



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1 NO  
ESTADO DO CEARÁ, BRASIL.**

**SANDRA ROCHA GADELHA**

**Salvador - Bahia - Brasil**

**2002**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**Curso de Pós Graduação em Patologia**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1 NO**  
**ESTADO DO CEARÁ, BRASIL.**

**Sandra Rocha Gadelha**

**Professor-orientador: Bernardo Galvão Castro Filho**  
**Nice Shindo**

**Dissertação apresentada ao**  
**Curso de PósGraduação em Patologia**  
**como requisito para obtenção do Grau de Mestre**  
**em Patologia Experimental**

**Salvador – Bahia**

2002

**C Pq G M**  
**Biblioteca**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ  
Salvador - Bahia.

G124e Gadelha, Sandra Rocha  
Epidemiologia molecular do HIV-1 no Estado do Ceará, Brasil /  
Sandra Rocha Gadelha. Salvador: Universidade Federal da Bahia /  
Fundação Oswaldo Cruz, 2002.  
107f. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade  
Federal da Bahia, 2002.

1. Epidemiologia molecular. 2. HIV-1. 2. Ceará. 1. Título.

CDU 616.98-036.22 (813.1)

3-1-2011  
11/1/02

PHL  
118 01387  
201748

616.98-036.22 (813.1)  
G124e

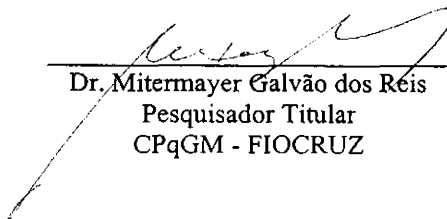
**SANDRA ROCHA GADELHA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

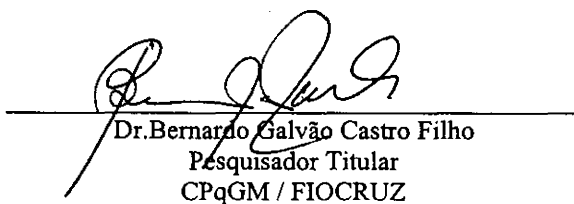
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido  
Coord. Div. Laboratorial DST/ AIDS  
MINISTÉRIO DA SAÚDE



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Bernardo Galvão Castro Filho  
Pesquisador Titular  
CPqGM / FIOCRUZ



*“Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores  
Se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas  
Se não houver folhas,  
valeu a intenção da semente.”*

*Henfil*

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- CNPq – processo n° 521128/98-6
- CNDST/AIDS/ Ministério da Saúde
- FIOCRUZ – bolsa de estudo no período de março de 2000 a fevereiro de 2002

## AGRADECIMENTOS

- **Aos meus pais**, Erivaldo Moreira Gadelha e Teresa Maria Rocha Gadelha, sem os quais eu não teria chegado aqui. Obrigado por terem me ensinado a sonhar e a lutar pelos meus objetivos. Obrigado por toda a dedicação, paciência e amor.
- **A Marco Mello**, meu esposo, companheiro e amigo, pelo imensurável apoio em todas as etapas deste trabalho de tese. Minha gratidão pelo amor dedicado, compreensão, apoio e paciência. Minha grande admiração pela pessoa maravilhosa, íntegra, correta e disponível que você é. Obrigado por tudo.
- **Aos meus irmãos e à Neuma Andrade**, pelo amor e convívio. Obrigado por todos os momentos felizes.
- **Ao Dr. Bernardo Galvão Castro Filho**, minha profunda gratidão pela grande oportunidade que me deu de desenvolver meu trabalho de dissertação no Laboratório Avançado de Saúde Pública. pela orientação, apoio e colaboração no desenvolvimento do mesmo. Minha admiração pelo grande exemplo de pesquisador e cidadão na incansável luta em prol da ciência, da vida e da saúde pública.
- **À Nice Shindo**, por ter me fornecido conhecimentos fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada pela orientação.
- **A todos os amigos que fazem o Laboratório Avançado de Saúde Pública**. Minha imensa gratidão pela amizade, carinho e excelente convivência.
- **A Geraldo Argolo Ferraro**, pela revisão da dissertação e pelas sugestões valiosas. Obrigado pelo carinho e por partilhar momentos tão agradáveis.
- **Aos amigos e companheiros da Patologia Experimental**, pelo maravilhoso convívio.

- **Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Patologia**, pelos conhecimentos fornecidos e por terem me ajudado a desenvolver uma visão mais crítica e ampla da ciência e da Patologia.
- **À Rosália Meire Oliveira da Silva**, por toda a sua dedicação, carinho e disponibilidade. Minha grande admiração pela excelente pessoa que você é.
- **Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM)/ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)**, que me recebeu tão bem e me forneceu todas as condições para realização do mestrado. Por toda a sua estrutura física e humana, indispensável para o desenvolvimento deste estudo, pelo financiamento através da bolsa de mestrado, estágio e congresso e pelo papel ímpar na formação de pesquisadores e cidadãos.
- **À Viviana Olavarria**, com quem compartilhei muitas horas de trabalho e conversa. Obrigada pela força, carinho, amizade e convívio.
- **À Clarissa Teixeira e Régis Brandim**, que mais que amigos, foram e são para mim uma família. Obrigado pelos momentos compartilhados desde os dias de Retiro São Francisco. Vocês são muito especiais. Obrigado pela grande amizade e carinho.
- **À Ana Fiscina Sampaio e a todo o pessoal da Biblioteca do CPqGM**, pela grande disponibilidade, colaboração e pela normatização das referências bibliográficas
- **À Marisa Morgado**, minha gratidão pela oportunidade de realizar um estágio no Laboratório de Imunologia Molecular. Obrigado pela atenção, colaboração e disponibilidade. Minha admiração pela sua competência profissional e dedicação à pesquisa.
- **Ao pessoal do setor de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública/Ceará**, pela total colaboração no envio das amostras.

- **Ao Dr José Napoleão Monte Cruz**, pelo grande apoio, colaboração e amizade. Minha imensa gratidão por toda a ajuda no envio das amostras e admiração por seu interesse científico e disponibilidade.
- **À Diretoria do Hospital São José de Doenças Infecto-Contagiosas/Ceará (H.S.J)**, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.
- **Ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas do H.S.J.**, especialmente ao Dr. Jacó, chefe do laboratório, pelo apoio na coleta das amostras.
- **Aos pacientes**, que com confiança, concordaram em participar deste trabalho.
- **A todas as pessoas que não mencionei**, mas que de alguma forma colaboraram para a realização deste estudo.
- **A Deus**, presente em todos os momentos da minha vida. Obrigado por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas.

