *1 é caracterizado pela presença da inserção. Nos *SNP*, o alelo*1 é aquele cujo nucleotídeo abole o sítio de restrição.

2.5.1 Inserção/ Deleção – AT3

A antitrombina III (*AT3*) é um membro da família dos inibidores da serina, e se caracteriza por ser uma pequena molécula que inativa irreversivelmente várias enzimas da coagulação, tais como os fatores IXa, Xa, XIIa, sendo um inibidor da coagulação, neutralizando a trombina. É uma glicoproteína formada por uma cadeia de 432 aminoácidos, com um peso molecular de 58 kDa (kilodaltons) produzida no fígado. O gene da *AT3* localiza-se no cromossomo 1 (1q25.1), possui 19kb e sete éxons (Liu *et al.*, 1995). Neste estudo foi analisado o polimorfismo de comprimento de 76bp (inserção/deleção) na região 5' do éxon 1 (Liu *et al.*, 1995). A presença desta inserção gera um fragmento de 572bp e caracteriza o alelo *AT3-I/D*1*. Este polimorfismo é útil em análises de populações híbridas por apresentar uma frequência da inserção de 0,858 em populações africanas, diferenciando assim, africanos de europeus e africanos de nativo-americanos.

2.5.2 Inserções Alu

Inserções *Alu* são assim chamadas por terem sido inicialmente descritas como uma fração repetitiva de DNA que exibia um sítio de restrição para a enzima *Alu*. Estas inserções são pequenos elementos repetitivos intercalantes (do inglês *SINE - short interspersed repetitive elements*), possuem aproximadamente 300pb e são encontrados exclusivamente em primatas (Watkins *et al.*, 2001). Elas são originadas por transcrição reversa de um RNA intermediário (7 SL RNA) em um processo denominado retrotransposição e inseridos em diversas partes do genoma por retroinserção. Todas as inserções em um *locus* são idênticas por descendentes, devido à improbabilidade do fenômeno de inserção ocorrer duas vezes no mesmo *locus* (Batzer e Deininger, 1991).

De acordo com a série hierárquica temporal da mutação, os elementos *Alu* foram agrupados em 3 famílias principais designadas como J, S e Y, representando a mais antiga, a intermediária e a mais recente família *Alu* respectivamente. Essas famílias foram ainda divididas em sub-famílias específicas de acordo com a identidade nucleotídica entre elas (Batzer *et al.*, 1990; 1996). São estimados que aproximadamente 5000 elementos *Alu* jovens sejam específicos de humanos (Batzer e Deininger, 1991). Isso indica que o estado ancestral desses polimorfismos é a ausência da inserção no genoma humano e que o estado derivado da mesma é o ganho do fragmento *Alu* em um *locus* específico.

Devido as inserções *Alu* serem idênticas por descendentes, livres de homoplasia e por serem capazes de informar o estado ancestral da mutação, esses polimorfismos são bastante úteis em estudo de mapeamento genético e de relações entre populações, e estudos mostram que eles apresentam grandes diferenças na distribuição das frequências alélicas em populações de distintas origens geográficas (Cotrim, 2003), sugerindo que essas inserções são excelentes marcadores raciais e podem ser utilizadas para estimar composição étnica em populações miscigenadas como a do Brasil (Mendes-Junior *et al.*, 2001).

As inserções *Alu* analisadas nesse estudo são mutações que não determinam fenótipo alterado por estarem localizadas próximas, e não dentro de genes funcionais, e não causam doença, apresentando assim frequências polimórficas entre as populações. Uma inserção estudada foi a Sb19.3, pertencente a subfamília Yb8 e que está localizada no cromossomo 19p12 (Arcot *et al.*, 1998). A presença dessa inserção *Alu* gera um fragmento de aproximadamente 457pb e caracteriza o alelo *Sb19.3*1*. Outra inserção analisada foi a APO, que está próxima ao complexo de genes da apolipoproteína AI-CIII-AIV no braço longo do cromossomo 11 (Karathanasis, 1985). A presença dessa inserção *Alu* gera um fragmento de aproximadamente 409pb e caracteriza o alelo APO*1. E por fim, foi estudada a *Alu* PV-92, que se localiza no cromossomo 16 (Batzer *et al.*, 1994) e a presença dessa inserção gera um fragmento de aproximadamente 400pb e caracteriza o alelo PV92*1. Essas informações estão sumarizadas no Quadro II.

2.5.3 SNP (Polimorfismos de Único Nucleotídeo)

Analisou-se seis polimorfismos de único nucleotídeo – SNP (do inglês Single Nucleotide Polymorphisms) nos *loci* *FY-Null*, *LPL*, *CKMM*, *CG-F*, *CG-S* e

CYP3A4. Esses polimorfismos ocorrem em regiões não codificadoras e são, portanto, menos afetados por processos de seleção natural refletindo com mais acurácia a história evolutiva humana (Alves *et al.*, 2005).

2.5.3.1 FYnull

O gene DARC (do inglês, *Duffy antigen receptor for chemokines*) é composto por um único éxon e uma única substituição (T>46C) na região promotora do gene cria um alelo FY*B silencioso, também chamado nulo (*FYnull*) ou FY*O. Esta mutação confere resistência à malária *vivax* por silenciar a expressão do RNAm, visto que o antígeno do grupo sanguíneo Duffy funciona como receptor eritrocitário para o parasita da malária *Plasmodium vivax* (Tournamille *et al.*, 1995). O sistema de Duffy foi o primeiro grupo sanguíneo a ter o *locus* genético atribuído ao cromossomo autossômico específico, o cromossomo 1 (Donahue *et al.*, 1968). Os antígenos de Duffy parecem ser proteínas multiméricas da membrana de eritrócitos compostas por diferentes subunidades. Uma glicoproteína de 35 a 45 kD nomeada GPD é a subunidade principal da proteína complexa e tem as determinantes antigênicas definidas por anti-Fy (a), anti-Fy (b), e os anticorpos anti-Fy6 (Hadley *et al.*, 1984). Em africanos, o fenótipo dominante é o Fy (a-b-), no qual os eritrócitos não possuem os antígenos Fya e Fyb e resistem à invasão pelo *Plasmodium vivax*, sugerindo uma resposta adaptativa para resistência à malária (Tournamille *et al.*, 1995).

Neste trabalho, estudamos a transição de uma adenina (A) para uma guanina (G) na posição -46 da região promotora deste gene. A população européia e nativa americana apresenta uma alta frequência do alelo A, que é o alelo*1, enquanto que os africanos apresentam apenas o alelo G, alelo*2.

2.5.3.2 CKMM

A proteína denominada creatina cinase existe como enzima dímica, uma enzima encontrada no músculo formada por 2 subunidades idênticas M (MM) e outra enzima encontrada no cérebro formada por duas subunidades idênticas de B (BB) (Dawson *et al.*, 1968). Outros tecidos mostram ainda a forma híbrida desta enzima (CKMB). A isozima dimérica creatina cinase está envolvida na manutenção dos níveis intracelular de ATP, particularmente em tecidos que têm uma alta demanda de energia. A isozima MM é encontrada exclusivamente em músculos estriados, enquanto que a

isozima BB encontra-se no cérebro, nervos e músculos liso. A enzima híbrida é encontrada no músculo cardíaco.

O gene da creatina cinase está localizado no cromossomo 19, sendo estudado o polimorfismo caracterizado por uma transição de uma citosina (C) por uma timina (T), no éxon 8 foi analisado no presente estudo. O alelo C é o prevalente nas populações européias e africanas, e o alelo T, alelo*1, o mais freqüente em asiáticos.

2.5.3.3 LPL

A lipoproteína lípase – LPL (do inglês *lipoprotein lipase*) é uma enzima catalítica que participa do metabolismo de triglicérides através do catabolismo de partículas lipoprotéicas ricas em triglicérides, tais como quilomícrons e VLDL (do inglês, *very low density lipoproteins*) (Stepanov & Lemza, 1993). O gene da LPL, localizado no cromossomo 8, contém 10 éxons num tamanho de 30kb. Muitas alterações têm sido descritas neste gene, associadas a diversas manifestações clínicas (Funke *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1988). Para estudo, neste trabalho analisou-se uma variante no *locus* do gene LPL, que se caracteriza por uma transição de uma timina (T) por uma citosina (C) no intron 6 do gene. Os dois alelos apresentam frequências diferenciadas em populações, sendo o alelo T, alelo*1, mais freqüente em africanos, enquanto que o alelo C é mais freqüente em ameríndios.

2.5.3.4 GC-1F e GC-1S

Estes são dois polimorfismos encontrados no gene da proteína denominada globulina ligadora de vitamina D – VDBG (do inglês *vitamin D-binding alpha-globulin*) (Daiger *et al.*, 1975). Este gene está localizado no cromossomo 4, possui 13 éxons e 3 polimorfismos já foram descritos neste gene, *GC-1F*, *GC-1S*, *GC-2*, sendo o *GC-1F* e o *GC-1S* analisados neste trabalho (Witke *et al.*, 1993).

Estes polimorfismos são encontrados nas posições 34 e 45 da seqüência gênica e a combinação dos genótipos nessas duas posições são responsáveis pela caracterização do SNP GC. As combinações T/T, na posição 34 do gene e C/C na posição 45 determina o alelo GC-1F; o alelo GC-1S é caracterizado pela combinação G/G na posição 34 e C/C na posição 45; a combinação T/T na posição 34 e A/A na posição 45, caracteriza o alelo GC-2. As combinações de heterozigotos são - F/S - T/G (posição 34) e C/C (posição 45); F/2 – T/T (posição 34) e C/A (posição 45); S/2 – T/G

(posição 34) e C/A (posição 45). O alelo GC-F apresenta uma maior frequência em africanos, enquanto que o GC-S é mais freqüente em europeus.

2.5.3.5 CYP3A4

O citocromo P450 3A4 é responsável pelo metabolismo oxidativo de uma grande variedade de xenobióticos, incluindo 60% de todas as drogas clinicamente utilizadas (Lehmann *et al.*, 1998). Esta proteína se expressa predominantemente no fígado e é transcricionalmente ativada por diversas estruturas xenoquímicas (Wrighton & Stevens, 1992). Estudamos o polimorfismo caracterizado por uma transição de uma adenina (A) por uma guanina (G). O alelo A, alelo*1, é mais freqüente em europeus e asiáticos, enquanto que o alelo G apresenta uma alta frequência em africanos.

<i>Loci</i>	Polimorfismo	Localização	População com maior frequência do Alelo*1
<i>AT3-I/D</i>	76pb <i>indel</i>	1q25.1	Africana
<i>LPL</i>	T/C	8p21.3	Africana
<i>GC-IF</i>	G/T	4q13.3	Africana
<i>APO</i>	Inserção <i>Alu</i>	11q23.3	Européia
<i>Sb19.3</i>	Inserção <i>Alu</i>	19p12	Européia
<i>FYnull</i>	A/G	1q23.2	Européia
<i>GC-IS</i>	C/A	4q13.3	Européia
<i>PV92</i>	Inserção <i>Alu</i>	16q23.3	Ameríndia
<i>CKMM</i>	C/T	19q13.32	Ameríndia
<i>CYP3A4</i>	A/G	7q22.1	Ameríndia

Quadro II: *Loci*, tipo de polimorfismo analisado, localização cromossômica e população onde o alelo *1 é mais freqüente.

2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O polimorfismo de inserção/deleção, as inserções *Alu* (*AT3-I/D* e *Sb19.3*, *APO* e *PV92*, respectivamente) e a mutação *CCR5* - Δ 32 foram genotipados por PCR utilizando os *primers* e condições da PCR descritas na literatura (Shriver *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1998). As amplificações foram realizadas em termocicladores e sob as

seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 6 minutos e temperatura de pareamento específica para cada par de primer (T.A.) por 2 minutos; 35 ciclos para extensão das fitas constituídos por 1 minuto a 72°C, 30 segundos a 94°C e temperatura de pareamento, por 1 minuto; finalizando a PCR com 1 ciclo final de 72°C e resfriamento a 4°C. As temperaturas de pareamento e os *primers* para cada *loci* estão sumarizados no Quadro III. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2%, e em gel de poliacrilamida a 6% corados com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta ou corados com nitrato de prata.

As reações da PCR foram feitas em um volume total de 25µl, composto por: 100 ng de DNA, 10 mM tris-HCl pH 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ 0,01%, 200 mM de cada dNTP, 0,25 mM de cada *primer*, e 1U de *Taq* DNA polimerase.

<i>Locus</i>	Seqüência dos <i>primers</i>	T.P.
<i>AT3</i>	5'-CCACAGGTGTAACATTGTGT-3' 5'-GAGATAGTGTGATCTGAGGC-3'	54°C
<i>APO</i>	5'-AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG-3' 5'-AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA-3'	66°C
<i>SB 19.3</i>	5'-TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG-3' 5'-AAGCACAATTGGTTATTTTCTGAC-3'	63°C
<i>PV 92</i>	5'-AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT-3' 5'-TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG-3'	56°C
<i>CCR5</i>	5'-ACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT-3' 5'-CATGATGGTGAAGATAAGCCTCACA-3'	54°C

Quadro III – Seqüência de *primers* e temperatura de pareamento (T.P.) para cada *Loci* analisado.

Os fragmentos amplificados para cada *loci* podem ser visualizados nas Figuras abaixo:

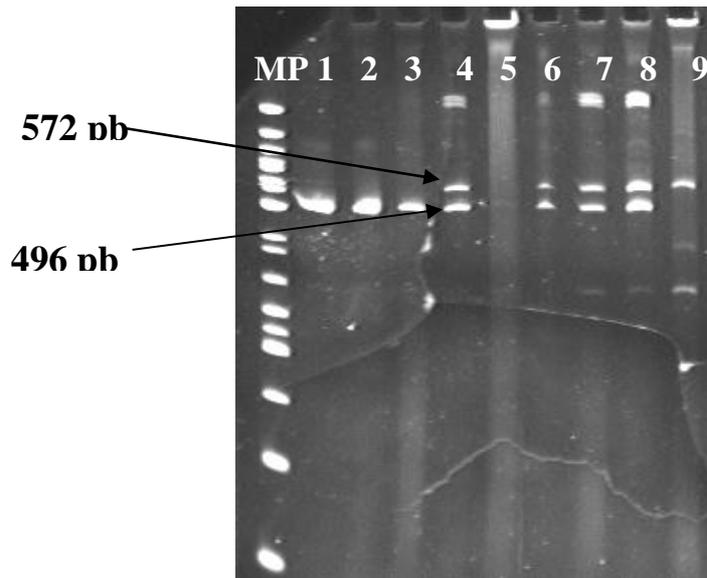


Figura 3 – Visualização dos fragmentos amplificados para o locus *AT3*. Gel de poliacrilamida a 6% corado com brometo de etídio. MP – marcador de peso molecular de 50pb; Amostras 1, 2 e 3 – Homozigotos para a ausência da inserção (A/A); Amostras 4, 6, 7, 8 – Heterozigotos (P/A); Amostra 9 – Homozigoto para a presença da inserção (P/P).

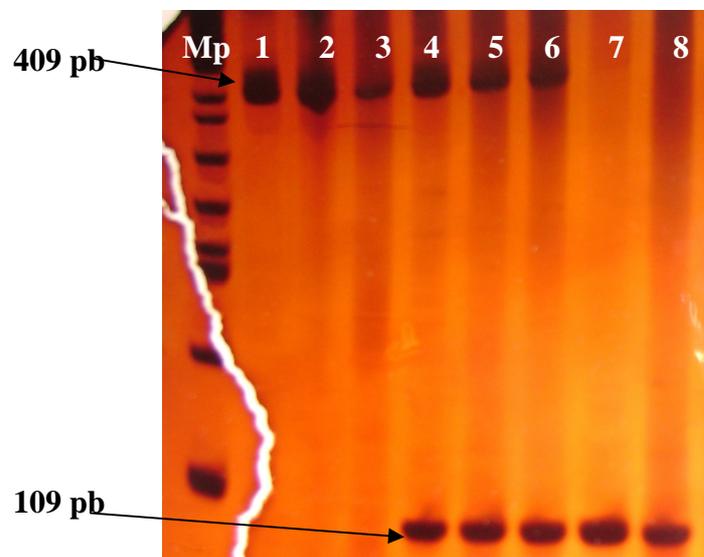


Figura 4 - Visualização dos fragmentos amplificados para o locus *APO*. Gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata. MP – marcador de peso molecular de 50pb. Amostras 1, 2 e 3 - Homozigotos para a presença da inserção (P/P); amostras 4, 5 e 6 – Heterozigotos (P/A); amostra 7, 8 e 9 – Homozigoto para a ausência da inserção (A/A).