## SUMÁRIO

### LISTA DE ABREVIATURAS

### RESUMO

### ABSTRACT

### INTRODUÇÃO

1	Histórico.....	1
2	Epidemiologia.....	2
	1.2.1 Epidemiologia global da AIDS.....	2
	1.2.2 Epidemiologia da AIDS no Brasil.....	5
	1.2.3 Epidemiologia da AIDS no Nordeste.....	8
3	Classificação do HIV.....	11
4	Estrutura viral.....	13
5	Ciclo viral.....	17
6	Células alvo.....	19
7	Correceptores do HIV.....	20
8	História natural.....	22
9	Patogênese.....	23
0	Resposta imune.....	26
1	Variabilidade genética.....	28
	2.1.1 Classificação do HIV.....	29
	2.1.2 Distribuição das variantes do HIV no mundo.....	33
	2.1.3 Métodos para identificação de subtipos ou CRFs.....	35
	2.1.4 Implicações da variabilidade genética do HIV.....	36
2	Polimorfismo viral do HIV-1 no Brasil.....	38

<b>2.OBJETIVOS</b> .....	43
2.1 Geral.....	43
2.2 Específicos.....	43
<b>3. JUSTIFICATIVAS</b> .....	44
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
4.1 População do estudo.....	47
3.2 Coleta de sangue.....	48
4.3 Separação de células mononucleares do sangue periférico por centrifugação em gradiente de ficoll-hypaque.....	48
4.4 Extração de DNA.....	49
4.5 Identificação dos subtipos do HIV-1 pela técnica de HMA (heteroduplex mobility assay), a partir dos genes <i>env</i> e <i>gag</i> .....	50
4.5.1 HMA <i>env</i> .....	50
4.5.2 HMA <i>gag</i> .....	53
4.6 Determinação de polimorfismo da região da alça V3, nas amostras do subtipo B por Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RFLP-Restriction Fragment Length polymorphism)..	59
4.7 Análise estatística.....	60
<b>5. RESULTADOS</b> .....	61
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	76
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	82
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CRF	Forma recombinante circulante
CTL	Linfócito T citotóxico
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doença sexualmente transmissível
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
<i>env</i>	Gene do envelope do HIV
<i>gag</i>	Gene antígeno de grupo do HIV
gp120	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com peso de 120 kDa
gp41	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com peso de 41 kDa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMA	Ensaio de Mobilidade de Heteroduplex (Heteroduplex Mobility Assay )
LTR	Longas regiões terminais repetitivas
p24	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1



PCR	Reação da polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction)
Pol	Gene da polimerase do HIV
RFLP	Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ácido Ribonucléico
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
TAE	Tampão acetato EDTA
TBE	Tampão borato EDTA
V3	Terceira região variável da gp120 do envelope do HIV-1

**RESUMO**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1 NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL. SANDRA ROCHA GADELHA.** No Brasil, o HIV-1 é representado predominantemente por vírus do subtipo B, embora um aumento no número de vírus não Bs e recombinantes tem sido registrado. O HMA, baseado no gene *env*, tem sido muito usado neste país como ferramenta para monitorar a distribuição dos subtipos. Como a recombinação intersubtipo é uma importante fonte de variação genética do HIV-1 é de fundamental importância ampliar a subtipagem por HMA para duas regiões distintas do genoma do HIV: *env* e *gag*. O principal objetivo deste trabalho é identificar subtipos circulantes do HIV-1 no estado do Ceará. Este estado está localizado na região Nordeste do Brasil, onde o turismo sexual e a prostituição infantil são fatores que favorecem a disseminação da epidemia do HIV. As amostras foram coletadas no Hospital São José, que é o maior hospital para HIV/AIDS no Ceará. Células mononucleares do sangue periférico foram separadas pela metodologia de Ficol-Hipaque e o DNA genômico extraído através da digestão com proteinase K, seguido de purificação com fenol-clorofórmio. O DNA genômico foi usado para amplificar fragmentos dos genes *env* e *gag* através de PCR. Foi utilizada a técnica de HMA para identificar os subtipos circulantes nessa população. Amostras correspondentes à variante brasileira do subtipo B (motivo GWGR) foram identificadas por RFLP usando a enzima de restrição FokI. Foram analisamos 149 amostras positivas para HIV-1 coletadas no ano 2000. Os subtipos B, F e B/F foram identificados. A prevalência do subtipo B foi de 94% e a prevalência de ambos subtipo F e recombinante B/F de 3%. Baseado na análise com a enzima FokI, 34% das amostras foram identificadas como a variante brasileira do subtipo B (motivo GWGR). Foi demonstrado, nesse estudo, uma predominância de subtipo B semelhante a estudos anteriores realizados com amostras da região sudeste do Brasil. Além disso, foi demonstrado, pela primeira vez, a presença de subtipo F e recombinante B/F no estado Ceará. Estes resultados contribuem para um conhecimento geral da epidemia do HIV no Brasil, fornecendo informações importantes para o planejamento de estratégias relevantes para a saúde pública em nosso país.

**ABSTRACT**

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HIV-1 IN THE STATE OF CEARÁ, BRASIL. SANDRA ROCHA GADELHA.** In Brazil HIV-1 is predominantly represented by subtype B viruses nevertheless an increasing number of non-B and few recombinants have been reported. HMA based on the *env* gene has been largely used in Brazil as a tool for monitoring subtype distribution. Since intersubtype recombination is an important source of HIV-1 genetic variation it is of paramount importance to extend HMA subtyping using two distinct HIV regions: *env* e *gag*. The main goal of the present work is to identify circulating HIV-1 subtypes in Ceará State using *env* and *gag* HMA. Ceará state is located in the Northeast region of Brazil, where social problems such as sexual tourism and child prostitution represent enhancing factors to the spreading of HIV epidemics. Samples were collected at São José Hospital, which is the major hospital for HIV/AIDS in Ceará. PBMCs were separated by Ficol-Hypaque method and genomic DNA extracted using protein-K digestion followed by phenol-chloroform purification. Genomic DNA was used to amplify fragments of the *env* and *gag* gene through PCR. These fragments were used in order to identify the circulating HIV-1 subtypes in this population using HMA. Samples corresponding to the typical Brazilian subtype B variant were further identified by RFLP using FokI restriction enzyme. We analyzed 149 HIV-1 positive samples collected along the year 2000. Subtypes: B, F and B/F were identified. The prevalence of subtype B was 94% and the prevalence of both subtype F and B/F recombinants were 3%. Based on FokI RFLP, 34% of the subtype B samples were identified as corresponding to the typical Brazilian subtype B. We demonstrated a predominance of subtype B similar to previous results from studies done with samples from the southeast region of Brazil. In the present study we show for first time the presence of HIV-1 subtype F and B/F in Ceará State. Our results contribute to the overall knowledge of the HIV epidemics in Brazil Providing important information to support future planning for good public health care in our country.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi reconhecida em 1981. Em junho deste ano, um relato do CDC (*Centers of Disease Control and Prevention*) no *Morbidity and Mortality Weekly Report*, descreveu cinco casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* entre homens em Los Angeles. Nos meses seguintes, casos semelhantes foram descritos, bem como aparente evolução de outras condições associadas à imunodeficiência. Os pacientes afetados tinham alguns aspectos em comum, como uma diminuição do número de linfócitos T e comportamento homossexual e/ou uso de drogas injetáveis.

No final de 1982 tornou-se evidente que esta nova síndrome não era limitada a poucas cidades ou a indivíduos com comportamento de risco (homossexuais e usuários de drogas). Muitos casos foram descritos em vários outros estados e a síndrome foi descrita também em hemofílicos, parceiros sexuais de membros dos grupos de risco e entre pessoas que faziam tratamento com sangue ou hemoderivados. Todas essas observações indicavam que a transmissão ocorria através do sangue e de contato sexual e que se tratava, portanto, de uma doença transmissível, o que direcionou pesquisas para o isolamento e identificação do agente etiológico.

O primeiro isolado deste retrovírus foi obtido, de um paciente com AIDS, pelo grupo de pesquisadores liderados por Luc Montaigner do Instituto Pasteur de Paris, França, sendo então denominado LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*) (Barré-Sinoussi e

cols., 1983). Logo em seguida, nos Estados Unidos, o grupo coordenado por Robert Gallo também isolou este retrovírus, denominando-o de HTLV-3 (*human T-lymphotropic virus type III*) (Gallo e cols., 1984). Em 1986, o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus, recomendou a designação de HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) para o vírus causador da AIDS (Coffin e cols., 1986). Neste mesmo ano foi identificado o HIV-2 (Clavel e cols., 1986).

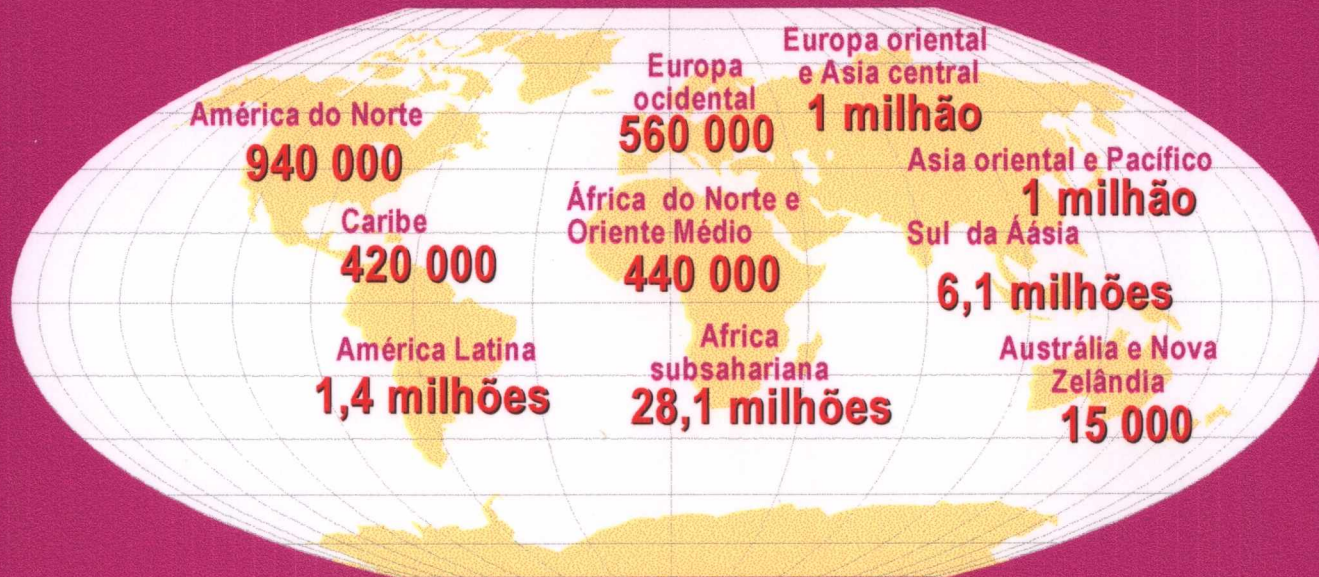
Até o momento, a infecção com HIV-1 conhecida como mais antiga corresponde a uma amostra de 1959, proveniente da África (Zhu e cols., 1998). Sequências de HIV antes do reconhecimento da AIDS podem conter informações cruciais para a definição do tempo de origem e a evolução subsequente desse vírus em humanos (Zhu e cols., 1998)

## **1.2 Epidemiologia**

### **1.2.1. Epidemiologia global da AIDS**

A AIDS é considerada a quarta causa de mortalidade em todo o mundo, sendo a principal causa na África subsahariana. Desde o início da epidemia, mais de 60 milhões de pessoas já se infectaram, sendo que destas, cerca de 20 milhões já foram a óbito (Figura 1). A maioria das novas infecções ocorre em adultos jovens, sendo as mulheres jovens particularmente vulneráveis (UNAIDS, 2001). Embora o primeiro caso definido de AIDS tenha sido diagnosticado em um homossexual do sexo masculino, atualmente, a forma predominante de transmissão no mundo é a heterossexual. A transmissão perinatal corresponde à cerca de 15 a 25% das novas infecções e podem ocorrer intra-útero, durante

## Figura 01: Número estimado de adultos e crianças vivendo com HIV/AIDS no final de 2001



**Total: 40 milhões**



**ONUSIDA**  
UNICEF • PNUD • PNUAP • PNUFID • OIT  
UNESCO • OMS • BANCO MUNDIAL

00002-Sp-4 - 1 de dezembro de 2001

(retirado e adaptado de <http://www.unaids.org>)



Organización  
Mundial de la Salud

o parto e após o nascimento, durante a amamentação. Nos países onde algum sistema de prevenção foi adotado, uma significativa redução da transmissão perinatal pôde ser observada. O uso de drogas injetáveis tem um papel particularmente importante em regiões como a Ásia e sul da Europa na transmissão parenteral do HIV. A transmissão através de transfusão sanguínea tem diminuído consideravelmente com a implantação de testes de triagem sorológica, porém, ainda contribui para o aumento desta epidemia em locais onde transfusões são comumente usadas como tratamento e a triagem sorológica não é utilizada como rotina (Gayle e cols., 2001).

A África é o continente mais afetado pelo HIV. Quando comparado com o mundo, a África subsahariana tem a maior incidência e prevalência da infecção, menor nível de acesso à saúde e a menor estabilidade econômica (Gayle e cols., 2001). Nesta região, há cerca de 28,1 milhões de pessoas vivendo com o vírus da AIDS. Em alguns lugares, as taxas de prevalência em mulheres grávidas são superiores a 30%, e em países, como Botswana, Malawi, Moçambique, Swazilandia, a expectativa de vida que seria de aproximadamente 62 anos, passou para menos de 40 anos com o aparecimento da AIDS. Na Europa Oriental, particularmente na Rússia, a epidemia apresenta o crescimento mais rápido do mundo e a maioria dos casos notificados está relacionado ao consumo de drogas endovenosas. Na Ásia e Pacífico, a incidência de infecções pelo HIV tem aumentado bastante nos últimos anos, com cerca de 7,1 milhões de pessoas vivendo com AIDS em 2001. No Oriente Médio e África do Norte, em geral, a prevalência do HIV é baixa, embora tenha se verificado um número crescente de infecções. Na América Latina e Caribe existem cerca de 1,8 milhões de pessoas infectadas pelo HIV. O Caribe é a segunda região mais afetada do mundo, com a AIDS representando a principal causa de mortalidade em alguns países. Nos países desenvolvidos, como Austrália, Canadá, Estados Unidos e países da

Europa Ocidental, observa-se um aumento nas taxas de infecção através de contato sexual. Nesses países, estima-se que 1,5 milhões de pessoas tenham se contaminado com HIV (UNAIDS, 2001).

### *1.2.2. Epidemiologia da AIDS no Brasil*

Os primeiros casos de AIDS no Brasil foram detectados no início da década de 80, na região sudeste, nos municípios de São Paulo e Rio de Janeiro, e o agente etiológico isolado pela primeira vez no país em 1987 (Galvão-Castro e cols, 1987). De acordo com a história natural da doença, acredita-se que a entrada do vírus no país deve ter ocorrido na década de 70 e após ter se concentrado na região sudeste houve disseminação para o resto do país.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, entre 1980 e 2001, 215.810 casos de AIDS foram notificados, sendo 159.226 do sexo masculino e 56.584 do sexo feminino. Deste total, 105.595 óbitos por AIDS foram registrados em todo país.

O grupo etário mais atingido, em ambos os sexos, tem sido o de 20 a 39 anos. Quanto aos tipos prováveis de transmissão do HIV, dentre os casos notificados entre 1980 e 2001, a transmissão sexual representa 26,6%, a transmissão homossexual 17,2%, a bissexual 9,8% e o uso de drogas injetáveis 18,5% (Ministério da Saúde, 2001).