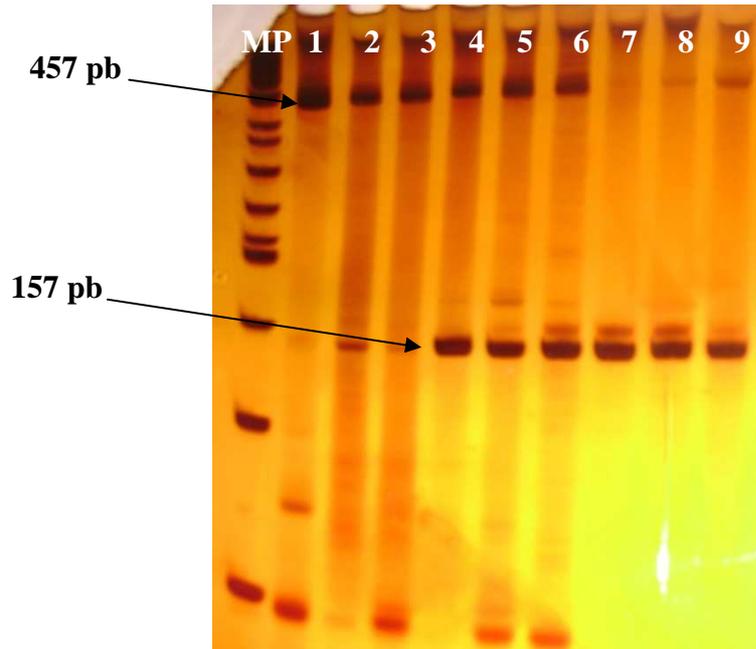


Figura 5 - Visualização dos fragmentos amplificados para o *locus Sb19.3*. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. MP – marcador de peso molecular de 50pb; Amostras 1, 2 e 3 - Homozigotos para a presença da inserção (P/P); Amostra 4, 5 e 6 - Heterozigotos (P/A); Amostras 7, 8 e 9 – Homozigotos para a ausência da inserção (A/A)

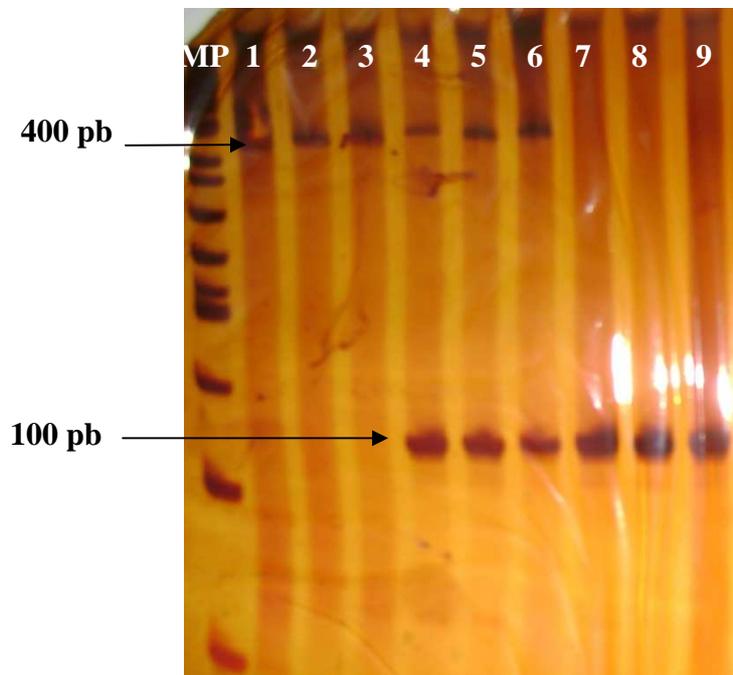


Figura 6 - Visualização dos fragmentos amplificados para o *locus PV 92*. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. MP – Marcador de peso molecular de 50pb; Amostras 1, 2 e 3 - Homozigotos para a presença da inserção (P/P); Amostra 4, 5 e 6 - Heterozigoto (P/A); Amostras 7, 8 e 9 – Homozigotos para a ausência da inserção (A/A).

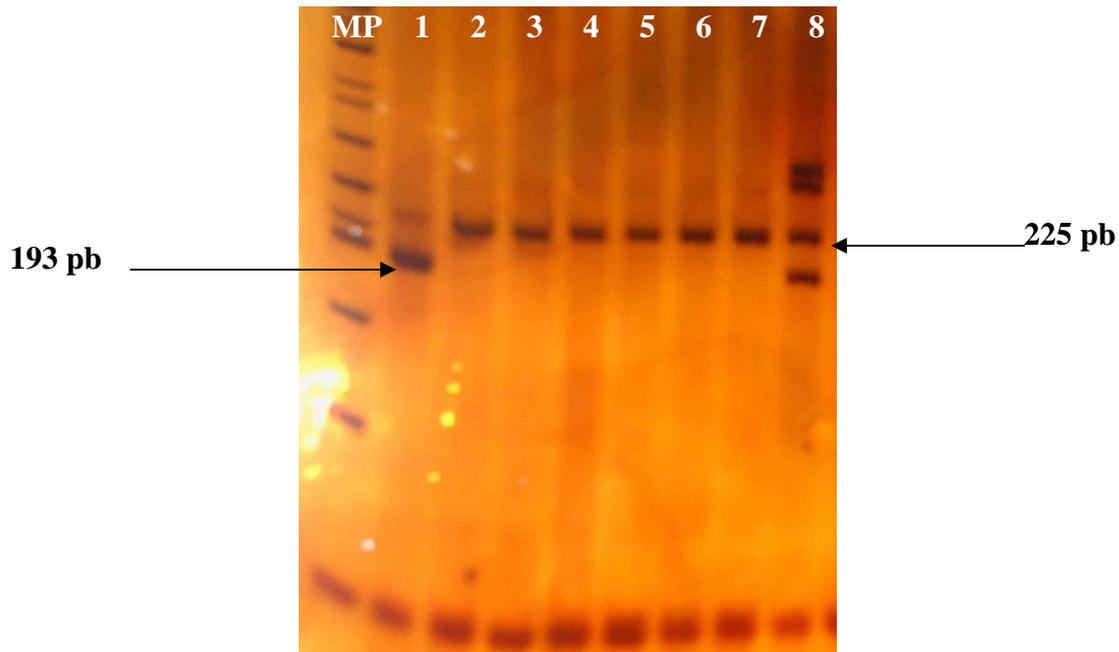


Figura 7 – Visualização dos fragmentos amplificados no *locus* CCR5. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. MP – marcador de peso molecular. Amostra 1 – $\Delta 32/\Delta 32$; amostras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 – CCR5 wt/wt e a amostra 8 – Heterozigoto wt/ $\Delta 32$.

2.7 Coloração com Nitrato de Prata e Secagem do Gel

A coloração com nitrato de prata foi feita com 3 diferentes soluções em 3 etapas: impregnação com nitrato de prata, revelação e fixação das bandas visualizadas. As soluções usadas equivalentes à coloração de 1 gel foram:

Solução de nitrato de prata: 0,3 g nitrato de prata; 2 ml de H₂O. A solução foi preparada dissolvendo a prata em uma parte da água, após completando com o restante e depois foi mantida ao abrigo da luz (volume final 2 ml).

Solução fixadora: 25 ml etanol (PA) e 2 ml de ácido acético glacial (PA) dissolvidos em 273 ml de H₂O (volume final 300ml).

Solução reveladora: 4,5 g de NaOH; 200 ml de H₂O. A solução foi preparada dissolvendo em um agitador o hidróxido de sódio em uma parte da água e depois completado com o restante (volume final 200 ml). No momento da coloração foi adicionado 1 ml de formaldeído para cada 200 ml de solução.

A coloração do gel foi feita de acordo com protocolo adaptado de Sanguinetti *et al.* (1994):

Fixação: Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 150 ml de solução fixadora.

Impregnação com Nitrato de Prata: Adicionou-se 2,0 ml de solução de nitrato de prata, e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água destilada por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água.

Revelação: A solução reveladora foi adicionada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, e logo após foi adicionado o formaldeído. O gel foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente.

Bloqueio da reação: Após as bandas terem sido reveladas, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a adição de 150 ml de solução fixadora.

Secagem do gel: Após a leitura, todos os géis passaram por um simples processo de secagem para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram molhadas; uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas; o gel foi colocado sobre a placa com o celofane sem deixar bolhas; o gel foi então bem molhado e coberto com a outra folha de celofane, também com cuidado de não deixar bolhas; este gel foi deixado secando à temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então devidamente identificado e arquivado.

2.8 Genotipagem dos SNP: PCR em Tempo Real

A técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real foi utilizada para genotipar os polimorfismos de nucleotídeos simples – SNP nos *loci* FY-Null, LPL, CKMM, CG-F, CG-S e CYP3A4. Esta técnica baseia-se no uso de uma sonda fluorescente, com seqüências específicas para cada alelo (uma sonda para o alelo mutante e outra para o alelo selvagem), onde cada sonda está marcada com um fluoróforo diferente. Cada sonda hibridizará com a seqüência alvo gerando sinal fluorescente proporcional à concentração dos produtos amplificados, permitindo assim, correlacionar a intensidade de sinal coletada com a quantidade de produto amplificado. O sistema utilizado para realização dessa reação foi o TaqManTM da *Applied Biosystems* do Brasil. Nesse sistema, a sonda se hibridiza na região complementar do DNA alvo que está localizada entre os sítios de ligação dos *primers*. Cada sonda é marcada com um fluoróforo diferente chamado *reporter* (R) na extremidade 5'. Na extremidade 3'

existe outro fluoróforo chamado *quencher* (Q) cuja função é absorver a emissão de fluorescência do *reporter*, quando a sonda se encontra intacta. Durante a reação de PCR ocorre a hibridização dos *primers* e da sonda, no fragmento de DNA, e, durante a extensão dos *primers*, a enzima, *Taq* DNA polimerase por sua atividade 5'-3' exonuclease irá também clivar a sonda a partir da extremidade 5'. Desta forma, a fluorescência emitida pelo *reporter* pode ser detectada e sua intensidade aumentará em função do número de cópias que estão sendo amplificadas. Após a termociclagem como num PCR convencional é feita a discriminação alélica, onde se quantifica a intensidade de cada fluoróforo, correspondendo a um determinado alelo. Os genótipos selvagem ou mutante emitirão fluorescência correspondente a cada alelo marcado. Se ambos os alelos apresentarem fluorescência teremos um genótipo heterozigoto.

2.9 Análises Estatísticas

As frequências alélicas, a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e a análise de associações par-a-par entre *loci* foram realizadas pelo programa GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995).

As estimativas de mistura étnica foram realizadas a partir do programa ADMIX (Chakraborty *et al.*, 1985) utilizando frequências de populações ancestrais ameríndias, européias e africanas disponíveis na literatura.

A partir das frequências alélicas e genotípicas dos *loci* analisados foram estimados, respectivamente, os valores de heterozigose média (H_S) pelo programa DISPAN (Ota *et al.*, 1993) e as Estatísticas F pelo programa GDA (Lewis e Zaykin, 1997).

O cálculo de distâncias genéticas relacionando a população da Bahia com outras populações já examinadas para estes *loci* foi realizado pelo programa DISPAN (Ota *et al.*, 1993).

O programa *Structure*, disponível no endereço eletrônico (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>) que utiliza um método de agrupamento, baseado no modelo desenvolvido por Pritchard *et al.*, 2000, foi utilizado para a inferência de estrutura populacional utilizando dados genotípicos de marcadores não ligados.

3.0 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

No momento da coleta do material biológico, todos os indivíduos que compuseram a amostra de trabalho assinaram o TCLE, fazendo parte do estudo de marcadores genéticos de susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e desenvolvimento de AIDS, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ (Parecer nº. 84/2006 – CEP/ CPqGM/ FIOCRUZ).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

(Os resultados e discussão estão sumarizados em 2 manuscritos, e os resultados complementares são apresentados em tabelas e gráficos complementares adicionados aos apêndices)

Manuscrito 1

Estimativa de ancestralidade genômica em uma amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia e a sua relação com nível sócio-econômico e vulnerabilidade ao HIV-1/ AIDS.

Bomfim, T.F.¹, Machado, T.M.B.¹, Acosta, A.X.^{1,2}; Brites, C.²; Galvão-Castro, B.^{1,3}, Abé-Sandes, K.^{1,4}.

1- Laboratório Avançado de Saúde Pública/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 2- Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (UFBA), 3- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/Fundação Baiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), 4- Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

INTRODUÇÃO

Após 500 anos de miscigenação entre ameríndios, africanos e europeus, originou-se uma das populações mais heterogêneas do mundo, a população brasileira. Até 1500, segundo dados do IBGE (2000), viviam no Brasil aproximadamente 2,4 milhões de ameríndios, agregando-se, após esta data, europeus, africanos e asiáticos. Entretanto a contribuição de cada grupo étnico na formação da nossa população foi diferente, e segundo Callegari-Jacques e Salzano (1999) dos imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1972, 58% eram europeus, 40% africanos e 2% asiáticos. Dados históricos e genéticos mostram que a distribuição desses três grupos étnicos ao longo do território brasileiro não ocorreu de forma homogênea, ou seja, a proporção de africanos, ameríndios e europeus difere significativamente a depender da região geográfica.

A história de povoamento da Bahia é semelhante à brasileira, pois este estado recebeu um grande contingente de imigrantes portugueses que atraídos pelas atividades econômicas do período colonial (cana de açúcar e posteriormente minerais e cacau), se estabeleceram nesta região e consigo trouxeram muitos escravos como mão-de-obra barata, misturando-se com os habitantes nativos que aqui já se encontravam (Viana Filho, 1988). A geografia de mistura racial na Bahia hoje demonstra coerência com a sua história migratória, que mostra que quanto maior o afastamento do litoral, menor é a mistura com negros, exceto para as regiões onde a atividade econômica foi a principal causa do povoamento (Azevedo *et al.*, 1982).

Contudo, poucos estudos descrevem a diversidade molecular da Bahia (Bortolini *et al.*, 1998; Abé-Sandes *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2006). Dados do IBGE de 2000 apontaram a Bahia como o estado brasileiro de maior contingente de afro-descendentes,

com 77,5% da população assim classificada baseada em autodenominação. Estimativas de mistura utilizando marcadores uniparentais (cromossomo Y e DNA mitocondrial) em populações brasileiras, comprovam a histórica da formação desta população, visto que a patrilinhagem brasileira é principalmente de origem européia, enquanto que a matrinhagem é ameríndia ou africana, a depender da região geográfica (Abé-Sandes *et al.*, 2004; Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001).

Uma outra estratégia para estimar mistura étnica é o uso de marcadores biparentais denominados de PSA, ou alelos específicos de populações, pois apresentam grandes diferenciais (δ) de frequência entre populações geograficamente distintas (Parra *et al.*, 1998). Estes marcadores são úteis para a investigação forense, estimativa de ancestralidade, ou estudos de mapeamento (Reed, 1973; Chakraborty *et al.*, 1992; Stephens *et al.*, 1994; Shiver *et al.*, 1997).

Dados da literatura apontam a existência de risco diferencial de desenvolvimento de algumas doenças a depender do grupo étnico ou geográfico, e nível sócio-econômico. Vários estudos genéticos relatam diferenças nas frequências de certas doenças em relação à raça e tentam atribuir isso a uma explicação baseada em genótipo. Mas o que se sabe, é que nenhuma doença genética é restrita a determinado grupo populacional, o que varia é a sua frequência (Burchard *et al.*, 2003). Portanto, a depender da sua constituição étnica, sócio-econômica, cultural e ambiental, uma população pode estar mais vulnerável ao desenvolvimento de certas doenças, visto que algumas delas também estão associadas à pobreza e no Brasil a pobreza é predominantemente negra. Assim, populações compostas por um contingente grande de afro-descendentes, como a Bahia, podem apresentar um risco diferencial para determinadas doenças, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

A AIDS é uma doença provocada pela infecção pelo HIV-1 e o curso clínico desta infecção é determinado por complexas interações entre as características virais e os fatores do hospedeiro (Fauci *et al.*, 1996). Essas variações no hospedeiro, como mutações nos genes que codificam os receptores de quimiocinas, como CCR5 e CCR2, têm sido descritas como variações importantes para a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e na taxa de progressão para a AIDS. Essas variantes apresentam frequências distintas entre diferentes grupos étnicos, podendo a associação desses alelos com a infecção pelo HIV-1 diferir dependendo da ancestralidade da população estudada.

No presente estudo, foi estimada biologicamente, a proporção de ancestralidade africana, européia e ameríndia em uma amostra de portadores de HIV-1 do estado da

Bahia, observando se estes diferem de população não infectada pelo HIV-1 de Salvador-BA, e ainda se diferem com relação ao padrão de progressão para a AIDS.

MATERIAL E MÉTODOS

População de estudo - Neste estudo foram analisadas amostras de 517 indivíduos infectados pelo HIV-1, provenientes de diversas regiões da Bahia, que realizam exames periódicos no Laboratório de Retrovírus do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ (Parecer nº. 84/2006 – CEP/ CPqGM/ FIOCRUZ).