A epidemia no Brasil se caracterizou por três grandes fases, com importantes mudanças no perfil epidemiológico ao longo do tempo. Na primeira fase (1980-1986) predominou a transmissão sexual, especialmente entre homo/bissexuais masculinos e entre indivíduos de alta escolaridade, concentrados principalmente na região sudeste. Na segunda fase (1987-1991) tem importância a transmissão entre usuários de drogas e através de

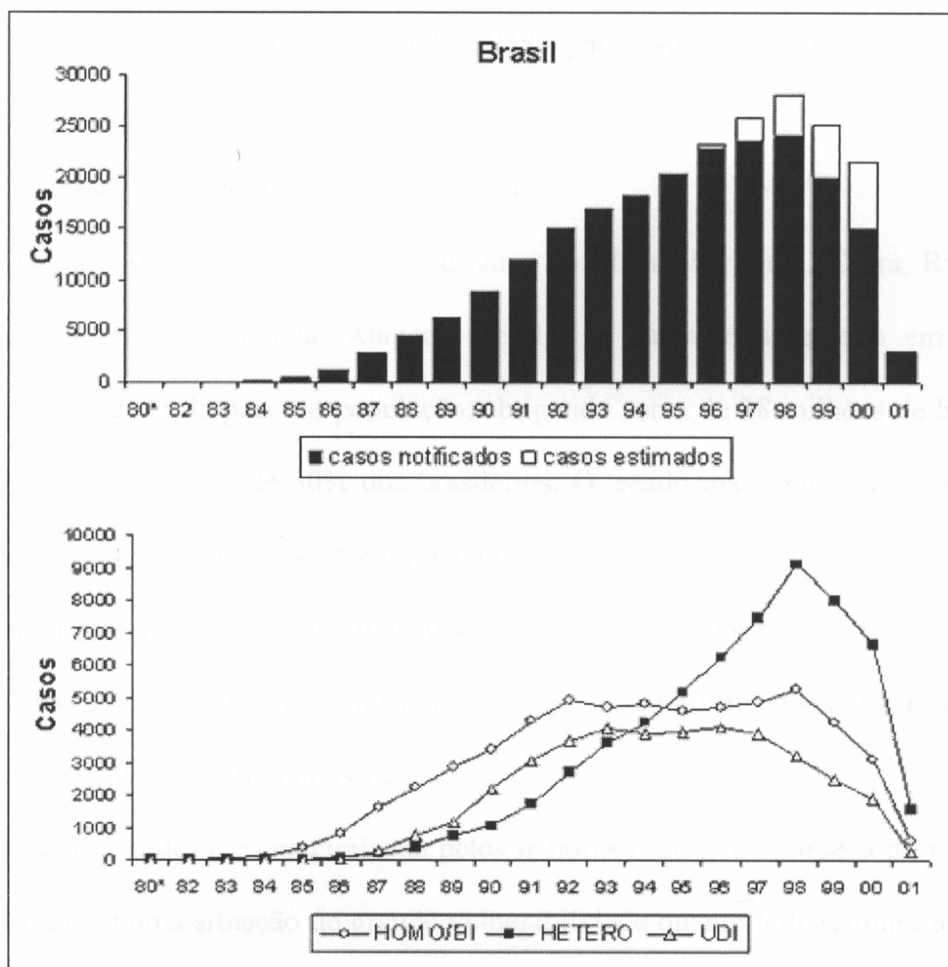


transfusão sangüínea. Além disso, uma maior proporção de casos vinha sendo atribuída à transmissão heterossexual. Começa a haver também uma regionalização do padrão de transmissão. A terceira fase ou fase atual (1992 até hoje) está relacionada a um aumento da disseminação entre heterossexuais (Figura 2), afetando mulheres e seus filhos, bem como regionalização, especialmente entre populações de baixa renda (Ministério da Saúde, 2001)

O aumento expressivo do número de mulheres infectadas no perfil epidemiológico da doença pode ser constatada na progressiva redução da razão de sexo entre todas as categorias de exposição, que passou de 24 homens: 1 mulher, em 1985, para 2 homens: 1 mulher, em 1999/2000 (Dhalia e cols., 2000). Uma das conseqüências diretas dessa maior participação feminina é o progressivo aumento da transmissão vertical. A primeira ocorrência de transmissão perinatal registrada no Brasil foi em 1985. Desde então, já foram notificados até junho de 2001, 6.015 casos (2,8% do total) de infecções pelo HIV-1 em crianças menores de 05 anos (Ministério da Saúde, 2001).

O acesso aos antiretrovirais de forma gratuita e universal, na rede de saúde pública no Brasil, foi garantido desde 1996. De acordo com a Lei 9.313/96 é de responsabilidade do Governo disponibilizar um tratamento mais adequado aos pacientes infectados pelo HIV dentro de parâmetros técnicos e científicos definidos pelo Ministério da Saúde, por intermédio da Coordenação Nacional (CN) de DST e AIDS. O impacto dessa medida foi bastante positivo, reduzindo os índices de mortalidade pela infecção pelo HIV-1 e melhorando a qualidade de vida dos indivíduos infectados. No Brasil, acredita-se que com o advento da terapia antiretroviral foram evitadas cerca de 146.000 hospitalizações entre 1997 e 1999. Além disto, o tempo médio de hospitalização de um indivíduo infectado

Figura 02 - Casos de aids, segundo as principais categorias de exposição e ano de diagnóstico. Brasil, 1980 - 2001\*.



(retirado e adaptado de <http://aids.gov.br>)

pelo HIV caiu significativamente de 38 dias em 1995 para 20 dias em 1997, observando-se ainda, significativa redução na demanda para tratamento de doenças oportunistas. Portanto, a terapia antiretroviral significou menos morte e menos internação. No Brasil, como o acesso a saúde pública e as condições sócio-econômicas são precários, a decisão de assegurar a disponibilidade dos antiretrovirais na rede pública representou uma grande conquista para pessoas que vivem com HIV/AIDS e para a sociedade em geral.

### *1.2.3 Epidemiologia da AIDS no Nordeste*

A região Nordeste, formada pelos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe e Bahia, é a terceira em extensão territorial e a segunda do país em população, abrigando cerca de 38 milhões de habitantes, o que corresponde à cerca de 30% dos brasileiros. O estado mais povoado da região é a Bahia, seguida por Pernambuco e Ceará. Quando se considera o total de casos notificados de AIDS na região, esses são também os três estados mais afetados.

De acordo com dados do Ministério da Saúde foram notificados entre 1980 e junho de 2001 19.752 casos de AIDS no Nordeste.