Foram analisados indivíduos da população de Salvador originados da base de dados de um amplo projeto que estimou a prevalência e incidência de marcadores sorológicos para agentes infecciosos entre residentes de distintos espaços intra-urbanos chamados de “áreas sentinelas”. O esquema amostral foi descrito com detalhes por Teixeira *et al.*, 2002. As análises sobre ancestralidade foram realizadas do LASP/ CPqGM/ FIOCRUZ e estão descritas no trabalho de Machado, 2008 (comunicação pessoal).

As amostras utilizadas como parentais foram analisadas na Universidade da Pensilvânia, USA e os resultados cedidos gentilmente por Mark D. Shiver (Comunicação pessoal).

Classificação clínica dos indivíduos – Os indivíduos infectados pelo HIV-1 foram caracterizados a partir dos dados dos prontuários médicos, em três diferentes grupos, baseado no intervalo entre o diagnóstico e o início do tratamento com anti-retrovirais (Hendel *et al.*, 1998; Mazzucchelli *et al.*, 2001; Magierowska *et al.*, 1999), nas contagens da carga viral e células T/CD4, a ocorrência de infecções oportunistas. Os grupos foram:

- Lento Progressor (LP) – $CD4 > 500$ cels/mm³ e com + de 8 anos de infecção sem uso de terapia ante-retroviral.
- Típico Progressor (TP) – $500 < CD4 > 200$ cels/mm³
- Rápido Progressor (RP) – $CD4 < 200$ cels/mm³ em até 3 anos de infecção ou óbito em até 5 anos após a infecção.

Extração do DNA Genômico - Foram coletados 6mL de sangue em tubo *vacuntainer* e o DNA foi extraído a partir desse material biológico pela técnica de extração salina (Lahiri *et al.*, 1991).

Marcadores analisados – Foram analisados 12 marcadores de ancestralidade, sendo um polimorfismo de inserção/deleção - *AT3-I/D*, três inserções *Alu* - *SB19.3*, *APO* e *PV9*, 6 SNP – *FYnull*, *CKMM*, *LPL*, *GC-1F*, *GC-1S* e *CYP3A4* e 2 marcadores de susceptibilidade ao HIV/AIDS – *CCR5* - $\Delta 32$ e *CCR2* - 64I. Os diferentes alelos encontrados nos marcadores de ancestralidade são denominados de alelo*1 e alelo*2. Nos polimorfismos do tipo *in/del* e nas inserções *alu*, o alelo *1 é caracterizado pela presença da inserção. Nos SNP, o alelo*1 é aquele cujo nucleotídeo abole o sítio de restrição (Shiver *et al.*, 2003).

Análise laboratorial - O polimorfismo de inserção/deleção, as inserções *Alu* (*AT3-I/D* e *Sb19.3*, *APO* e *PV92*, respectivamente) e a mutação *CCR5- $\Delta 32$* foram genotipados por PCR utilizando os *primers* e condições da PCR descritas na literatura (Shriver *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1998). Os SNP (*FY-Null*, *LPL*, *CKMM*, *CYP3A4* e *GC*) e a mutação no gene *CCR2* foram analisados pela técnica de discriminação alélica na PCR em tempo real, utilizando kits pré-sintetizados, sistema TaqmanTM, da Applied Biosystems.

Análises estatísticas – Utilizou-se o programa GENEPOP para calcular as frequências alélicas, a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e a análise de associações par-a-par entre *loci*. As estimativas de mistura étnica foram calculadas no programa ADMIX, utilizando frequências de populações ancestrais ameríndias, européias e africanas disponíveis na literatura. Calculou-se os valores de heterozigose média (H_S) e o cálculo de distâncias genéticas relacionando a população da Bahia com outras populações já examinadas para estes *loci* pelo programa DISPAN, estatísticas F pelo programa GDA. O programa *Structure* foi utilizado para a inferência de estrutura populacional utilizando dados genotípicos de marcadores não ligados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 517 indivíduos infectados pelo HIV-1 analisados neste trabalho, obtivemos dados sócio-econômicos e sobre ancestralidade referida 512 indivíduos, sendo 287 do sexo masculino e 225 do sexo feminino. O dado de idade estava disponível em 509 indivíduos e a média encontrada foi de 41,09 anos (desvio padrão $\pm 10,9$); 510 pacientes informaram escolaridade sendo 54,1% que não completaram o 2º grau e dos 498 que

informaram renda, 74,7% tinham remuneração inferior a 3 salários mínimos. Os dados sócio-econômicos estão sumarizados na Tabela 1.

TABELA 1 – Dados sócio-econômicos de uma amostra de portadores do HIV-1 do estado da Bahia.

Categoria	N	(%)
Sexo		
Masculino	287	(56,1)
Feminino	225	(43,9)
Escolaridade		
2º grau completo a Pós-graduação	234	(45,9)
Analfabeto a 2º grau incompleto	276	(54,1)
Renda Familiar		
Mais de 3 salários mínimos	126	(25,3)
Até 3 salários mínimos	372	(74,7)

O número de amostras analisadas para cada marcador, os genótipos encontrados e suas frequências genotípicas detectadas e as frequências alélicas para o alelo*1 estão sumarizadas na Tabela 2.

Baseado nas frequências encontradas para estes *loci* analisados, foi calculado a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os marcadores *APO*, *Sb19.3* e *PV92*, *FYnull*, *CYP3A4* e *GC*, não aderiram ao equilíbrio. As inserções *Alu* apresentaram um excesso de homozigotos tanto para a presença e para a ausência da inserção. O SNP *FYnull* apresentou um excesso de homozigoto, contudo *CYP3A4* e *GC* (1F e 1S) apresentaram um excesso de heterozigotos na amostragem. Esses resultados podem ter sido gerados devido à coleta não aleatória das amostras, uma vez que se trata de uma população infectada atendida em um hospital de referência para controle da infecção pelo HIV-1. Outra explicação para este excesso seria o casamento preferencial entre indivíduos de um mesmo grupo étnico direcionando o fluxo gênico para a manutenção desse genótipo na população (Azevedo *et al.*, 1986).

TABELA 2 – Amostras analisadas, frequências genótípicas e frequência do alelo*1 para os marcadores de ancestralidade AT3, Sb19.3, APO, PV92, FYnull, CKMM, LPL, CYP3A4 e GC numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 na Bahia.

Marcadores	Genótipo	N (%)	Frequência alelo*1
AT3		512	0,4893
(<i>in/del</i>)	A/A	127 (24,80)	
	P/A	267 (52,14)	
	P/P	118 (23,04)	
APO		509	0,7446
(<i>Alu</i>)	A/A	46 (9,03)	
	P/A	168 (33,00)	
	P/P	295 (57,95)	
SB19.3		517	0,6750
(<i>Alu</i>)	A/A	78 (15,08)	
	P/A	180 (34,81)	
	P/P	259 (50,09)	
PV92		516	0,2742
(<i>Alu</i>)	A/A	295 (57,17)	
	P/A	159 (30,81)	
	P/P	62 (12,01)	
FYNULD		507	0,5828
(<i>SNP</i>)	A/A	186 (36,68)	
	A/G	219 (43,19)	
	G/G	102 (20,11)	
CKMM		512	0,6982
(<i>SNP</i>)	C/C	247 (48,24)	
	C/T	221 (43,16)	
	T/T	44 (8,59)	
LPL		495	0,6677
(<i>SNP</i>)	T/T	225 (45,45)	
	T/C	211 (42,62)	
	C/C	59 (11,91)	
CYP3A4		426	0,4660
(<i>SNP</i>)	A/A	147 (34,51)	
	A/G	103 (24,18)	
	G/G	176 (41,31)	
GC		458	
(<i>SNP</i>)	F/F	6 (1,31)	0,2402 (F)
	F/S	3 (0,65)	0,2478 (S)
	F/2	205 (44,8)	
	S/2	224 (48,9)	
	2/2	20 (4,36)	

P/P – Homozigoto para a presença da inserção; P/A – Heterozigoto; A/A – Homozigoto para a ausência da inserção; F/F – T/T (posição 34 de gene) e C/C (posição 45); F/S – T/G (posição 34) e C/C (posição 45); F/2 – T/T (posição 34) e C/A (posição 45); S/2 – T/G (posição 34) e C/A (posição 45); 2/2 – T/T (posição 34) e A/A (posição 45).

As frequências alélicas desta amostra foram também comparadas com as frequências encontradas em uma população de Salvador, não portadora do HIV-1, observou-se resultados similares para quase todos os *loci*, exceto para *AT3*, *LPL* e

FYnull. Encontrou-se uma frequência maior dos marcadores *AT3* e *LPL* na população não infectada de Salvador e uma frequência mais alta do locus *FYnull* entre os portadores do HIV-1 (Tabela 3). Após a análise de diferenciação gênica e genotípica, verificou-se que a diferença nas frequências entre essas duas populações foram estatisticamente significantes.

TABELA 3 – Frequências do alelo*1 para os loci *AT3*, *Sb19.3*, *APO*, *PV 92*, *FY NULL*, *CKMM*, *LPL*, *CYP3A4* e *GC* em indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia e não infectados de Salvador – BA e análise de diferenciação gênica entre as duas populações.

Marcadores	HIV-1	Salvador*	Valor de p	S.E.
<i>AT3</i>	0,489	0,553	0.0008	0.0005
<i>APO</i>	0,745	0,765	0.2063	0.0110
<i>SB 19.3</i>	0,675	0,670	0.7954	0.0082
<i>PV92</i>	0,274	0,251	0.1591	0.0109
<i>FYnull</i>	0,583	0,531	0.0090	0.0026
<i>CKMM</i>	0,302	0,273	0.0928	0.0090
<i>LPL</i>	0,668	0,741	0.0001	0.0001
<i>CYP3A4</i>	0,466	0,493	0.5258	0.0124
<i>GC – F</i>	0,240	0,242	0.9621	0.0029
<i>GC – S</i>	0,249	0,251		

*Comunicação pessoal - Machado, 2008; Valor de p – probabilidade; S.E. – erro padrão.

Foi feita uma comparação desses achados com as frequências da presença da inserção no polimorfismo *in/del*, a presença das inserções nos 3 loci *Alu* e com o alelo que abole o sítio de restrição nos 6 *SNP* analisados, com os mesmos loci em populações parentais (africana, européia e ameríndia). Observou-se que as frequências encontradas nesta amostra são diferentes e intermediárias entre as frequências parentais, à exceção dos loci *PV92* e *CKMM* que apresentaram frequências bastante similares na população africana e européia, respectivamente, com as frequências encontradas na população de indivíduos infectados pelo HIV-1, como observado na Tabela 4.

Essas diferenças entre as frequências refletem o processo de miscigenação ocorrido entre os povos nativos e o contingente europeu e africano que chegaram ao Brasil na época do seu descobrimento.

TABELA 4 - Frequências dos alelos específicos de população em populações parentais e nos portadores de HIV-1

<i>Alelos/ Populações</i>	Africano*	Europeu *	Nativo Americano*	HIV-1
<i>AT 3 I/D*1</i>	0,858	0,282	0,061	0,489
<i>APO*1</i>	0,420	0,925	0,977	0,744
<i>Sb 19.3*1</i>	0,415	0,903	0,645	0,675
<i>PV 92*1</i>	0,225	0,152	0,792	0,274
<i>FYnull*1</i>	0,001	0,998	1,000	0,583
<i>CKMM*1</i>	0,164	0,313	0,904	0,302
<i>LPL*1</i>	0,971	0,492	0,442	0,668
<i>GC-1F*1</i>	0,853	0,156	0,339	0,675
<i>GC-1S*1</i>	0,069	0,607	0,542	0,487
<i>CYP3A4*1</i>	0,198	0,958	0,959	0,466

* Frequências segundo Shiver *et al*, 2003

A estimativa de mistura para os indivíduos portadores do HIV-1 da Bahia resultou numa proporção de 48% de marcadores africanos, 35% de marcadores europeus e 17% de marcadores ameríndios. Esses dados comparados com a população de Salvador, não infectada pelo HIV-1, não apresentou diferença, prevalecendo uma maior contribuição africana na formação da população da Bahia, seguida da europeia e ameríndia. As análises de diferenciação gênica e genotípica mostraram que a população de Salvador só difere da população infectada pelo HIV-1 para os marcadores AT3 e LPL, ambos marcadores de africanos, isto reflete a maior contribuição africana em Salvador demonstrada pelo ADMIX (Tabela 5).

TABELA 5 – Proporções de marcadores africanos, europeus e indígenas em uma população infectada pelo HIV-1 da Bahia e entre não infectados da cidade de Salvador-BA.

Contribuição	Infectados pelo HIV-1		Não infectados pelo HIV-1	
	mistura	erro padrão	mistura	erro padrão
Africana	0,478	0,004	0,492	0,016
Europeia	0,355	0,017	0,363	0,064
Ameríndia	0,167	0,015	0,145	0,058

Como era esperado, em virtude da história da colonização da Bahia, que recebeu um grande número de africanos como mão de obra escrava para os grandes latifúndios monocultores, a contribuição africana na formação dessa população é a mais marcante. Contudo, a contribuição européia na formação dessa população foi também elevada. Dados históricos mostram que os imigrantes europeus que chegaram à época da colonização se relacionaram principalmente com as escravas africanas e deixaram muitos descendentes mestiços contribuindo para a difusão de alelos tipicamente de brancos entre os indivíduos que fenotipicamente seriam ditos mulatos ou negros. Estes dados chamam a atenção para a importância de se realizar inferências de ancestralidade baseados em marcadores biológicos visto que estes apresentam resultados mais precisos sobre o perfil da população. Estes dados quando comparados com as estimativas do IBGE (2000), que apontaram a Bahia como tendo 77,5% de sua população composta por afro-descendentes, baseados em autodenominação, demonstram que esta forma de classificação não reflete corretamente a ancestralidade da população.

Encontrou-se nesta população um valor de diversidade gênica média de 0.4192, que foi superior ao encontrado nas populações parentais (africanos - 0.2503; europeus - 0.2705; e ameríndios - 0.2628), confirmando os dados históricos que a população da Bahia, foi formada pela miscigenação entre povos de diferentes origens, sendo assim bastante heterogênea (dados não mostrados).

Além da diversidade gênica, foi calculada uma matriz de distância genética para avaliar a relação entre as populações ancestrais com a amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia. Essa análise mostrou que a população do estudo está mais próxima dos africanos, seguidos de europeus e ameríndios (dados não mostrados).

Para verificar a existência de estruturação nesta população estudada, foi analisada a associação par-a-par através do desequilíbrio de ligação entre os *loci* analisados. Após a correção de Bonferroni, encontrou-se desequilíbrio de ligação entre AT3 e LPL. Estes resultados sugerem estruturação da população e que este desequilíbrio surgiu como um artefato da mistura entre diferentes povos formadores desta população (Hartl e Clark, 2007). A estratificação existe quando a população foi formada pela mistura entre sub-populações, e quando as proporções de mistura variam entre os indivíduos (Hoggart *et al.*, 2003).

A estrutura populacional foi testada também através das análises no programa Structure. O cálculo mostrou que esta população da Bahia infectada pelo HIV-1 é composta por indivíduos miscigenados, porém não homogeneamente miscigenados.

Observou-se agrupamentos de indivíduos mais próximos de africanos e de europeus, sugerindo estrutura populacional (Figura 1).

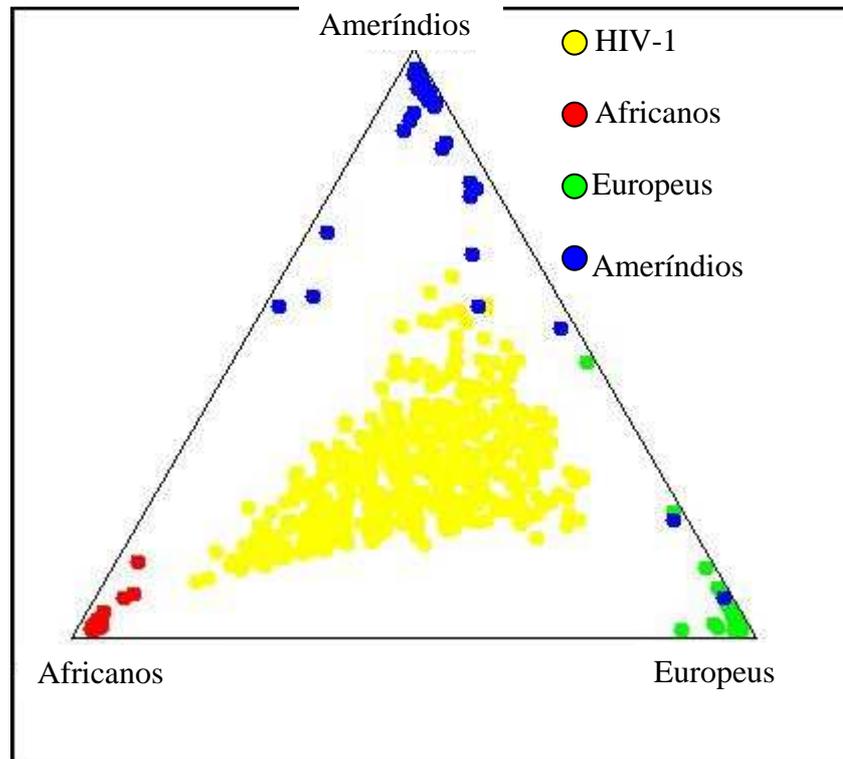


Figura 1 – Distribuição dos indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia em relação à mistura étnica com europeus, africanos e ameríndios.