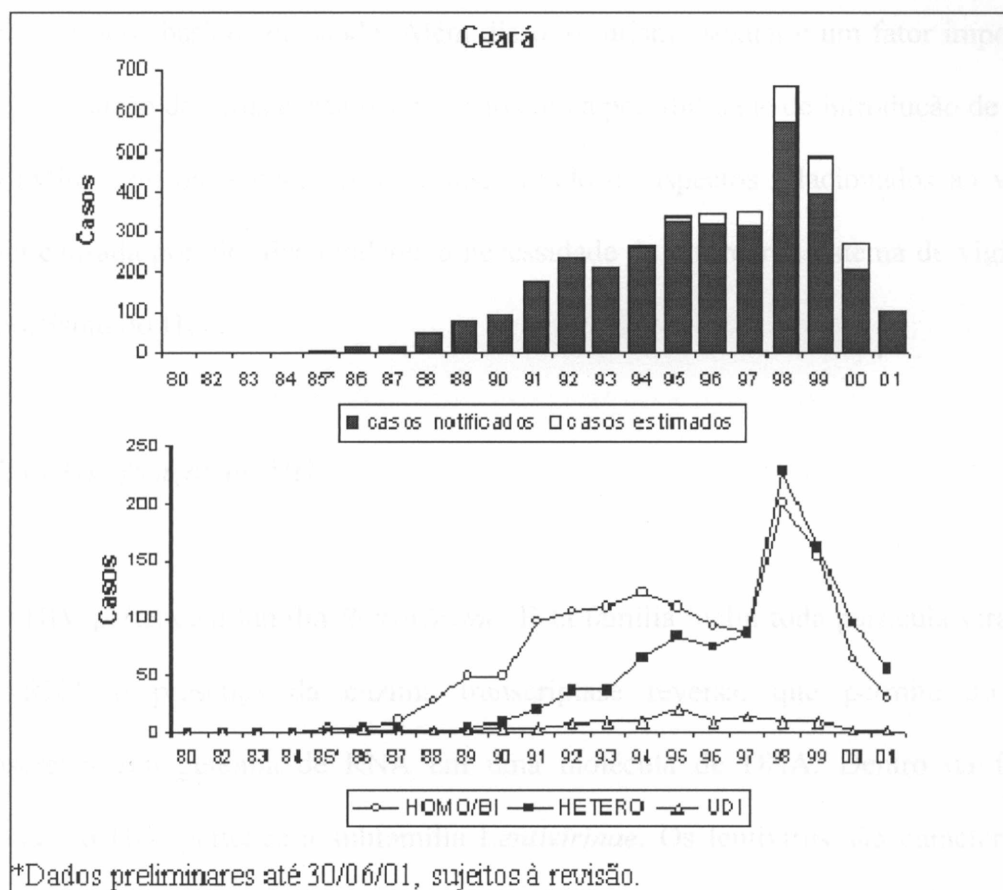
A região Nordeste é caracterizada pelos maiores índices de pobreza do país, o que coloca tal região numa situação de grande vulnerabilidade quanto à disseminação do HIV. Além da pobreza, outro fator importante que favorece a disseminação do HIV, é o turismo sexual. O Nordeste, especialmente as cidades litorâneas como Recife, Natal, Aracaju, Fortaleza e Salvador, com suas praias e atrações, concentra o maior número de turistas nacionais e estrangeiros, bem como um intenso fluxo de sexo-turismo. Além da prostituição tradicional, as adolescentes também formam um contingente regional de mulheres vivendo dessa profissão (Ministério da Saúde, 2001).

### *O estado do Ceará*

O estado do Ceará possui uma área de 146.348,3 Km<sup>2</sup> com uma população de 7.200.167 habitantes, segundo projeções para o ano 2000, de acordo com o IBGE. A capital, Fortaleza, possui 2.147.000 residentes e está dividida em 20 bairros e em 6 secretarias executivas regionais. O primeiro caso de AIDS identificado no Ceará ocorreu em 1983, em um paciente de 23 anos, atendido no Hospital Universitário Walter Cantídio (Ministério da Saúde, 2000). Até setembro de 2000 foram notificados 3.165 casos, tornando o Ceará o terceiro estado do nordeste em número total de casos. Destes, 78 são crianças e 3.087 adultos. O sexo masculino representa 79% dos casos notificados, embora se verifique crescimento no registro de casos de infecção em mulheres. Atualmente, a proporção é de três homens infectados para cada mulher com HIV. Na primeira década (1983-1989), 86% dos casos notificados encontrava-se em Fortaleza. Ao longo da segunda década houve um declínio nos casos de AIDS na capital (60%), com aumento importante de ocorrência no interior. A faixa etária de maior concentração dos casos é a de 20-44 anos. A transmissão sexual é a principal via de transmissão do HIV/AIDS. A categoria homo/bissexual masculina foi durante vários anos a categoria mais afetada pela infecção, no entanto, a curva de transmissão entre heterossexuais aumentou consideravelmente na última década e ambas as categorias têm praticamente a mesma importância na fase atual (Figura 3).

Existem casos notificados de HIV em 141 dos 184 municípios do estado. O perfil do indivíduo infectado no Ceará, e em especial em Fortaleza, confirma a pauperização da epidemia e a tendência de disseminação entre indivíduos de baixa escolaridade (Ministério da Saúde, 2000).

**Figura 3. Casos de aids segundo as principais categorias de exposição e ano de diagnóstico. Ceará, 1980 - 2001\*.**



(retirado e adaptado de <http://aids.gov.br>)

de transmissão. O modo de transmissão mais comum é o contato sexual com HIV-1 e HIV-2. Os modos de transmissão sexual são o sexo vaginal, o sexo anal e o sexo oral. O HIV-1 está associado a uma transmissão sexualmente transmissível e a uma transmissão vertical. A transmissão vertical também pode ocorrer durante o parto e a amamentação. Outros modos de transmissão são o uso de agulhas compartilhadas e o contato com sangue infectado. A transmissão vertical também tem sido relatada nos EUA, Europa, Ásia, Rússia, África do Sul, Índia e Chile (colis., 1976; Clavel e colis., 1986).

No Ceará, a disseminação desse vírus está relacionada ao êxodo rural, que concentra, na periferia, grandes aglomerados de baixa renda, baixa escolaridade e pouco acesso aos serviços básicos de saúde. Além disso, o turismo sexual é um fator importante para a disseminação do vírus e está relacionado com a possibilidade de introdução de novos subtipos (Ministério da Saúde, 2000). Considerando os aspectos relacionados ao vírus e à epidemia causada por ele, fica evidente a necessidade de reforçar o sistema de vigilância do polimorfismo do HIV.

### *1.3 Classificação do HIV*

O HIV pertence à família *Retroviridae*. Esta família inclui toda partícula viral com genoma RNA e presença da enzima transcriptase reversa, que permite ao vírus retrotranscrever seu genoma de RNA em uma molécula de DNA. Dentro da família *Retroviridae*, o HIV pertence à subfamília *Lentivirinae*. Os lentivírus são caracterizados por produzirem, em geral, infecção persistente crônica com desenvolvimento de danos progressivos ao sistema imune do hospedeiro e como consequência alterações patológicas nos estágios tardios da doença (Hu e cols., 1996; Barré-Sinoussi, 1996; Leitner e cols., 1996).

Até o momento, foram identificados dois tipos de HIV: HIV-1 e HIV-2. Os modos de transmissão entre ambos são os mesmos, porém, enquanto o HIV-1 está associado a infecções em todo o mundo, o HIV-2 tem distribuição restrita à África central e oriental, embora registros de casos isolados também tenham sido feitos nos EUA, Europa, Ásia, Brasil, Argentina e Índia (Gallo e cols., 1996; Clavel e cols., 1986).

Outros membros do grupo lentivirus infectam primatas não humanos e são coletivamente denominados de vírus da imunodeficiência símia (SIV), com uma subscrição para indicar a espécie hospedeira de origem: *african green monkeys* (SIVagm), *sootey mangabey monkeys* (SIVsm), *mandrills* (SIVmnd), *sykes monkeys* (SIVsyk) e chimpanzês (SIVcpz) (Cohen e cols., 1998; Barré-Sinoussi, 1996; Hahn e cols., 1994).