Os pacientes infectados pelo HIV-1 foram classificados ainda quanto à evolução da infecção por este vírus. Das 517 amostras analisadas, foram coletados dados clínicos de 264 indivíduos, e destes, conseguimos classificar 2 como lentos progressores, 65 típicos progressores e 52 rápidos progressores, dando um total de 119 indivíduos classificados. O restante dos indivíduos, dos quais obtivemos acesso aos prontuários médico, não apresentavam dados clínicos suficientes para se estabelecer a classificação e por isso foram considerados ignorados. Estes números refletem a dificuldade de acesso aos prontuários clínicos, carência de informações completas nos mesmos, como data de diagnóstico, data de início de terapia e históricos de exames para controle da infecção através das quantificações de carga viral plasmática e células CD4.

Estes indivíduos infectados pelo HIV-1 foram avaliados quanto ao nível sócio-econômico e escolaridade. A maioria dos participantes avaliados não concluíram o ensino fundamental e médio (1º e 2º grau) e recebiam, em sua maioria, renda igual ou

inferior a 3 salários mínimos. Foi estimada a ancestralidade genômica nesses indivíduos em relação à escolaridade e renda e em ambas as categorias, encontrou-se uma maior proporção de marcadores africanos (Tabela 6).

TABELA 6 – Estimativa de mistura nos indivíduos infectados pelo HIV-1 classificados quanto ao nível sócio-econômico.

Caracterização sócio-econômica	Contribuição %		
	Africana	Européia	Ameríndia
2º grau completo a Pós-graduação	43	34	23
Analfabeto até 2º grau incompleto	46	31	23
Mais de 3 salários mínimos	42	32	26
Até 3 salários mínimos	46	32	22

O *status* sócio-econômico tem sido considerado, por diversos investigadores, como variável de confusão quando se pretende analisar a relação de raça e doença. Essa relação é evidenciada nos grupos minoritários pelas maiores taxas de morbidade e mortalidade, menor expectativa de vida, dificuldade de acesso a serviços de saúde, menor taxa de saneamento básico nas moradias e menor renda familiar, levando a uma diferença substancial na incidência de certas doenças e na resposta ao seu tratamento (Witzig *et al.*, 1996). Em relação aos indivíduos infectados pelo HIV-1 deste estudo, observou-se que os indivíduos que tinham menor grau de escolaridade (Analfabetos até 2º grau incompleto) e menor renda familiar (Até 3 salários mínimos) tiveram os maiores percentuais de contribuição africana. Estes resultados confirmam os dados que a população mais pobre é também mais negra e sugere que a ancestralidade pode está influenciando a vulnerabilidade ao HIV-1/AIDS.

Foram analisadas 2 mutações nos genes de receptores de quimiocina que funcionam como receptores para a entrada do vírus na célula CD4⁺, CCR5 - $\Delta 32$ no gene do CCR5 e a CCR2 - 64I no gene do CCR2, que estão associadas à susceptibilidade a infecção e à doença, encontramos uma frequência alélica de 2% para a $\Delta 32$ e 14% para a 64I. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 7. A frequência dessas mutações quando analisados os grupos clinicamente classificados, foi de 3% para a mutação $\Delta 32$ nos indivíduos TP e de 2% para os indivíduos RP, já para a mutação CCR2 - 64I encontrou-se uma frequência de 16% entre os TP e 13% nos RP.

Não foi possível determinar a frequência dessas mutações nos indivíduos LP em virtude no número reduzido de indivíduos inclusos nessa classificação.

TABELA 7 – Distribuição genotípica e frequência alélica das mutações CCR5 - $\Delta 32$ e CCR2 - 64I numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia.

Mutação	HIV-1	LP	TP	RP
N (%)				
CCR2	274	-	41	26
Wt/ Wt	198 (72,26)	-	29 (70,73)	19 (73,07)
Wt/ 64I	74 (27,00)	-	11 (26,83)	7 (26,93)
64I/ 64I	2 (0,72)	-	1 (2,44)	-
CCR2-64I	0,141	0,0	0,158	0,134
CCR5	499	1	63	51
Wt/ Wt	479 (96,00)	1	60 (95,24)	49 (96,08)
Wt/ $\Delta 32$	19 (3,80)	-	2 (3,17)	2 (3,92)
$\Delta 32/ \Delta 32$	1 (0,20)	-	1 (1,59)	-
CCR5-$\Delta 32$	0,021	0,0	0,031	0,019

Na tentativa de relacionar a análise “racial” fenotípica com a evolução clínica da doença, observamos a distribuição das diferentes classificações fenotípicas obtidas através da análise dos caracteres físicos dos pacientes entre as três categorias de *status* clínico (Tabela 8).

TABELA 8 – Distribuição dos fenótipos entre os três *status* clínicos numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 na Bahia.

Classificação/Status	LP	TP	RP
N	2	63	52
Branco	-	10	9
Mulato Claro	1	13	11
Mulato Médio	-	31	25
Mulato Escuro	-	8	5
Negro	1	1	2

Em relação ao CCR5, a deleção de 32 pares de bases na região codificante do gene conhecida como CCR5 - $\Delta 32$, é bastante frequente em indivíduos caucasianos e quase

ausente em populações africanas e ameríndias, sendo a presença desse alelo quando em homozigose, associada com proteção contra a infecção pelo HIV-1 e em indivíduos heterozigotos, esta mutação está associada com retardo na progressão para a AIDS (Mummidi *et al.*, 1998). A frequência encontrada neste estudo foi similar à encontrada no trabalho de Grimaldi *et al.*, 2002, que estudou indivíduos infectados pelo HIV-1 da cidade de Salvador. A proporção de heterozigotos para esta mutação foi de 3,8% na população infectada pelo HIV-1 da Bahia, 4,2% entre os indivíduos analisados por Grimaldi *et al.*, 2002 e de 5,3% entre os indivíduos não infectados pelo HIV-1 analisados por Grimaldi, 2006. As frequências observadas nesta amostra são intermediárias entre as frequências encontradas nas populações ancestrais africanas (0%) e portugueses (10,5%) (Lucotte, 1997), reafirmando a forte miscigenação entre africanos e portugueses na formação da população baiana.

A CCR2-64I também é uma variante associada com retardo na progressão para a AIDS. Comparando estes resultados com o trabalho de Acosta *et al.*, 2003, a frequência encontrada nestas amostras de indivíduos infectados pelo HIV-1 foi similar com a encontrada na população geral de Salvador, ambas 14%. Os indivíduos infectados pelo HIV-1 analisados por Acosta *et al.*, 2003 apresentaram uma frequência de 17% dessa mutação. Mais uma vez esses números demonstram consistência com as frequências encontradas em outras populações de origem predominantemente africana, visto que esta mutação é freqüente entre negros (23%) e asiáticos (25%). (Smith *et al.*, 1997).

Entre os indivíduos classificados quanto a evolução da infecção, encontrou-se uma frequência de 3% e 2% para o alelo $\Delta 32$ em indivíduos considerados como típicos progressores (TP) e rápidos progressores da doença (RP), respectivamente. Não foram encontrados alelos $\Delta 32$ entre os indivíduos classificados como lentos progressores (LP). Já para o alelo CCR2-64I a frequência entre os TP foi de 15,8% e de 13,4% para os RP, também não encontramos esse alelo entre os LP.

Essas diferenças encontradas entre TP e RP não foram estatisticamente significantes ($P > 0,05$). Avaliando a caracterização fenotípica desses indivíduos classificados como LP, TP e RP, o quadro geral foi a predominância de indivíduos caracterizados como mulatos médio entre os TP e RP, uma vez que só obtivemos 2 pacientes classificados como LP, sendo um deles caracterizados como mulato claro e o outro como negro, não foi possível realizar a análise de associação de ancestralidade com a progressão para a AIDS. Contudo o número evidente de mulatos médio entre TP e RP só corrobora a existência de mistura étnica africana e caucasiana nesta população.

Foi realizada uma estimativa de mistura agrupando os afro-descendentes classificados como TP e afro-descendentes classificados como RP. Essa análise mostrou uma proporção de 44% de marcadores africanos, 36% de europeus e 20% de ameríndios para os indivíduos TP. Para os RP encontrou-se uma proporção de 48% de marcadores africanos, 30% de europeus e 21% de ameríndios. Esses dados demonstram que os RP possuem uma ancestralidade africana maior, e isto sugere que, a ancestralidade pode estar influenciando na progressão da doença, uma vez que o curso clínico da infecção pelo HIV-1 é delineado por interações complexas vírus x hospedeiro, essas relações podem ser mais ou menos favoráveis em determinado grupo étnico que em outro, acelerando ou retardando a progressão para a AIDS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÉ-SANDES, K.; SILVA, W.A. Jr; ZAGO, M.A. Heterogeneity of the Y chromosome in AfroBrazilian populations. **Hum Biol.** 76(1):77-86. 2004.

ACOSTA, AX; GRIMALDI, RS; SPÍNOLA, JL; GALVÃO-CASTRO, B. Distribution of the CCR2-64I allele in three Brazilian ethnic groups. **Genetics and Molecular Biology**, 26, 3, 241-243, 2003.

ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS M.; GUIMARÃES, P.E.; FERREIRA, A.C.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.; PRADO, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet.** 67(2):444-61. 2000.

AZEVEDO, E.S.; FORTUNA, C.M.M.; SILVA, K.M.C.; SOUSA, M.G.F; MACHADO, M.A.; LIMA, A.M.V.M.D; AGUIAR, M.E.; ABÉ, K.; EULÁLIO, M.C.M.N.; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, M.C.B.O.; SANTOS, M.G. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Human Biology.** 54:329-341. 1982.

AZEVEDO, E.S.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; FREIRE-MAIA, N.; FORTUNA, C.M.M.; ABÉ, K; SANTOS, M.G.; BARBOSA, A.A.L.; SILVA, M.E.T.; COSTA, A.F. Mating types in a mixed and multicultural population of Salvador, Brazil.. **Ver Brasil Genet IX.** 3. 487-496. 1986.

BARBOSA, A.A.L.; SOUSA, S.M.B.; ABÉ-SANDES, K.; ALONSO, C.A.; SCHNEIDER, V.; COSTA, D.C.C.; CAVALLI, I.J.; AZEVÊDO, E.E.S. Microsatellite studies on an isolated population of African descent in the Brazilian state of Bahia **Genetics and Molecular Biology.**29. 1. 23-30. 2006.

BORTOLINI, M.C.; SILVA-JUNIOR, A.W.; WEIMER, T.A.; ZAGO, M.A.; CASTRO-DE-GUERRA; SCHNEIDER, M.P.; LAYRISSE, Z.; MENDEZ-CASTELLANO, H.; SALZANO, F.M.H. Protein and hypervariable tandem repeat diversity in eight African-derived South American populations. Inferred relationships do not coincide. **Human Biology.** v. 70. n. 3. p. 443-461. 1998.

BURCHARD, E.G.; ZIV, E.; COYLE, N.; GOMEZ, S.L.; TANG, H.; KARTER, A.J.; MOUNTAIN, J.L.; PEREZ-STABLE, E.J.; SHEPPARD, D.; RISCH, N.; the importance of race and ethnic background in biomedical and clinical practice. **New England Journal Med** 348:1170-75, 2003.

CALLEGARI-JACQUES, SM and SALZANO, FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciênc Cult.**51:166-174. 1999.

CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Hum Genet.** 68:281–286. 2001.

CHAKRABORTY, R.; KAMBOH, M.I; NWANKWO, M.; FERRELL, R.E. Caucasian genes in American blacks: new data. **Am J Hum Genet.** 50:145-155. 1992.

FAUCI A. S.; Pantaleo G.; Stanley S.; Weisman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Ann. Intern. Med.**, 124:654-663, 1996.

GRIMALDI, R. – **Caracterização genética dos receptores de quimiocina CCR5 e CCR2, e da quimiocina SDF-1, em populações afro-descendentes, caucasóides e ameríndia no Brasil.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular - programa de pós-graduação *strictu sensu* da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz), 2006.

GRIMALDI R, SHINDO N, ACOSTA AX, DOURADO I, BRITES C, DE MELO CARVALHO O, BRITO I, BOU-HABIB DC, GALVÃO-CASTRO B. Prevalence of the CCR5Delta32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. **Human Genetics.** Jul;111(1):102-4, 2002.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics.** 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, 2007.

HENDEL H, HENON N, LEBUANEC H, LACHGAR A, PONCELET H, CAILLAT-ZUCMAN S, WINKLER CA, SMITH MW, KENEFIC L, O'BRIEN S, LU W, ANDRIEU JM, ZAGURY D, SCHACHTER F, RAPPAPORT J, ZAGURY JF. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** Dec 1;19(4):381-6, 1998.

HOGGART, C. J.; PARRA, E. J.; SHRIVER, M. D.; BONILLA, C.; KITTLES, R. A.; CLAYTON, D. G.; MCKEIGUE, P. M. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. **Am J Hum Genet.** 72(6):1492-1504, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA - IBGE. **Brasil: 500 Anos de Povoamento.** Rio de Janeiro. 2000. Disponível em: < www.ibge.gov.br>. Acesso em 15 de março de 2006.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucl. Ac. Res.** 19; S444, 1991.

LUCOTTE, G. Frequencies of the CC chemokine receptor 5 Δ 32 allele in various populations of defined racial background. **Biomed Pharmacother.**51(10):469-73, 1997

MAGIEROWSKA M, THEODOROU I, DEBRE P, SANSON F, AUTRAN B, RIVIERE Y, CHARRON D, COSTAGLIOLA D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. **Blood.** Feb 1;93(3):936-41, 1999.

MAZZUCHELLI R, CORVASCE S, VIOLIN M, RIVA C, BIANCHI R, DEHO L, VELLECA R, CIBELLA J, BADA M, MORONI M, GALLI M, BALOTTA C. Role of CCR5, CCR2 and SDF-1 gene polymorphisms in a population of HIV-1 infected individuals. **J Biol Regul Homeost Agents** Jul-Sep;15(3):265-71, 2001.

MUMMIDI, S.; AHUJA, S. S.; GONZALES, E.; ANDERSON, S. A.; SANTIAGO, E. N.; STEPHAN, K. T.; CRAIG, F. E.; OÇONNEL, P.; TRYON, V.; CLARK, R. A.; DOLAN, M.J.; AHUJA, S. K. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. **Nature Med**;4:786-793, 1998.

PARRA, E.J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M.A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D.B.; DEKA, R.; FERRELL, R.E.; SHRIVER, M.D. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. **Am J Hum Genet.** 63(6):1839-51. 1998.

REED, T.E. Number of gene loci required for accurate estimation of ancestral population proportions in individual human hybrids. **Nature.** 244:575-576. 1973.

SHRIVER, M.D.; PARRA, E.J.; DIOS S.; BONILLA, C.; NORTON, H.; JOVEL, C.; PFAFF, C.; JONES, C.; MASSAC, A.; CAMERON, N.; BARON, A.; JACKSON, T.; ARGYROPOULOS, G.; J.I.N, L.; HOGGART, C.J.; MCKEIGUE, P.M.; KITTLES, R.A. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Human Genets.** 112(4):387-99. Epub 2003 Feb 11. Apr 2003.

SHRIVER, M.D.; SMITH, M.W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J.M.; DEKA, R.; FERRELL, R.E. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **Am J Hum Genet.** 60(4):957-64. 1997.

SMITH, M.E.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; LOMB, D.; DEAN, M.; HUTTLEY, G.; O'BRIEN, S.J. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. **Nat Med.** Oct; 3 (10):1052-3, 1997.

STEPHENS, J.C.; BRISCOE, D.; O'BRIEN, S.J. Mapping by admixture linkage disequilibrium in human populations: limits and guidelines. **Am J Hum Genet.** 55:809-824. 1994.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; COSTA, M. C. N.; STRINA, A.; MARTINS, D. F.; PRADO, M. *Sentinel areas: a monitoring strategy in public health.* **Caderno de Saúde Pública,** 18 (5):1189-95, 2002.

VIANA FILHO L. **O negro na Bahia.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira.1988.

WITZIG, R.; The medicalization of race: scientific legitimization of a flawed social construct. **Ann Inter Med** 125: 675-9, 1996.