Muitas espécies de primatas estão infectados com SIV na selva, contudo os lentivirus de primatas não humanos são geralmente não patogênicos em seu reservatório natural. Porém, a transmissão do SIV de uma espécie para outra, que não o reservatório natural, pode resultar em patogenicidade.

Existem evidências de que a AIDS constitui uma zoonose e que a transferência cruzada de lentivirus de primatas para o homem deu origem a esses dois novos patógenos humanos (Hahn e cols., 1994; Sharp e cols., 1994; Gao e cols., 1999). Indícios que permitiram chegar a essa conclusão incluem similaridade na organização genômica entre SIV e HIV, coincidência geográfica na ocorrência destes dois vírus, rotas plausíveis de transmissão, relacionamento filogenético e prevalência do lentivirus de primata no seu hospedeiro natural. O reservatório primário do HIV-2 foi identificado como sendo o *sooty mangabey* (*Cercocebus atys*), enquanto que no caso do HIV-1, foi mostrado por Gao e colaboradores (Gao e cols., 1999), que chimpanzês *Pan troglodytes troglodytes* infectados com SIVcpz seriam responsáveis pela transmissão ao homem. Os autores, porém, não descartam a possibilidade de que outras espécies de chimpanzês também tenham funcionado como reservatório primário e reforçam a necessidade de mais estudos sobre a história natural e biologia do SIVcpz/HIV-1 para o perfeito entendimento desta rota de transmissão, bem como de sua frequência.

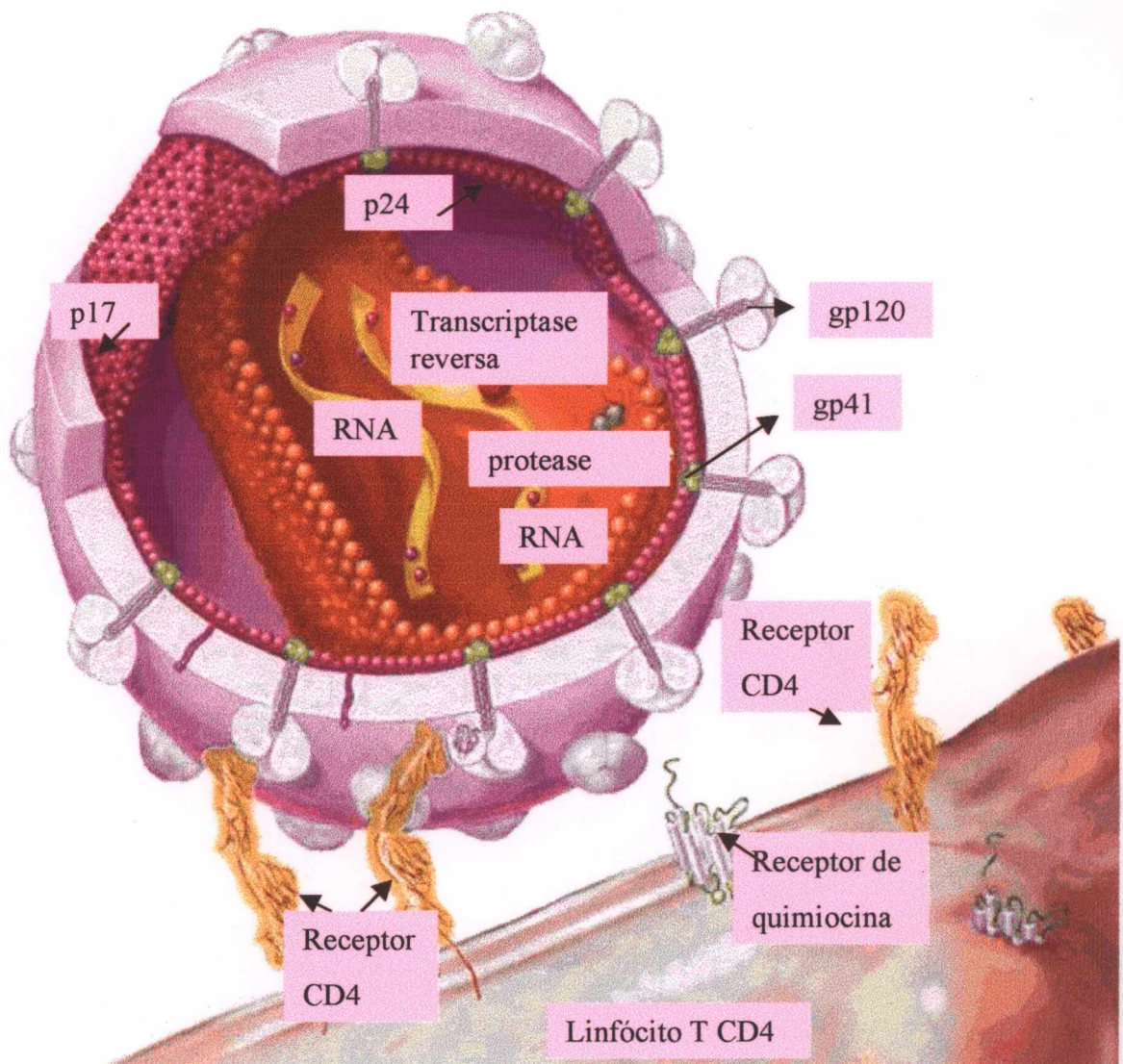
#### 1.4 Estrutura viral (Figura 4)

O HIV-1 tem uma estrutura icosaédrica, com cerca de 110 nm de diâmetro e consiste de uma camada lipídica ou envelope que envolve o nucleocapsídeo. A região mais interna é o core central, contendo duas cópias idênticas de uma fita de RNA e enzimas virais. O genoma RNA apresenta características típicas dos retrovírus, com aproximadamente 9.500 nucleotídeos (10kb), ocupados em grande parte pelos três genes estruturais: *gag* (grupo antígeno), *pol* (polimerase), *env* (envelope). O genoma é flanqueado por duas regiões contendo seqüências repetitivas, denominadas longos terminais de repetição (LTR-long terminal repeat region), onde estão as principais seqüências promotoras para a transcrição dos genes virais. Há ainda, seis outros genes acessórios e regulatórios no genoma, sendo os cinco: *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef* comuns ao HIV-1 e HIV-2 e, *vpu* e *vpx* para o HIV-1 e HIV-2, respectivamente (Hahn e cols., 1994; Cohen e cols., 1998; Abbas, 2000) (Figura 5).

O envelope viral, derivado da membrana celular do hospedeiro, é constituído por duas glicoproteínas extensivamente glicosiladas: gp120 e gp41. A estrutura primária da gp120 mostra uma alternância de cinco regiões conservadas (C1-C5) e 5 regiões variáveis (V1-V5), que se encontram distribuídas da seguinte forma, a partir da extremidade 5': C1V1V2C2V3C3V4C4V5C5.