Manuscrito 2

Associação entre ancestralidade auto-referida, análise fenotípica de caracteres morfológicos e sobrenomes de conotação religiosa com a ancestralidade genômica em uma amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia.

Bomfim, T.F.¹, Machado, T.M.B.¹, Acosta, A.X.^{1,2}, Brites, C.²; Galvão-Castro, B.^{1,3}, Abé-Sandes, K.^{1,4}.

1- Laboratório Avançado de Saúde Pública/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 2- Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (UFBA), 3- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/Fundação para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), 4- Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

INTRODUÇÃO

A história do povoamento da Bahia tem duas fases distintas, a primeira iniciou-se com a chegada dos primeiros habitantes descendentes dos Mongóis há aproximadamente 10 mil anos. A segunda fase se inicia após descobrimento do Brasil, em meados do século XVI, com a chegada dos portugueses e negros africanos (Azevedo, 1979). As características biossociais desse contato tri-racial constituíram os marcos iniciais da modelagem antropogenética da população atual. Cada um desses povos tinha língua própria, cultura, religião e valores distintos e eram frutos de suas próprias tradições, além de ter constituição genética peculiar e aspectos físicos diferentes.

Na fase inicial dos cruzamentos entre esses três grupos étnicos, não havia mulheres brancas, e assim o fluxo gênico aconteceu do homem branco para mulheres negras e índias. Posteriormente, vieram as mulheres brancas e o processo de mistura racial se propagou entre os grupos, difundindo-se por quase toda a população, e o processo de transculturação também adquiriu características próprias, formando assim, uma população baiana com uma grande mistura cultural e gênica dos povos que lhe deram origem (Azevedo, 1979).

Poucos estudos têm sido desenvolvidos na Bahia com o objetivo de descrever a diversidade genética da nossa população e a contribuição de cada grupo ancestral na sua formação. Dados do IBGE de 2000 revelam que na Bahia, 77,5% da população (10.095.282 indivíduos) é composta por afro-descendentes, sendo que em Salvador

79,8% são negros ou pardos, conforme a auto-classificação de raça ou cor. Entretanto, esta estimativa é toda baseada na autodenominação raça/ cor. Estratégias de investigação de mistura étnica em populações miscigenadas incluem a análise de caracteres morfológicos que permitam inferir ancestralidade e o uso de marcadores genéticos que apresentem grandes diferenciais de frequência alélica entre populações geograficamente distintas, conhecidos como alelos específicos de população (PSA).

Um outra abordagem científica para estimar ancestralidade é o estudo dos nomes de família que apresentam conotação religiosa, animal-planta, ou outros sobrenomes, que estão associados com ancestralidade africana, indígena e portuguesa, respectivamente (Azevedo *et al.*, 1982). Os nomes de conotação religiosa mais frequentes no Brasil não apresentam a mesma frequência em Portugal, demonstrando que esses sobrenomes foram adquiridos por batismo dos filhos de mulheres negras e índias (Tavares-Neto e Azevedo, 1977). Uma revisão de cartas de alforria de escravos nos séculos XVIII e XIX demonstrou uma alta proporção de sobrenomes de conotação religiosa diferentes dos sobrenomes dos seus “senhores feudais” (Azevedo e Fortuna, 1983). A adoção de sobrenomes de natureza religiosa pelos negros é explicada pelas suas fortes tradições religiosas e assimilação do cristianismo dos colonizadores portugueses e de um sincretismo entre santos católicos e deuses africanos, uma vez que eles não podiam adotar as suas próprias práticas religiosas.

A frequência de sobrenome com conotação religiosa se eleva à medida que aumentam as proporções de mistura racial negróide, sendo forte indicativo de ancestralidade africana, corroborada por parâmetros biológicos como sistema sanguíneo ABO (Junqueira & Wishart, 1958), comprimento do cromossomo Y (Barbosa *et al.*, 1997).

O objetivo deste trabalho foi estimar ancestralidade africana em uma amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 da Bahia e comparar com a estimativa de ancestralidade auto referida, análise fenotípica e por sobrenomes de conotação religiosa com a ancestralidade genômica investigada a partir da análise de 10 *loci* PSA autossômicos.

MATERIAL E MÉTODOS

População do estudo – Neste trabalho foram analisadas 517 amostras de indivíduos infectados pelo HIV-1, os quais realizam exames periódicos no Laboratório de Retrovírus do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), da

Universidade Federal da Bahia (UFBA). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participarem do estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ (Parecer nº. 84/2006 – CEP/ CPqGM/ FIOCRUZ)

Foram analisados os sobrenomes de indivíduos da população de Salvador originados da base de dados de um amplo projeto que estimou a prevalência e incidência de marcadores sorológicos para agentes infecciosos entre residentes de distintos espaços intra-urbanos chamados de “áreas sentinelas”. O esquema amostral foi descrito com detalhes por Teixeira *et al.*, 2002. As análises sobre ancestralidade foram realizadas do LASP/ CPqGM/ FIOCRUZ e estão descritas no trabalho de Machado, 2008 (comunicação pessoal).

Autodenominação raça/cor – Os indivíduos participantes foram entrevistados para coleta de dados sócio-econômicos e de ancestralidade. Neste questionário, os pacientes se autodenominavam como: negro, mulato/moreno, branco ou outro. Foi ainda investigada a ancestralidade referida de avós e pais destes mesmos indivíduos.

Análise Fenotípica - Após a autodenominação, foi realizada a caracterização fenotípica dos indivíduos levando em consideração características morfológicas tais como: cor da pele (branca, marrom ou preta); textura de cabelo (liso, ondulado ou crespo); nariz (base: achatada, média ou elevada/ corpo: largo, médio ou fino); formato dos lábios (finos, médios ou grossos). Eram observados também caracteres secundários: cor do cabelo (loiro, castanho, ruivo ou preto) e cor dos olhos (claro ou escuro). De acordo com esses critérios, os indivíduos de pele branca, cabelo liso ou ondulado, nariz proeminente, arrebicado ou mediano, lábios finos ou medianos, independente da cor do cabelo ou pigmentação dos olhos, foram classificados como brancos. Os indivíduos de pele preta, cabelo crespo, olhos pretos e lábios grossos foram classificados como negros. Os demais participantes foram classificados como mulatos a depender da quantidade de características compartilhadas (mulatos claros, mulatos médio, mulatos escuros).

Sobrenomes - Os sobrenomes dos indivíduos coletados foram analisados para se identificar entre a quantidade de sobrenomes diferentes encontrados nesses indivíduos, quantos eram de conotação religiosa e, dentre estes, quais tinham maior incidência nessa população e, dessa forma, relacionar tais sobrenomes com a origem africana, de acordo com a classificação (Tavares-Neto e Azevedo, 1977).

Estimativa de mistura étnica – Foram utilizadas as frequências de 9 marcadores específicos de população, AT3 I/D, APO, SB19.3, PV92, FYnull, CKMM, LPL, CYP3A4 e GC (Bomfim, 2008 – comunicação pessoal) além das frequências desses mesmos marcadores em populações parentais (Shiver *et al*, 2003), para estimar proporção de marcadores africanos, europeus e ameríndios nessa população, usando o programa estatístico ADMIX.

Tabela 1 - Sobrenomes de conotação religiosa mais freqüentes na Bahia, segundo Tavares-Neto e Azevedo, 1977.

Sobrenomes				
Aflitos	Bispo	Evangelista	Piedade	Santa Rita
Ajuda	Boa Morte	Hora	Prazeres	Santiago
Amor Divino	Bomfim	Jesus	Purificação	Santos
Amparo	Cardeal	Luz	Ramos	São Pedro
Anjos	Carmo	Mercês	Reis	Socorro
Anunciação	Chagas	Natividade	Ressurreição	Soledade
Arcanjo	Conceição	Nascimento	Rosário	Trindade
Assis	Cruz	Paixão	Sacramento	Virgem
Assunção	Encarnação	Palma	Santana	Virgens
Batista	Espírito Santo	Passos	Sant'Anna	Xavier

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi encontrada uma diferença entre a autodenominação e a análise fenotípica nesta população de estudo. A análise de autodenominação mostrou 172 indivíduos que se autodeclararam negros, 74 brancos e 252 mulatos/moreno, 10 se autodeclararam “outros” e 4 não se autodeclararam. Realizando a análise fenotípica, apenas 19 dos 172 indivíduos que se autodeclararam negros foram assim considerados, além destes 3 indivíduos que se autodeclararam mulatos/morenos, foram fenotipicamente classificados como negros, totalizando 22 indivíduos.

Já a classificação de brancos, dos 74 que assim se autodeclararam, 49 foram fenotipicamente classificados, e mais, 33 indivíduos que se autodeclararam como mulatos/moreno, 3 indivíduos que se autodeclararam como negros, 2 indivíduos que se

autodenominaram em “outros”, e 1 indivíduo que não informou classificação por autodenominação, foram classificados fenotipicamente como brancos, totalizando 88 indivíduos.

Dentre os 252 indivíduos que se autodeclararam mulatos/morenos, a análise fenotípica mostrou que a maioria pertencia a uma das 3 categorias de mulatos (mulatos claro, médio e escuro), sendo assim concordantes em ambas as classificações. A classificação geral dos indivíduos por autodenominação e análise fenotípica está resumida na Tabela 2.

TABELA 2 – Comparação entre a autodenominação racial dos indivíduos portadores do HIV-1 e a classificação fenotípica baseada em características físicas.

	Autodenominação	Classificação Fenotípica
Branco	74 (14,5%)	88 (17,2%)
Mulatos/morenos	252 (49,2%)	Mulato claro - 97 (18,9%) Mulato Médio - 228 (44,5%) Mulato escuro - 72 (14,1%)
Negros	172 (33,6%)	22 (4,3%)
Outros	10 (1,9%)	1 (0,2%)
Sem classificação	4 (0,8%)	4 (0,8%)

Foi feita uma estimativa de mistura nessas duas categorias de classificação e o resultado encontrado demonstrou que as proporções de marcadores europeus eram maiores nos indivíduos brancos, em ambas as classificações enquanto que as proporções de marcadores de africano aumentaram proporcionalmente com o aumento do fenótipo “negróide”. As proporções de mistura foram maiores quando se analisou os indivíduos classificados através da análise fenotípica, quando comparados com a autodenominação, sugerindo que o uso de critérios na classificação baseada em caracteres físicos reflete melhor a ancestralidade como mostrado na Tabela 3, onde pode-se observar o aumento proporcional de ancestralidade africana do branco para o negro.

TABELA 3 – Estimativa de mistura étnica entre os indivíduos classificados por autodenominação e análise fenotípica.

	% marcadores	Africano	Europeu	Ameríndio
<u>Autodenominação</u>				
Branco		32	38	30
Mulato		44	33	23
Negro		53	28	19
<u>Anal. Fenotípica</u>				
Branco		30	45	25
Mulato Claro		33	37	30
Mulato Médio		50	27	23
Mulato Escuro		62	23	15
Negro		62	18	22

Categorizando os dados de autodenominação com a classificação fenotípica, agrupamos os indivíduos em afro-descendentes (mulatos claro/médio/escuro e negros) e não afro-descendentes (brancos e outras classificações). O resultado encontrado está descrito na Tabela 4 e a diferença encontrada nas duas classificações não foi estatisticamente significativa ($p = 0,699$).

TABELA 4 – Comparação da autodenominação x classificação fenotípica x % de marcadores africanos dos indivíduos infectados pelo HIV-1.

	Autodenominação	Análise Fenotípica
Afro-descendentes	82,8%	81,8%
Contribuição africana	47%	48%
Não afro-descendentes	17,2%	18,2%
Contribuição africana	31%	31%

Foi realizada uma análise dos sobrenomes dos indivíduos infectados pelo HIV-1, encontrando um total de 223 sobrenomes diferentes, sendo destes, 27 de conotação religiosa encontrados em 271 (52,4%) indivíduos da amostra.

Nesta análise, os 10 sobrenomes mais frequentes encontrados nesta população, bem como os 10 sobrenomes de conotação religiosa mais frequente foram comparados com os dados de Tavares- Neto e Azevedo, 1977, encontrando-se uma similaridade de

90% entre os sobrenomes, pois apenas o sobrenome Ferreira foi mais freqüente na população de infectados pelo HIV-1 quando comparados com a população da Bahia em 1977.

TABELA 5 – Sobrenomes mais freqüentes e de conotação religiosa encontrados em uma população infectada pelo HIV-1 da Bahia x sobrenomes mais freqüentes encontrados na Bahia (Tavares-Neto e Azevedo, 1977).

Ordem	Mais Freqüentes-HIV-1		Conotação Religiosa-HIV-1		Bahia*
	N	Sobrenome	N	Sobrenome	Sobrenomes
1º	155	Santos	155	Santos	Santos
2º	86	Silva	32	Jesus	Silva
3º	52	Souza	22	Conceição	Souza
4º	46	Oliveira	20	Santana	Jesus
5º	32	Jesus	10	Batista	Oliveira
6º	23	Pereira	10	Reis	Santana
7º	22	Conceição	6	Nascimento	Lima
8º	20	Ferreira	6	Cruz	Nascimento
9º	20	Santana	5	Bomfim	Conceição
10º	19	Lima	5	Xavier	Pereira

* = Tavares-Neto & Azevedo, 1977

Comparando os sobrenomes de conotação religiosa encontrados entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 deste estudo, com aqueles encontrados em uma amostra da população geral de Salvador – BA, não infectada pelo HIV-1 (Machado, 2008 – comunicação pessoal), encontrou-se uma concordância de 80% entre os sobrenomes, sendo diferente apenas os sobrenomes Bispo e Anjos, que mais freqüentes na população não infectada de Salvador e Bomfim e Xavier mais freqüentes na população infectada pelo HIV-1 da Bahia. Isto sugere que os tipos de sobrenomes encontrados foram os preferencialmente adotados pelos escravos libertos da Bahia (Tabela 6).

TABELA 6 – Comparação entre os sobrenomes de conotação religiosa encontrados mais frequentemente em uma amostra da população geral de Salvador –BA e numa amostra de indivíduos infectados pelo HIV-1 do estado da Bahia.

População Geral de Salvador*	Infectados pelo HIV-1 da Bahia
Santos	Santos
Jesus	Jesus
Santana	Conceição
Nascimento	Santana
Conceição	Batista
Bispo	Reis
Reis	Nascimento
Cruz	Cruz
Anjos	Bomfim
Batista	Xavier

* Machado, 2008 – comunicação pessoal

Comparou-se os tipos de sobrenomes encontrados nesta amostra e a classificação fenotípica baseada nos caracteres físicos destes indivíduos. Foi avaliada a presença de sobrenome de conotação religiosa dentre os fenótipos identificados. Além disso, foi realizada uma estimativa de mistura entre esses fenótipos considerando a presença e a ausência de sobrenome de conotação religiosa para avaliarmos a contribuição de marcadores africanos. Os resultados desta análise estão sumarizados na Tabela 7 e no gráfico da Figura 1, abaixo.

TABELA 7 – Sobrenomes de conotação religiosa x classificação fenotípica x % de marcadores africanos.

Classificação Fenotípica	N	Sobrenomes Religiosos		Marcadores africanos (%)
		Sim (%)	Não (%)	
Branco	88	27 (30,7)	61 (69,3)	32
Mulato Claro	97	43 (44,3)	54 (55,7)	37
Mulato Médio	228	132 (57,9)	96 (42,1)	47
Mulato Escuro	72	50 (69,4)	22 (30,6)	61
Negro	22	16 (72,7)	6 (27,3)	64

A estimativa de mistura realizada entre os indivíduos com sobrenome de conotação religiosa e entre os que não possuíam esse tipo de sobrenome foi inversamente proporcional, ou seja, houve um aumento de marcadores africanos à medida que aumentava o fenótipo “negróide” entre os indivíduos com sobrenome religioso e o inverso aconteceu dentre os indivíduos que não carregavam esse tipo de sobrenome (Figura 1).

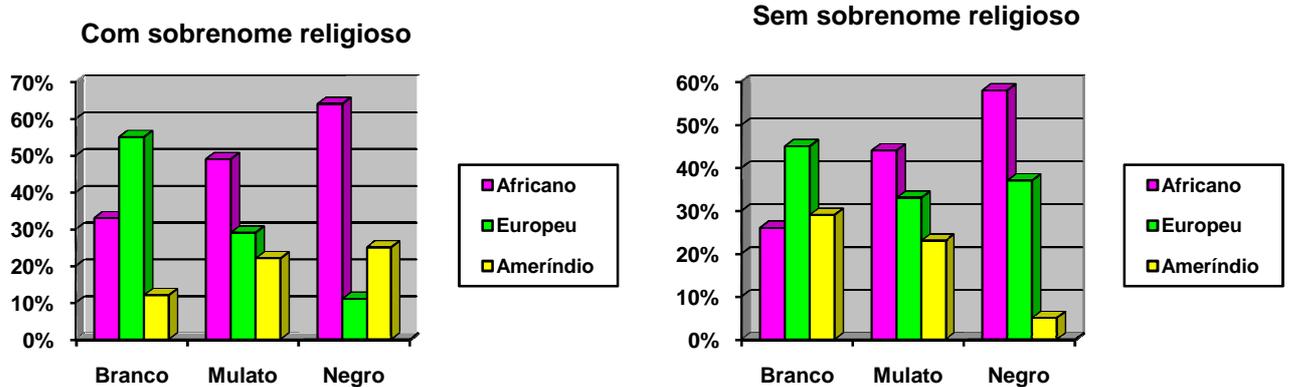


Figura 1 – Estimativa de mistura gênica entre indivíduos com sobrenome de conotação religiosa e sem esse tipo de sobrenome.