O complexo glicoprotéico formado entre gp120-gp41 apresenta uma estrutura trimérica composta de seis subunidades individuais: três moléculas de gp120 e três de gp41 que medeiam a ligação e fusão à membrana celular (Moore e cols., 2001). A localização da gp120 é totalmente exterior e a gp41 tem localização transmembranar. Ambas são





**Figura 04.** Estrutura do HIV-1

(retirado e adaptado de <http://tensegrity.critpath.org/aric/library>)

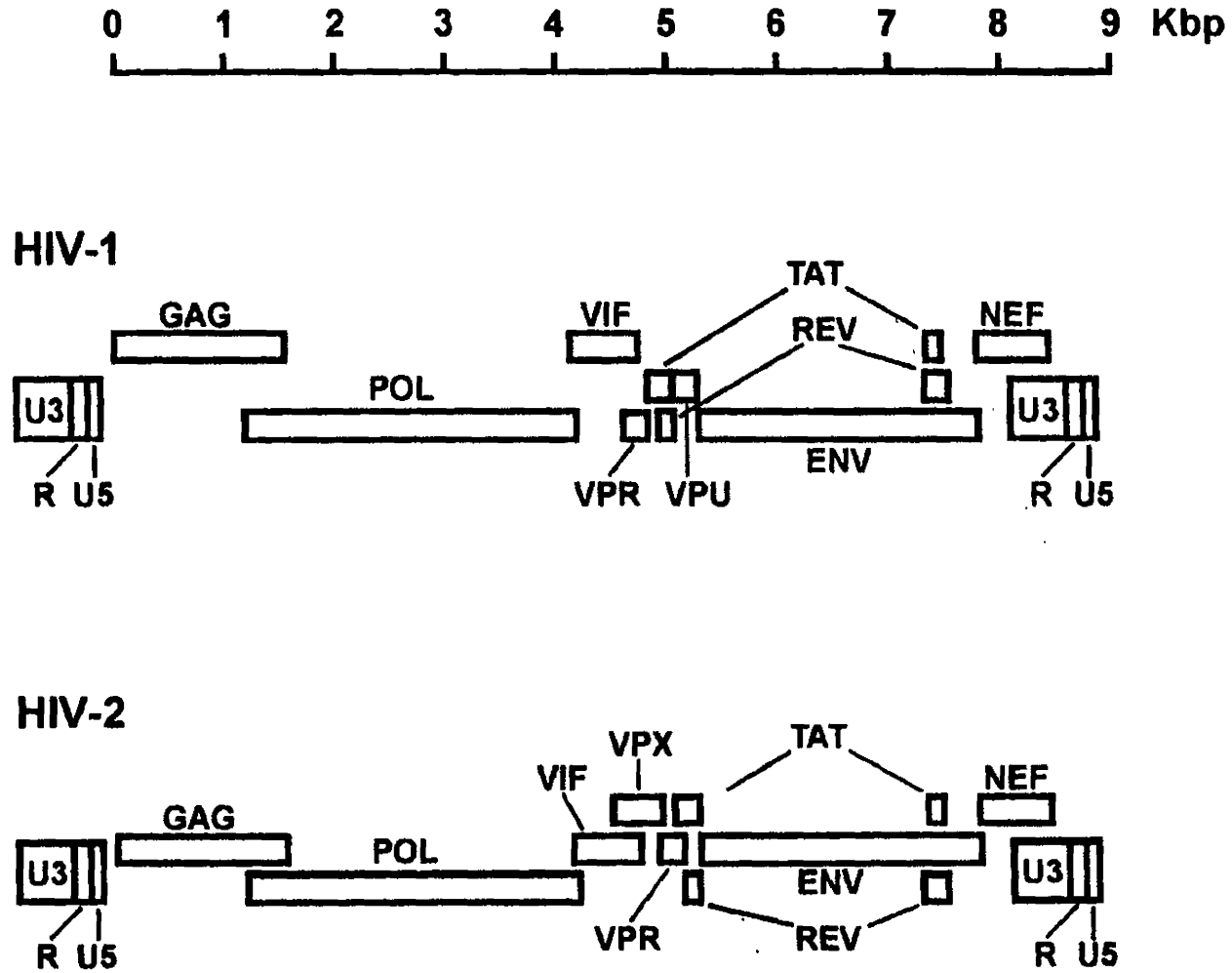


Figura 05: Representação esquemática do genoma do HIV-1 e do HIV-2

produzidas a partir da clivagem de uma glicoproteína precursora, a gp160, cuja síntese é iniciada a partir da transcrição do gene *env* (Hahn e cols., 1994; Cohen e cols., 1998).

Abaixo da bicamada lipídica está a proteína da matriz, p17, que é codificada pelo gene *gag*. Além da p17, são codificadas também por *gag*, as proteínas: p24, que corresponde a maior proteína do capsídio; p7, proteína com motivos de ligação entre proteínas e ácidos nucleicos, e p6, um peptídeo derivado da região 5' da proteína precursora da proteína *gag* com funções relacionadas ao brotamento de virions e a incorporação da proteína *vpr* nas partículas virais. São ainda consideradas proteínas estruturais as enzimas envolvidas no processo de replicação e integração do RNA viral: p66/p51 (transcriptase reversa), p10 (protease) e p32 (integrase), codificadas pelo gene *pol*. As proteínas dos genes *gag* e *pol* são traduzidas como uma poliproteína precursora que deve ser clivada pela protease nas subunidades distintas (Hahn e cols. 1994; Cohen e cols., 1998; Abbas, 2000).

Os genes que codificam várias proteínas acessórias e regulatórias (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *vpx*) não são expressos da mesma forma em todos os membros do grupo dos lentivirus complexos, refletindo assim adaptações e evoluções diferentes nos diversos hospedeiros primatas. As proteínas codificadas atuam de forma variada na regulação do HIV.

→ As longas regiões terminais repetidas (LTR) não codificam proteínas, mas são essenciais para a regulação da expressão viral. Fatores transcripcionais do hospedeiro e codificados pelo vírus ligam-se a regiões específicas da LTR e promovem a expressão de genes do HIV. As regiões LTR contêm regiões com sinais para poliadenilação, TATA box, sequência promotora e sítios de ligação para dois fatores transcripcionais: NFκB e SP1 (Abbas, 2000). Sequências desta região também estão envolvidas na integração proviral,

onde dois pares de base são perdidos antes dele ser inserido ao genoma celular (Hahn e cols., 1994).