Com relação ao sobrenome de conotação religiosa, observou-se que em 72,7% dos indivíduos classificados fenotipicamente como negro, apresentavam pelo menos 1 sobrenome deste tipo, seguidos pelos considerados mulato escuro (69,4%), mulato médio (57,9%), mulato claro (44,3%), e brancos (30,7%). Já dentre os indivíduos que não possuíam nenhum sobrenome de conotação religiosa, a relação foi inversa, sendo maior a proporção de brancos (69,3%) e menor a de negros (27,3%).

Agrupando os indivíduos caracterizados na análise fenotípica e que possuíam sobrenome de conotação religiosa em afro-descendentes e não afro-descendentes encontrou-se, como esperado, uma proporção de marcadores africanos maior entre os considerados afro-descendentes e uma proporção de marcadores europeus maior entre os não afro-descendentes como visualizados na Figura 2.

Estes resultados corroboram os dados históricos e genéticos da formação da população da Bahia e demonstra que o uso de sobrenome é uma ferramenta útil para estimar mistura racial nesta população.

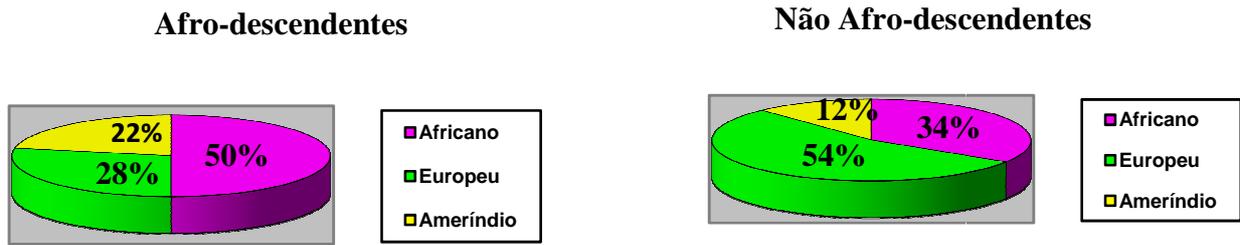


Figura 2 – Estimativa de mistura dos indivíduos infectados pelo HIV-1 com sobrenome de conotação religiosa agrupados como afro-descendentes e não afro-descendentes ..

Além disso, o grande percentual de indivíduos considerados mulatos tanto na ancestralidade auto referida quanto na análise fenotípica, confirma claramente a mistura ocorrida entre os ascendentes formadores da população da Bahia e indica que independente da pigmentação da pele, as demais características físicas utilizadas na identificação do fenótipo dos indivíduos e análises dos nomes de famílias são extremamente relevantes, pois refletem também as proporções de marcadores africanos, europeus e ameríndios que estão delineando o perfil dessa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, E. Características Antropogenéticas da População da Bahia, Brasil. **LGM - 047**, 1979.

AZEVEDO, E.S.; FORTUNA, C.M.M.; SILVA, K.M.C.; SOUSA, M.G.F; MACHADO, M.A.; LIMA, A.M.V.M.D; AGUIAR, M.E.; ABÉ, K.; EULÁLIO, M.C.M.N.; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, M.C.B.O.; SANTOS, M.G. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Human Biology**. 54:329-341. 1982.

AZEVEDO, E. S; FORTUNA, C.M.M. The reconstruction of cultural history and racial admixture from the meaning of family names in Bahia, Brazil. **Quaderni di Semantica**. v. 4, n. 1, p. 209-212. 1983.

BARBOSA, A.A.L.; CAVALLI, I.J; ABÉ K.; SANTOS, M.G.; AZEVEDO, E.S.; Family names and the length of the Y chromosome in Brazilian blacks. **Braz. J. Genet.** v. 20 n. 1 Ribeirão Preto. 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA - IBGE. **Brasil: 500** Anos de Povoamento. Rio de Janeiro. 2000. Disponível em: < www.ibge.gov.br>. Acesso em 15 de março de 2006.

JUNQUEIRA, P.C.; WISHART, P.J. Distribuição dos grupos sanguíneos ABO em brancos, mulatos e pretos do Rio de Janeiro, de acordo com a presença ou ausência de sobrenome. **Ver. Clin.** São Paulo 34:79-83. 1958.

SHRIVER, M.D.; PARRA, E.J.; DIOS S.; BONILLA, C.; NORTON, H.; JOVEL, C.; PFAFF, C.; JONES, C.; MASSAC, A.; CAMERON, N.; BARON, A.; JACKSON, T.; ARGYROPOULOS, G.; J.I.N, L.; HOGGART, C.J.; MCKEIGUE, P.M.; KITTLES, R.A. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Hum Genet.** 112(4):387-99. Epub 2003 Feb 11. Apr 2003.

TAVARES-NETO, J.; AZEVEDO, E.S. Racial origin and historical aspects of family names in Bahia, Brazil. **Human Biology**. 49 (3): 287-299. 1977.

5.0 CONCLUSÃO

As análises de 10 marcadores específicos de ancestralidade numa população infectada pelo HIV-1 do estado da Bahia mostraram que prevalece uma maior proporção de marcadores africanos nos indivíduos caracterizados neste estudo, seguidos de proporções europeias e ameríndias.

Os *loci* analisados apresentaram excessos de homozigotos para tanto a presença quanto para a ausência das inserções *Alu* investigadas e o excesso de heterozigoto entre os *SNP FYnull*, *GC-S* e *CYP3A4*, provocando a não aderência desses marcadores ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, isto pode ter sido ocasionado pela coleta não aleatória das amostras. Uma explicação alternativa com relação ao excesso de homozigotos é a ocorrência de casamento preferencial no mesmo grupo étnico, favorecendo a manutenção de determinado genótipo na população.

Analisando a autodenominação e a classificação fenotípica, encontramos percentuais diferentes de indivíduos considerados como negros, sendo 33,6% por auto referência e 4,3% por análise fenotípica. Nessa amostra houve um predomínio de indivíduos classificados como mulatos, tanto por autodenominação como pela classificação fenotípica (49,2% e 89,2%, respectivamente).

As estimativas de mistura realizadas nas populações infectada pelo HIV-1 e não infectada apontaram um predomínio de marcadores africanos, seguidos de marcadores europeus e ameríndios. Contudo a porcentagem de marcadores africanos na população de Salvador foi maior do que a observada na população infectada pelo HIV-1 da Bahia isto pode ser explicado porque esta população é composta por indivíduos naturais de Salvador e também de outras cidades do interior da Bahia e dados de análise fenotípica demonstraram que, quanto maior a distância do litoral, menor é a proporção de mistura com negros e maior contribuição europeia e ameríndia (Azevedo *et al*, 1982).

A análise de nomes de família mostrou um aumento na frequência de sobrenome de conotação religiosa com o aumento do fenótipo “negróide”, comprovando a importância e acurácia dessa ferramenta em estimativas de ancestralidade.

As análises dos marcadores de susceptibilidade ao HIV/AIDS (*CCR5* e *CCR2*) apresentaram frequências similares com outro estudo realizado na população da Bahia (Grimaldi, 2006) e não diferem das frequências descritas nas populações africanas e portuguesas encontradas na literatura, evidenciando a contribuição dessas duas populações na formação da população da Bahia.

A proporção de contribuição africana foi maior tanto nos indivíduos com menor nível de escolaridade como nos indivíduos que ganham até três salários mínimos, sugerindo que a população com menor escolaridade e mais pobre é mais vulnerável ao HIV/AIDS.

Na amostra de infectados pelo HIV-1 da Bahia, encontrou-se uma maior proporção de marcadores africanos entre os indivíduos considerados RP (rápidos progressores), quando comparados aos TP (típicos progressores). Isto sugere que a ancestralidade pode está associada com a progressão da doença, não diretamente aos marcadores de ancestralidade, mas uma vez que o curso clínico da infecção pelo HIV-1 é delineado por interações complexas vírus x hospedeiro, essas relações podem ser mais ou menos favoráveis em um determinado grupo étnico que em outro, acelerando ou retardando a progressão para a AIDS.

Esses resultados demonstram a importância da caracterização biológica de indivíduos oriundos de populações miscigenadas quanto à ancestralidade, uma vez que os dados mais frequentemente disponíveis são originados de censos demográficos baseados em classificação auto referida. Estes dados apontaram uma proporção de 77,5% de indivíduos considerados afro-descendentes na população da Bahia (IBGE, 2000). Os dados genéticos obtidos neste trabalho evidenciaram que valores como os do IBGE estão superestimados e não refletem a proporção de mistura na população. A estimativa de mistura baseada em marcadores biológicos é mais precisa e reflete mais fidedignamente o perfil das populações.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÉ-SANDES, K.; SILVA, W.A. Jr; ZAGO, M.A. Heterogeneity of the Y chromosome in AfroBrazilian populations. **Hum Biol.** 76(1):77-86. 2004.

ACOSTA, AX; GRIMALDI, RS; SPÍNOLA, JL; GALVÃO-CASTRO, B. Distribution of the CCR2-64I allele in three Brazilian ethnic groups. **Genetics and Molecular Biology**, 26, 3, 241-243, 2003.

ALVES, C.; FORTUNA, C.M.M.; TORALLES, M.B. A aplicação e o conceito de raça em saúde pública: Definições, controvérsias e sugestões para uniformizar sua utilização em pesquisas biomédicas e na prática clínica. **Gazeta Médica da Bahia**, 75 (1): Jan-Jun;92-115, 2005.

ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS M.; GUIMARÃES, P.E.; FERREIRA, A.C.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.; PRADO, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet.** 67(2):444-61. 2000.

ARCOT, S.S.; ADAMSON, A.W.; RISCH, G.W.; LAFLEUR, J.; ROBICHAUX, M.B.; LAMERDIN, J.E.; CARRANO, A.V.; BATZER, M.A. High-resolution cartography of recently integrated human chromosome 19-specific Alu fossils. **J Mol Biol.** 4;281(5):843-56. Sep 1998.

AZEVEDO, E. Características Antropogenéticas da População da Bahia, Brasil. **LGM - 047**, 1979.

AZEVEDO, E.S.; FORTUNA, C.M.M.; SILVA, K.M.C.; SOUSA, M.G.F.; MACHADO, M.A.; LIMA, A.M.V.M.D; AGUIAR, M.E.; ABÉ, K.; EULÁLIO, M.C.M.N.; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, M.C.B.O.; SANTOS, M.G. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Human Biology.** 54:329-341. 1982.

AZEVEDO, E. S; FORTUNA, C.M.M. The reconstruction of cultural history and racial admixture from the meaning of family names in Bahia, Brazil. **Quaderni di Semantica.** v. 4, n. 1, p. 209-212. 1983.

AZEVEDO, E.S.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; FREIRE-MAIA, N.; FORTUNA, C.M.M.; ABÉ, K; SANTOS, M.G.; BARBOSA, A.A.L.; SILVA, M.E.T.; COSTA, A.F. Mating types in a mixed and multicultural population of Salvador, Brazil.. **Ver Brasil Genet IX.** 3. 487-496. 1986.

AZEVEDO, E.S.; SILVA, M.C.B.O.; SOUSA, M.G.F.; FREIRE, N.B.V.M.; CARVALHO, R.D.S.; MELO, M.C.A.; DIAS-LIMA, A.M.V.M. Forças econômicas e

estrutura genética de populações nordestinas. **Interciência SEP-OCT, Vol.12, nº 5, 1987**

BANNWARTH, S.; GATIGNOL, A. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. **Curr HIV Res.** Jan;3(1):61-71. 2005.

BARBOSA, A.A.L.; CAVALLI, I.J.; ABÉ K.; SANTOS, M.G.; AZEVEDO, E.S.; Family names and the length of the Y chromosome in Brazilian blacks. **Braz. J. Genet.** v. 20 n. 1 Ribeirão Preto. 1997.

BARBOSA, A.A.L.; SOUSA, S.M.B.; ABÉ-SANDES, K.; ALONSO, C.A.; SCHNEIDER, V.; COSTA, D.C.C.; CAVALLI, I.J.; AZEVÊDO, E.E.S. Microsatellite studies on an isolated population of African descent in the Brazilian state of Bahia **Genetics and Molecular Biology**.29. 1. 23-30. 2006.

BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. A human-specific subfamily of Alu sequences. **Genomics**, Mar; 9(3):481-7, 1991.

BATZER, M.A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D.H.; SHAIKH, T.H.; NOVICK, G.E.; IOANNOU, P.A.; SCHEER, W.D.; HERRERA, R.J. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 6;91(25):12288-92. 1994.

BENTWICH, Z.; MAARTENS, G.; TORTEN, D.; LA, A.A.; LAL, R.B. Concurrent infections and HIV pathogenesis. **AIDS**, 14: 2071-2081, 2000.

BLANPAIN, C.; LEE, B.; TACKOEN, M.; PUFFER, B.; BOOM, A.; LIBERT, F.; SHARRON, M.; WITTAMER, V.; VASSART, G.; DOMS, R.W.; PARMENTIER, M. Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations. **Blood**;96(5):1638-1645, 2000.

BORTOLINI, M.C.; SILVA-JUNIOR, A.W.; WEIMER, T.A.; ZAGO, M.A.; CASTRO-DE-GUERRA; SCHNEIDER, M.P.; LAYRISSE, Z.; MENDEZ-CASTELLANO, H.; SALZANO, F.M.H. Protein and hypervariable tandem repeat diversity in eight African-derived South American populations. Inferred relationships do not coincide. **Human Biology**. v. 70. n. 3. p. 443-461. 1998.

BRAUN, A.; BICHLMAIER, R.; CLEVE, H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. **Hum. Genet.** 89: 401-406, 1992.

BURCHARD, E.G.; ZIV, E.; COYLE, N.; GOMEZ, S.L.; TANG, H.; KARTER, A.J.; MOUNTAIN, J.L.; PEREZ-STABLE, E.J.; SHEPPARD, D.; RISCH, N.; the importance of race and ethnic background in biomedical and clinical practice. **New England Journal Med** 348:1170-75, 2003)

CALLEGARI-JACQUES, SM and SALZANO, FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciênc Cult**.51:166-174. 1999.

CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Hum Genet**. 68:281–286. 2001.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. **The history and geography of human genes**, Princeton, NJ: Princeton University Press. 1994.

CHAKRABORTY, R. Gene identity in racial hybrids and estimation of admixture rates. In Ahuja YR, Neel JV, editors. Genetic differentiation in human and others animal populations. **Indian Anthropological Association**. 171-180. 1985.

CHAKRABORTY, R.; KAMBOH, M.I.; FERRELL, R.E. “Unique” alleles in admixed populations: a strategy for determining hereditary population differences of disease frequencies. **Ethn Dis**. 1:245-256. 1991.

CHAKRABORTY, R.; KAMBOH, M.I.; NWANKWO, M.; FERRELL, R.E. Caucasian genes in American blacks: new data. **Am J Hum Genet**. 50:145-155. 1992.

COFFIN, J.M. HIV population dynamics in vivo: Implications for genetics variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, v.270: 1811-489, 1995.

COHEN, O.J.; WEISSMAN, D.; FAUCCI, A.S. the immunopathogenesis of HIV infection. In: Fundamental immunology, 4 ed. Philadelphia: William E Paul. Lippincott-Raven, 1999.

COTRIM, N.H. **Variabilidade genética das inserções de Alu em remanescentes de Quilombos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto. SP, 2003.

DAIGER, S. P.; SCHANFIELD, M. S.; CAVALLI-SFORZA, L. L. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. **Proc. Nat. Acad. Sci**. 72: 2076-2080, 1975.

DAWSON, D.M.; EPPENBERGER, H.M.; EPPENBERGER, M.E. Multiple molecular forms of creatine kinases. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 151: 616-626, 1968.

DE RODA HUSMAN, A.M.; KOOT, M.; CORNELISSEN, M.; KEET, I. P.; BROUWER, M.; BROERSEN, S. M.; BAKKER, M.; ROOS, M. T.; PRINS, M.; DE WOLF, F.; COUTINHO, R. A.; MIEDEMA, F.; GOUDSMIT, J.; SCHUITEMAKER, H. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. **Ann Intern Med**;127:882-90. 1997.

DEAN, M.; STEPHENS, J. C.; WINKLER, C.; LOMB, D. A.; RAMSBURG, M.; BOAZE, R.; STEWART, C.; CHARBONNEAU, L.; GOLDMAN, D.; ALBAUGH, B. J.; GOEDERT, J. J.; BEASLEY, R. P.; HWANG, L-Y.; BUCHBINDER, S.; WEEDON, M.; JOHNSON, P.; EICHELBERGER, M. & O'BRIEN, S. J. Polymorphic admixture typing in human ethnic populations. **Am J Hum Genet**, 55:788-808, 1994.

DEKA, R.; JIN, L.; SHRIVER, M.D.; YU, L.M.; DECROO, S.; HUNDRIESER, J.; BUNKER, C.H. Population genetics of dinucleotide (dC-dA)_n/(dG-dT)_n polymorphisms in world populations. **Am J Hum Genet**. 56:461-474. 1995.

DONAHUE, R.P.; BIAS, W.B.; RENWICK, J.H.; MCKUSICK, V.A. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 61: 949-955. 1968.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L.C; BARRETO, M.L.; TEIZIRA, M.DA G.; GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-1 In The General Population of Salvador, Brasil. A City With African Ethnich And Socio Demographic Characteristics, 2003.

FAUCI A. S.; Pantaleo G.; Stanley S.; Weisman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Ann. Intern. Med.**, 124:654-663, 1996.

FUNKE, H.; KLUG, J.; ASSMANN, G. Hind III RFLP in the lipoprotein lipase gene, (LPL). **Nucleic Acids Res.** 15: 9102, 1987.

GRIMALDI, R. – **Caracterização genética dos receptores de quimiocina CCR5 e CCR2, e da quimiocina SDF-1, em populações afro-descendentes, caucasóides e ameríndia no Brasil.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular - programa de pós-graduação *strictu sensu* da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz), 2006.

GRIMALDI R, SHINDO N, ACOSTA AX, DOURADO I, BRITES C, DE MELO CARVALHO O, BRITO I, BOU-HABIB DC, GALVÃO-CASTRO B. Prevalence of the CCR5Delta32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. **Human Genetics**. Jul;111(1):102-4, 2002.

HADLEY, T.J.; DAVID, P.H.; MCGINNISS, M.H.; MILLER, L.H. Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fy-a antigen. **Science**. 223: 597-599. 1984.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. Average heterozygosity per locus in man: an estimate based on the incidence of enzyme polymorphisms. **Ann Hum Genet** 36:9-20. 1972.

HENDEL H, HENON N, LEBUANEC H, LACHGAR A, PONCELET H, CAILLAT-ZUCMAN S, WINKLER CA, SMITH MW, KENEFIC L, O'BRIEN S, LU W, ANDRIEU JM, ZAGURY D, SCHACHTER F, RAPPAPORT J, ZAGURY JF. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**. Dec 1;19(4):381-6, 1998.

HOGGART, C. J.; PARRA, E. J.; SHRIVER, M. D.; BONILLA, C.; KITTLES, R. A.; CLAYTON, D. G.; MCKEIGUE, P. M. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. **Am J Hum Genet**. 72(6):1492-1504, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA - IBGE. **Brasil: 500 Anos de Povoamento**. Rio de Janeiro. 2000. Disponível em: < www.ibge.gov.br>. Acesso em 15 de março de 2006.

JUNQUEIRA, P.C.; WISHART, P.J. Distribuição dos grupos sanguíneos ABO em brancos, mulatos e pretos do Rio de Janeiro, de acordo com a presença ou ausência de sobrenome. **Ver. Clin**. São Paulo 34:79-83. 1958.

KARATHANASIS, S. K.; ZANNIS, V. I.; BRESLOW, J. L. Characterization of the apolipoprotein A-I-C-III gene complex. **Methods Enzymol**,128:712-26, 1986.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucl. Ac. Res**. 19; S444, 1991.

LEHMANN, J. M.; MCKEE, D. D.; WATSON, M. A.; WILLSON, T. M.; MOORE, J. T.; KLIEWER, S. A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. **J. Clin. Invest**. 102: 1016-1023, 1998

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: software for the analysis of discrete genetic data. Version 1.0. 1997.

LI, S.; OKA, K.; GALTON, D.; STOCKS, J. PVU-II RFLP at the human lipoprotein lipase (LPL) gene locus. **Nucleic Acids Res**. 16: 2358, 1988.

LINDBÄCK, S.; KARLSSON, A.; MITTLER, J.; BLAXTHULT, A.; CARLSSON, M.; GUNNAR, B.; SÖNNERBORG, A.; GAINESS, H. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. **AIDS**, 14: 2283-2291, 2000.

LIU, Y.; SAHA, N.; LOW, P.S.; TAY, J.S. Linkage disequilibrium between two loci (5' untranslated exon 1 and intron 5-DdeI) of the antithrombin III gene in three ethnic groups in Singapore. **Hum Hered**.45(4):192-8. Jul-Aug 1995.

LIU, R.; PAXTON, W. A.; LANDAU, N. R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**;86: 367-77. 1996.

MAGIEROWSKA M, THEODOROU I, DEBRE P, SANSON F, AUTRAN B, RIVIERE Y, CHARRON D, COSTAGLIOLA D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. **Blood**. Feb 1;93(3):936-41, 1999.

MARMOR, M.; HERTZMARK, K.; THOMAS, M.; HALKITIS, P.N.; VOGLER, M. Resistance to HIV infection. **J Urban Health**, January, 83 (1): 5-17, 2006.

MAZZUCHELLI R, CORVASCE S, VIOLIN M, RIVA C, BIANCHI R, DEHO L, VELLECA R, CIBELLA J, BADA M, MORONI M, GALLI M, BALOTTA C. Role of CCR5, CCR2 and SDF-1 gene polymorphisms in a population of HIV-1 infected individuals. **J Biol Regul Homeost Agents** Jul-Sep;15(3):265-71, 2001.

MCDERMOTT, D.H.; ZIMMERMAN, P.A.; GUIGNARD, F.; KLEEBEREGGER, C.A.; LEITMAN, S.F.; MACS AND MURPHY, P.M. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. **The Lancet**;352:866-870, 1998.

MENDES-JUNIOR, C.T.; SIMÕES, A.L. Alu insertions and ethnic composition in a Brazilian population sample. **IJHG** 1 (4): 249-254, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS E DST**. Ano 1, nº 1, semanas epidemiológicas. Janeiro a Junho, 2003; 2004.

MUMMIDI, S.; AHUJA, S. S.; GONZALES, E.; ANDERSON, S. A.; SANTIAGO, E. N.; STEPHAN, K. T.; CRAIG, F. E.; O'CONNEL, P.; TRYON, V.; CLARK, R. A.; DOLAN, M.J.; AHUJA, S. K. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. **Nature Med**;4:786-793, 1998.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press. 512p. 1987

NEEL, J.V. "Private" genetic variants and the frequency of mutation among South American Indians. **Proc. Natl. Acad USA**, 70:3311-3315, 1973

O'BRIEN. S.J. AIDS: a role for host genes. **Hosp Pract (Off Ed)**; 15; 33(7):53-6, 59-60, 66-7passim, 1998.

OTA, T. **DISPAN**: genetic distance and phylogenetic analysis. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The University of Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. 1993.

PARRA, E.J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M.A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D.B.; DEKA, R.; FERRELL, R.E.; SHRIVER, M.D. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. **Am J Hum Genet**. 63(6):1839-51. 1998.

PARRA, E.J.; KITTLES, R.A.; ARGYROPOULOS, G.; PFAFF, C.L.; HIESTER, K.; BONILLA, C.; SYLVESTER, N.; PARRISH-GAUSE, D.; GARVEY, W.T.; JIN, L., MCKEIGUE, P.M.; KAMBOH, M.I.; FERRELL, R.E.; POLLITZER, W.S.; SHRIVER, M.D. Ancestral proportions and admixture dynamics in geographically defined African Americans living in South Carolina. **Am J Phys Anthropol**. 114(1):18-29. 2001.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 7;100(1):177-82. 2003.

PENA, S.D.J. Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**. v.12, n.1, p.321-46. 2005.

PRADO, J.F.A. Primeiros povoadores do Brasil 1500-1530. **Comp. Ed. Nac. São Paulo, Brasil**, 1935.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. 155:945-959. 2000.

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

REED, T.E. Number of gene loci required for accurate estimation of ancestral population proportions in individual human hybrids. **Nature**. 244:575-576. 1973.

ROBERTS, J.D.; BENBENEK, K.; KUNNEL, T.A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Nature**, v.242: 1171-1173, 1988.

SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B. J. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. **Nature**;382: 722-25, 1996.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17:914-21, 1994.

SHRIVER, M.D.; SMITH, M.W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J.M.; DEKA, R.; FERRELL, R.E. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **Am J Hum Genet**. 60(4):957-64. 1997.

SHRIVER, M.D.; PARRA, E.J.; DIOS S.; BONILLA, C.; NORTON, H.; JOVEL, C.; PFAFF, C.; JONES, C.; MASSAC, A.; CAMERON, N.; BARON, A.; JACKSON, T.; ARGYROPOULOS, G.; J.I.N, L.; HOGGART, C.J.; MCKEIGUE, P.M.; KITTLES, R.A. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Hum Genet**.112(4):387-99. Epub 2003 Feb 11. Apr 2003.

SILVA JR, W.A.; BORTOLINI, M.C.; MEYER, D.; SALZANO, F.M.; SCHNEIDER, M.P.C.; ELION, J.; KRISHNAMOORTHY, R.; GUERRA, D.C.; LAYRISSE, Z.; CASTELLANO, H.M.; WEIMER, T.A.; ZAGO, M.A. Genetic diversity of two african and sixteen South American populations determined on the basis os six hypervariable loci. **American Journal of Physical Anthropology**. v. 109, p. 425-437, 1999.

SILVA, W.A. JR.; BONATTO, S.L.; HOLANDA, A.J.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; PAIXAO, B.M.; GOLDMAN, G.H.; ABÉ-SANDES, K.; RODRIGUEZ-DELFIN L; BARBOSA, M.; PACO-LARSON, M.L.; PETZL-ERLER, M.L.; VALENTE, V.; SANTOS, S.E.; ZAGO, M.A. Mitochondrial genome diversity of native americans supports a single early entry of founder populations into America. **Am J Hum Genet** 71(1):187-92. 2002. Comment in: **Am J Hum Genet**.;72(5):1341-6. May 2003.

SIMMONDS, P.; BALF, P.; LUDIEM, C.A.; BISHOP, J.O.; LEIGH-BROW, A.J. Analysis of sequence diversity in hipervariable regions of glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. **J.Virol**, v.64: 1329-87, 1990.

SMITH, M.W.; DEAN, M.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; HUTTLEY, G. A.; LOMB, D. A.; O'BRIEN. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. **Science**;277:959-965. 1997.

STEPANOV, V.A.; LEMZA, S.V. PvuII restriction fragment length polymorphism of lipoprotein lipase in Russians. **Hum Hered**.43(6):388-90. Nov-Dec 1993.

STEPHENS, J.C.; BRISCOE, D.; O'BRIEN, S.J. Mapping by admixture linkage disequilibrium in human populations: limits and guidelines. **Am J Hum Genet**. 55:809-824. 1994.

TAVARES-NETO, J.; AZEVEDO, E.S. Racial origin and historical aspects of family names in Bahia, Brazil. **Human Biology**. 49 (3): 287-299. 1977.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; COSTA, M. C. N.; STRINA, A.; MARTINS, D. F.; PRADO, M. *Sentinel areas: a monitoring strategy in public health*. **Caderno de Saúde Pública**, 18 (5):1189-95, 2002.

TOMAS, G.; SECO, L.; SEIXAS, S.; FAUSTINO, P.; LAVINHA, J.; ROCHA, J. The peopling of Sao Tome (Gulf of Guinea): origins of slave settlers and admixture with the Portuguese. **Hum Biol**. 74(3):397-411. 2002.

TOURNAMILLE, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nature Genet**. 10: 224-228. 1995.

UNAIDS/WHO, Uniting the world against AIDS. Organization health world, 2006. Disponível em <http://www.unaids.org>.

VIANA FILHO L. **O negro na Bahia**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.1988.

WATKINS, W.S.; RICKER, C.E.; BAMSHAD, M.J.; CARROLL, M.L.; NGUYEN, S.V.; BATZER, M.A.; HARPENDING, H.C.; ROGERS, A.R.; JORDE, L.B. Patterns of ancestral human diversity: an analysis of Alu-insertion and restriction-site polymorphisms. **Am J Hum Genet**. 68(3):738-52. Mar 2001.

WITKE, F. W.; GIBBS, P. E. M.; ZIELINSKI, R.; YANG, F.; BOWMAN, B. H.; DUGAICZYK, A. Complete structure of the human Gc gene: differences and similarities between members of the albumin gene family. **Genomics** 16: 751-754, 1993.

WITZIG, R.; The medicalization os race: scientific legitimization of a flawed social construct. **Ann Inter Med** 125: 675-9, 1996

WRIGHTON, S.A.; STEVENS, J.C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. **Crit. Rev. Toxicol.** 22: 1-21, 1992.

APÊNDICES



Ministério da Saúde
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Caracterização étnica/geográfica da população de Salvador e de portadores do HIV-1 e a correlação entre o índice de ancestralidade africana e a vulnerabilidade a HIV/AIDS

Pesquisadores Responsáveis:

Dr. Bernardo Galvão Castro-Filho	Laboratório Avançado em Saúde Pública –Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ (3176-2246)
Dra. Kiyoko Abé Sandes	
Dr. Carlos Brites	Chefe do Laboratório de Retrovírus do Hospital Universitário Edgard Santos - HUPES

Propósito e Revisão Geral

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) de um projeto de pesquisa sobre a contribuição dos índios, dos africanos e europeus na formação da nossa população. Para isto estudaremos algumas características herdadas com o objetivo de estimar o grau de mistura étnica em portadores do HIV (vírus da AIDS) e em indivíduos não portadores deste vírus da população de Salvador. Para caracterização étnica não será analisada nenhuma característica relacionada à doença, estudaremos apenas variações no material genético consideradas como normais. Além disso, estudaremos também a resistência à infecção causada pelo HIV e desenvolvimento de AIDS, a partir da análise de alguns fatores biológicos envolvidos com a entrada do vírus nas células do indivíduo, e com a maneira como esse vírus se propaga no organismo do paciente infectado.

Para os indivíduos que concordarem em participar desta pesquisa será aplicado um questionário para coleta de dados pessoais e realizada a coleta de 5ml de sangue periférico (quando necessário), utilizando material apropriado (tubos e agulhas estéreis e descartáveis). Essa coleta poderá provocar desconforto temporário causado pela picada de agulha, queimor, e, muito raramente, hematoma e infecção. O material coletado será processado e analisado no Laboratório de Avançado de Saúde Pública da FIOCRUZ.

Após a investigação laboratorial, os médicos assistentes serão comunicados sobre os resultados das análises, os quais repassarão aos participantes os esclarecimentos necessários. Gostaríamos ainda de esclarecer que a não concordância em participar deste estudo não implicará em nenhum prejuízo referente ao seu acompanhamento médico.

Este estudo possibilitará uma descrição das características étnicas da nossa população e conhecer como determinados indivíduos, com AIDS ficam doentes mais rapidamente do que outros, bem como o não desenvolvimento dessa doença.

Resumindo, essas informações poderão oferecer melhor orientação quanto à prevenção e estratégias de tratamento.

Consentimento

Eu recebi uma cópia desse consentimento, e tenho o direito de negar ou desistir de participar desse estudo em qualquer momento sem qualquer prejuízo para os cuidados a mim dispensados. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu _____, R.G. _____ reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar desse estudo, e estou ciente que tenho:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. O conhecimento de que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

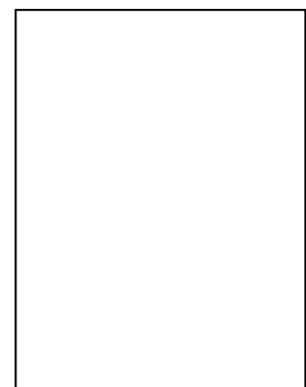
Salvador, _____ de _____ de 200__

Participante

Pesquisador Responsável

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____



Polegar direito

Projeto - Caracterização étnica/ geográfica de portadores do HIV-1 e a correlação entre o índice de ancestralidade africana e vulnerabilidade a HIV/ AIDS.

Questionário

A – CARACTERIZAÇÃO DA ENTREVISTA/ENTREVISTADOR

1.	Data da entrevista	Entrevistador(a)
----	---------------------------	-------------------------

B – CARACTERIZAÇÃO ENTREVISTADO

2.	Nome do paciente : _____ Filiação Biológica: 1. Sim 2. Não 3. Não Sabe Nome do Pai: _____ Nome da Mãe: _____		
3.	Data de Nascimento:	Número do prontuário:	
4.	Sexo: 1. Feminino 2. Masculino		
5.	Endereço:		
6.	Ponto de referência:		
7.	Bairro (comunidade):		
8.	Fone(s) p/ contato (1):	(2):	(3):
9.	Estado civil 1. solteiro(a) 2. casado(a) 3. união livre (vivem juntos) 4. separado/divorciado(a) 5. viúvo(a) 0. Ignorado		
10.	Escolaridade 1. não sabe ler nem escrever 2. Sabe ler e escrever (ensino informal) 3. primário incompleto 4. Primário completo 5. ginásio incompleto (estudou entre a 5ª e 8ª série) 6. ginásio completo (8ª série completo) 7. 2º grau incompleto 8. 2º grau completo 9. superior incompleto 10. superior completo 0. Não sabe		
11.	Renda Familiar 1. Menos de 1 salário mínimo 3. De 4 a 6 salários 5. Acima de 10 salários	Mora com quantas pessoas: 2. De 1 a 3 Salários 4. De 7 a 10 salário 0. Não sabe informar	
12.	Profissão:		

C – CARACTERIZAÇÃO ÉTNICA DO PACIENTE

13.	Cor (Autodenominação): 1. Negro 2. Mulato/Moreno 3. Branco 0. Outros
14.	Cabelo (Textura): 1. Crespo 2. Ondulado 3. Liso
15.	Cabelo (Cor): 1. Preto 2. Castanho 3. Ruivo 4. Loiro

35.	Com que frequência ocorre a coleta do lixo? 1. Diária 4. Menos que uma vez por semana informar			2. Dia sim, dia não 5. De vez em quando			3. Uma vez por semana 6. Não é feita			0. Não sabe		
36.	Qual o material e o acabamento predominante (mais de 50%) das paredes externas da habitação 1. Alvenaria com revestimento 3. Madeira aparelhada 5. Madeira, lata ou papelão aproveitado 0. não sabe											
	2. Alvenaria sem revestimento						4. Taipa não revestida 6. Palha Outro material (especifique):					
37.	Este domicílio tem água canalizada para, pelo menos, um cômodo? 1. Sim 2. Não 0. Não sabe											
38.	Verificar a presença na habitação dos seguintes itens (indicar o número de peças para cada item, 0 se nenhuma):											
	Geladeira sem freezer						Geladeira com freezer, ou freezer					
	TV colorida						TV preto e branco					
	Rádio						Forno de microondas					
	Máquina de lavar roupa						Máquina de lavar louça					
	Telefone fixo (número de linhas)						Telefone celular					
	Aparelho de videocassete						Filmadora vídeo					
	Carro para uso privado						Aparelho de DVD					
	ano do carro (do mais novo, se mais de 1)						Microcomputador					

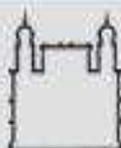
F – PARCEIRO E/OU FAMILIARES INFECTADOS

39.	Parceiro também infectado 1. Sim 2. Não 9. Não sabe informar											
40.	Em caso afirmativo, indicar forma de contaminação: 1. Heterossexual 2. Bissexual 3. Homossexual 4. Vertical 5. Sanguínea 6. UDEV 0. Não sabe informar											
41.	Especificar nome:											
42.	Familiar também infectado 1. Sim 2. Não 9. Não sabe informar											
43.	Em caso afirmativo, indicar forma de contaminação 1. Heterossexual 2. Bissexual 3. Homossexual 4. Vertical 5. Sanguínea 6. UDEV 0. Não sabe informar											
44.	Especificar nome e grau de parentesco:											

G – DADOS SOBRE INFECCÃO DO PACIENTE

45.	Exposição de Risco 1. Heterossexual 2. Bissexual 3. Homossexual 4. Vertical 5. Sanguínea 6. UDEV 0. Indeterminado											
46.	Data do Diagnóstico: _____ / _____ / _____ Métodos utilizados: 1. ELISA 2. Western Blot 3. Imunofluorescência 0. Indeterminado											
47.	Terapia antiretroviral: 1. Sim 2. Não 0. Indeterminado (Sim)Especifique: Íncio:											

ANEXOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 84/2006

Protocolo: 180

Projeto de Pesquisa: Caracterização étnica/geográfica da população de Salvador e de portadores do HIV-1 e a correlação entre o índice de ancestralidade africana e vulnerabilidade a HIV/AIDS

Pesquisador Responsável: Dr. Bernardo Galvão Castro Filho

Instituição ou Departamento: LASP/FIOCRUZ

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 20 de março de 2006

Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Coordenadora

CEP – CPqGM/FIOCRUZ

ANEXO A – Análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os loci do estudo.

Pop: PSA

Fis:					

LOCUS	P-val	S.E	W&C	R&H	Matr

AT3	0.3769	0.0094	-0.042	-0.043	-
APO	0.0034	0.0008	+0.133	+0.133	-
SB193	0.0000	0.0000	+0.207	+0.208	-
PV92	0.0000	0.0000	+0.227	+0.227	-
CCR2	0.1281	0.0028	-0.101	-0.101	-
FYNUL	0.0164	0.0033	+0.113	+0.113	-
CKMM	0.6803	0.0062	-0.023	-0.023	-
LPL	0.3998	0.0080	+0.040	+0.041	-
CYP3A4	0.0000	0.0000	+0.515	+0.516	-
CCR5	0.1940	0.0021	+0.077	+0.077	-
GC	0.0000	0.0000	-0.524	-0.429	-

All (Fisher's method) :

chi2 : Infinity

Df : 22

Prob: High. sign.

ANEXO B – Análise de associação par-a-par

Number of population detected: 1

Númer of loci detected: 11

Markov chain parameters

Dememorization: 1000

Batches: 100

Iterations per batch: 1000

Pop	Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.

PSA 01	AT3	APO	0.21888	0.01062
PSA 01	AT3	SB193	0.00012	0.00009
PSA 01	APO	SB193	0.01557	0.00229
PSA 01	AT3	PV92	0.14550	0.00930
PSA 01	APO	PV92	0.37446	0.01150
PSA 01	SB193	PV92	0.71331	0.01082
PSA 01	AT3	CCR2	0.49479	0.01041
PSA 01	APO	CCR2	0.58284	0.01012
PSA 01	SB193	CCR2	0.65891	0.00847
PSA 01	PV92	CCR2	0.14404	0.00797
PSA 01	AT3	FYNUL	0.00000	0.00000
PSA 01	APO	FYNUL	0.48219	0.01320

PSA 01	SB193	FYNUL	0.00000	0.00000
PSA 01	PV92	FYNUL	0.49677	0.01118
PSA 01	CCR2	FYNUL	0.27360	0.01080
PSA 01	AT3	CKMM	0.55228	0.01091
PSA 01	APO	CKMM	0.21457	0.01071
PSA 01	SB193	CKMM	0.94131	0.00391
PSA 01	PV92	CKMM	0.24988	0.01125
PSA 01	CCR2	CKMM	0.95170	0.00229
PSA 01	FYNUL	CKMM	0.11737	0.00935
PSA 01	AT3	LPL	0.00047	0.00039
PSA 01	APO	LPL	0.19348	0.00923
PSA 01	SB193	LPL	0.24663	0.01206
PSA 01	PV92	LPL	0.28623	0.01289
PSA 01	CCR2	LPL	0.98482	0.00101
PSA 01	FYNUL	LPL	0.00157	0.00072
PSA 01	CKMM	LPL	0.74582	0.00953
PSA 01	AT3	CYP3A4	0.19973	0.01100
PSA 01	APO	CYP3A4	0.59698	0.01211
PSA 01	SB193	CYP3A4	0.00000	0.00000
PSA 01	PV92	CYP3A4	0.87506	0.00556
PSA 01	CCR2	CYP3A4	0.16589	0.00844
PSA 01	FYNUL	CYP3A4	0.00011	0.00007
PSA 01	CKMM	CYP3A4	0.29132	0.01261
PSA 01	LPL	CYP3A4	0.12835	0.00752
PSA 01	AT3	CCR5	0.68601	0.00608
PSA 01	APO	CCR5	0.46005	0.00866
PSA 01	SB193	CCR5	0.69398	0.00601
PSA 01	PV92	CCR5	0.85328	0.00423
PSA 01	CCR2	CCR5	0.63746	0.00683
PSA 01	FYNUL	CCR5	0.63767	0.00658
PSA 01	CKMM	CCR5	0.62423	0.00702
PSA 01	LPL	CCR5	0.16055	0.00602
PSA 01	CYP3A4	CCR5	0.41214	0.00763
PSA 01	AT3	GC	0.01390	0.00266
PSA 01	APO	GC	0.17927	0.01084
PSA 01	SB193	GC	0.00000	0.00000
PSA 01	PV92	GC	0.04109	0.00509
PSA 01	CCR2	GC	0.34094	0.01227
PSA 01	FYNUL	GC	0.00959	0.00152
PSA 01	CKMM	GC	0.23211	0.01070
PSA 01	LPL	GC	0.02105	0.00313
PSA 01	CYP3A4	GC	0.00609	0.00204
PSA 01	CCR5	GC	0.09851	0.00673

ANEXO C – Análise do structure – Estruturação da população

 Proportion of membership of each pre-defined
 population in each of the 3 clusters

Given Pop	Inferred Clusters			Number of Individuals
	1	2	3	
1:	0.994	0.002	0.004	134
2:	0.003	0.979	0.018	107
3:	0.008	0.020	0.973	242
4:	0.377	0.348	0.275	517

 Final results printed to file C:\Documents and Settings\Joana\Meus documentos\Meus arquivos recebidos\HIV2\hiv2\Results\hiv2_run_1_f

ANEXO D – Análise do DISPAN – Diversidade da população

Input file: thais.dat at Thu Jan 03 14:44:40 2008

Average heterozygosity and its standard error

(population 1) 1: 0.419266 ñ 0.051281

(population 2) 2: 0.250301 ñ 0.059148

(population 3) 3: 0.270502 ñ 0.069709

(population 4) 4: 0.262827 ñ 0.064095

All loci Gst 0.301905 Ht 0.425042 Hs 0.296720

matrix: Standard genetic distances

	1	2	3
2	0.1674		
3	0.0918	0.4740	
4	0.2056	0.6566	0.1015

matrix: Standard error of standard genetic distances

	1	2	3
2	0.0661		
3	0.0426	0.1997	
4	0.0687	0.2131	0.0717

matrix: DA distances

	1	2	3
2	0.0882		
3	0.0617	0.2289	
4	0.0883	0.2562	0.0489

ANEXO E – Diferenciação gênica e genotípica entre as populações de Salvador e infectados pelo HIV-1 da Bahia

Genic differentiation for each population pair

File : 234131 (PSAHIV)

Number of populations: 2

Number of loci: 9

Markov chain parameters

Dememorization: 1000

Batches: 200

Iterations per batch: 1000

Locus: AT3

=====

Sub-Pop. Alleles 10 11 Total

PSA01 523 501 1024

107 926 1146 2072

Total 1449 1647 3096

Locus	Populations		Probability	S.E.
----	-----	-----	-----	-----
AT3	PSA01	& 107	0.00089	0.00055

Locus: APO

=====

Sub-Pop. Alleles 12 13 Total

PSA01 260 758 1018

107 565 1839 2404

Total 825 2597 3422

Locus	Populations		Probability	S.E.
----	-----	-----	-----	-----
APO	PSA01	& 107	0.20639	0.01108

Locus: SB193

=====

Sub-Pop. Alleles 14 15 Total

PSA01 336 698 1034
 107 805 1633 2438

Total 1141 2331 3472

Locus	Populations		Probability	S.E.
SB193	PSA01	& 107	0.79544	0.00829

Locus: PV92

Sub-Pop. Alleles 16 17 Total

PSA01 749 283 1032
 107 1776 596 2372

Total 2525 879 3404

Locus	Populations		Probability	S.E.
PV92	PSA01	& 107	0.15917	0.01093

Locus: FYNULL

Sub-Pop. Alleles 20 21 Total

PSA01 591 423 1014
 107 1312 1156 2468

Total 1903 1579 3482

Locus	Populations		Probability	S.E.
FYNULL	PSA01	& 107	0.00908	0.00261

Locus: CKMM

Sub-Pop. Alleles 22 23 Total

PSA01 715 309 1024
 107 1827 685 2512

Total 2542 994 3536

Locus	Populations		Probability	S.E.
-----	-----	-----	-----	-----
CKMM	PSA01	& 107	0.09282	0.00909

Locus: LPL

=====

Sub-Pop. Alleles 24 25 Total

PSA01	661	329	990
107	1614	564	2178
Total	2275	893	3168

Locus	Populations		Probability	S.E.
-----	-----	-----	-----	-----
LPL	PSA01	& 107	0.00019	0.00019

Locus: CYP3A4

=====

Sub-Pop. Alleles 26 27 Total

PSA01	455	397	852
107	925	851	1776
Total	1380	1248	2628

Locus	Populations		Probability	S.E.
-----	-----	-----	-----	-----
CYP3A4	PSA01	& 107	0.52589	0.01249

Locus: GC

=====

Sub-Pop. Alleles 30 31 32 Total

PSA01	220	227	469	916
107	530	550	1108	2188
Total	750	777	1577	3104

Locus	Populations		Probability	S.E.
-----	-----	-----	-----	-----
GC	PSA01	& 107	0.96217	0.00290

P-value for each population pair across all loci
(Fisher's method)

```

-----
Population pair      Chi2  df  P-value
-----
PSA01 & 107        53.931  18  0.00002
-----
    
```

Genotypic differentiation for each population pair

File:021633 (PSAHIV)

Number of populations detected: 2
 Number of loci detected: 9

Markov chain parameters
 Dememorization: 1000
Batches: 200
 Iterations per batch: 1000

Locus: AT3

```

=====
      Genotypes:
      -----
      10 10 11
Pop:   10 11 11 All
-----
PSA01   128 267 117 512
107     215 496 325 1036

All:    343 763 442 1548
    
```

Locus	Populations	P-value	S.E.
AT3	107 & PSA01	0.00076	0.00036

Locus: APO

```

=====
      Genotypes:
      -----
      12 12 13
Pop:   12 13 13 All
-----
PSA01   46 168 295 509
107     98 369 735 1202

All:    144 537 1030 1711
    
```

Locus	Populations	P-value	S.E.
APO	107 & PSA01		

APO 107 & PSA01 0.22690 0.01147

Locus: SB193

=====

Genotypes:

14 14 15

Pop: 14 15 15 All

PSA01 78 180 259 517

107 139 527 553 1219

All: 217 707 812 1736

Locus	Populations	P-value	S.E.
SB193	107 & PSA01	0.79121	0.00668

SB193 107 & PSA01 0.79121 0.00668

Locus: PV92

=====

Genotypes:

16 16 17

Pop: 16 17 17 All

PSA01 295 159 62 516

107 676 424 86 1186

All: 971 583 148 1702

Locus	Populations	P-value	S.E.
PV92	107 & PSA01	0.20202	0.01030

PV92 107 & PSA01 0.20202 0.01030

Locus: FYNULL

=====

Genotypes:

20 20 21

Pop: 20 21 21 All

PSA01 186 219 102 507

107 376 560 298 1234

All: 562 779 400 1741

Locus	Populations	P-value	S.E.
FYNULL	107 & PSA01	0.00540	0.00144

FYNULL 107 & PSA01 0.00540 0.00144

Locus: CKMM

=====

Genotypes:

22 22 23

Pop: 22 23 23 All

PSA01 247 221 44 512

107 663 501 92 1256

All: 910 722 136 1768

Locus Populations P-value S.E.

CKMM 107 & PSA01 0.09169 0.00752

Locus: LPL

=====

Genotypes:

24 24 25

Pop: 24 25 25 All

PSA01 225 211 59 495

107 602 410 77 1089

All: 827 621 136 1584

Locus Populations P-value S.E.

LPL 107 & PSA01 0.00005 0.00005

Locus: CYP3A4

=====

Genotypes:

26 26 27

Pop: 26 27 27 All

PSA01 176 103 147 426

107 291 343 254 888

All: 467 446 401 1314

Locus Populations P-value S.E.

CYP3A4 107 & PSA01 0.58680 0.01018

Locus: GC

=====

Genotypes:

	30	30	31	30	31	32	
Pop:	30	31	31	32	32	32	All

PSA01	6	3	0	205	224	20	458
107	18	20	3	474	524	55	1094
All:	24	23	3	679	748	75	1552

Locus	Populations	P-value	S.E.
-----	-----	-----	-----
GC	107 & PSA01	0.90292	0.00531

P-value for each population pair across all loci
(Fisher's method)

Population pair	Chi2	df	P-value
-----	-----	---	-----
107 & PSA01	57.297	18	0.00001