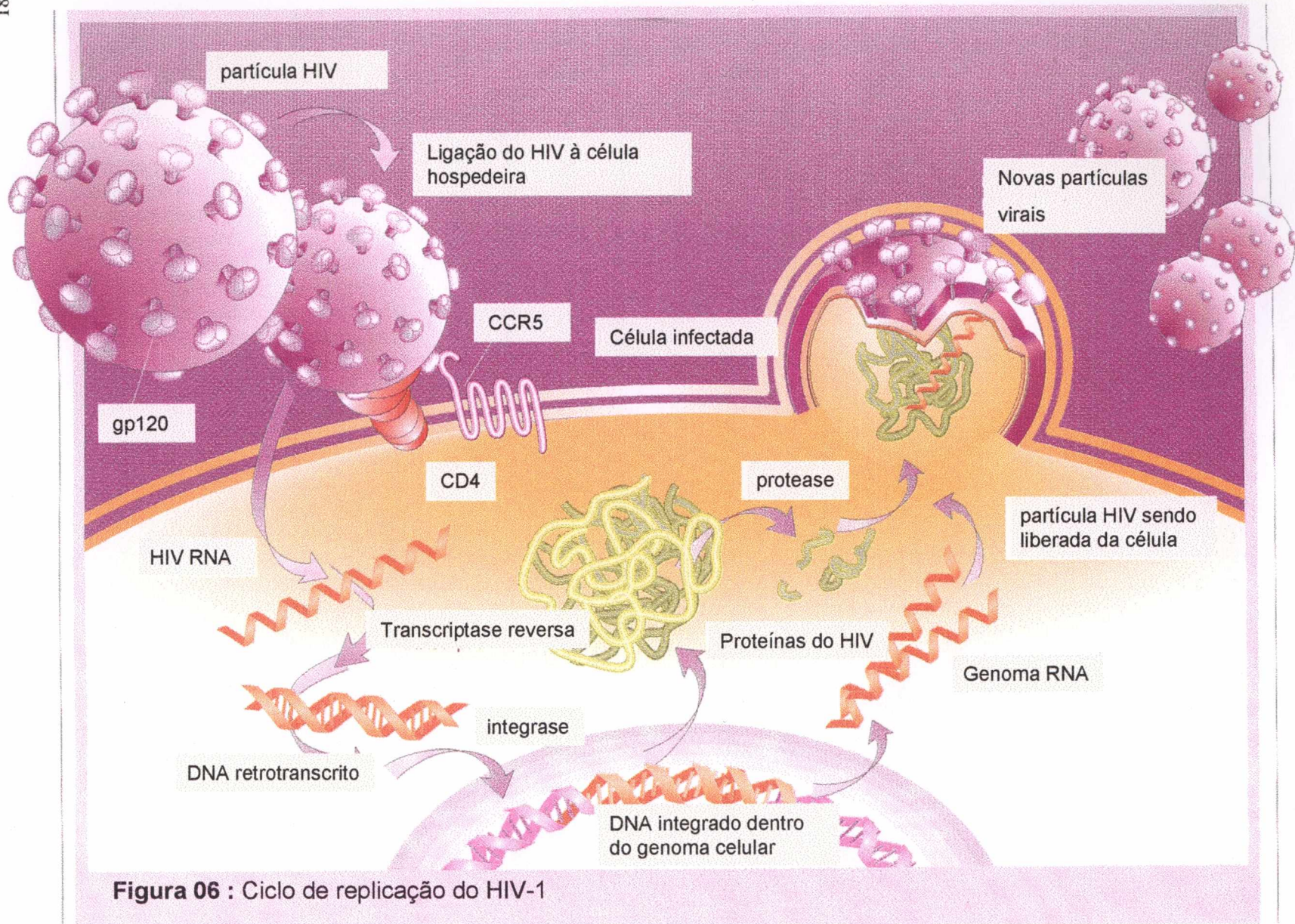
Os virions possuem também outras proteínas oriundas do hospedeiro no seu envelope, tais como: microglobulina- $\beta_2$ , moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, actina e ubiquitina. Tem sido proposto, que estas proteínas facilitariam a fusão e penetração do vírus na célula, além de estarem envolvidas com a patogênese viral (Hahn e cols., 1994).

### ***1.5. Ciclo viral (Figura 6)***

As membranas plasmáticas contêm centenas de proteínas e muitas delas têm sido potencialmente capazes de interagir com componentes virais (Dimitrov, 1997). Para entrar nas células alvo, o HIV utiliza o receptor CD4, bem como receptores de quimiocina, que são denominados co-receptores. O receptor CD4, presente em células T, macrófagos e células dendríticas, é uma glicoproteína de superfície, cuja função fisiológica é ligar-se a moléculas do MHC-II presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC) (Cohen e cols., 1998; Hahn e cols., 1994).

A fusão do HIV com a célula alvo é iniciada através da interação da proteína gp120 e o receptor CD4. O sítio de ligação da molécula de CD4 na gp120 está localizado dentro de uma depressão, na interface dos três domínios que compreendem a estrutura da gp120. A superfície do sítio de ligação do CD4 é isenta de glicosilação e relativamente bem conservada entre isolados do HIV-1 (Moore e cols., 2001). A interação entre gp120 e CD4 é de alta afinidade e além de permitir a junção entre vírus e célula alvo induz mudanças conformacionais necessárias para os estágios subsequentes da entrada viral, incluindo





ligação ao correceptor e exposição de uma região hidrofóbica da gp41, chamada de peptídeo de fusão (Cohen e cols., 1998; Hahn e cols., 1994; Dimitrov, 1997). A proteína gp41 promove a fusão do vírus à membrana celular do hospedeiro e em seguida a entrada do capsômero no citoplasma da célula (Cohen e cols., 1998; Hahn e cols., 1994).

Após a internalização do vírus, o core deve ser exposto de forma adequada para que a transcrição reversa do RNA viral em cDNA seja efetuada. Completada a síntese do cDNA, este, juntamente com a integrase e a transcriptase reversa formam um complexo que é transportado ao núcleo. No núcleo, a integrase promove uma integração aleatória e covalente do DNA viral ao genoma celular, levando a formação de um provirus. O DNA proviral funciona como um molde para a produção de RNAs virais (Hahn e cols., 1994).

O início da transcrição gênica do HIV está ligado à ativação fisiológica das células T por antígenos ou citocinas, e provavelmente, envolve a indução de fatores nucleares que interagem com seqüências de ligação para NF $\kappa$ B na LTR.

A montagem do vírus ocorre próxima à membrana celular, o qual é liberado, através de brotamento, juntamente com elementos da membrana celular do hospedeiro.

O conhecimento dos processos de entrada do vírus e do seu ciclo reprodutivo é de grande importância, pois permite determinar estratégias para o desenvolvimento de terapias antiretrovirais (Dimitrov, 1997).

### **1.6 Células alvo**

Tem sido demonstrado, *in vitro*, que uma ampla variedade de células com marcador CD4 podem ser infectadas, ou ainda, servir como carreadores ou reservatório para disseminação da infecção pelo HIV (Cohen e cols., 1998). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células

da linhagem monocítica (macrófagos) são os principais alvos da infecção pelo HIV. Os reservatórios incluem além de macrófagos e linfócitos T latentemente infectados, fontes extracelulares do vírus, como células dendríticas e células foliculares dendríticas (Moie e cols., 2000).

Geijtenbeek e colaboradores (Geijtenbeek e cols., 2000) demonstraram a ligação entre a gp-120 e um receptor tipo lectina específico para célula dendrítica (DC-SIGN). DC-SIGN, de acordo com os autores, não funciona como um receptor para a entrada do vírus na célula dendrítica, mas captura o HIV na periferia e facilita seu transporte para os órgãos linfóides, infectando células que expressam CD4 e receptores de quimiocina. Foi mostrado ainda, por Moir e colaboradores (Moir e cols, 2000), que assim como as células foliculares dendríticas, os vírus ligam-se aos linfócitos B através de receptores de complemento e servem como fonte de infecção de células CD4<sup>+</sup>. Tem sido demonstrada também, a infecção, *in vitro*, de células CD4<sup>-</sup>, contudo expressando altos níveis de correceptor (Trujillo Jr e cols., 2000).

### ***1.7 Correceptores do HIV***

A descoberta de vários receptores de quimiocinas servindo como correceptor para o HIV permitiu demonstrar que a entrada viral na célula é um processo multifatorial e compreende vários estágios (Dimitrov, 1997). Os correceptores mais utilizados pelo HIV-1 são o CCR5 e CXCR4, expressos tanto em células T, como em macrófagos. O CCR5 é um receptor natural para  $\beta$ -quimiocinas: RANTES (*regulated upon activation, normal T-expressed and secreted*), MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ), MIP-1 $\beta$  (*macrophage inflammatory protein 1 $\beta$* ), enquanto que CXCR4 é receptor para  $\alpha$ -

quimiocinas, como a SDF-1 $\alpha$  (*stromal derived factor 1 $\alpha$* ). Outros correceptores para o HIV e/ou SIV já foram identificados: CCR1, CCR2b, CCR3, STRL33, GPR15, GPR1, V28, CCR8 e US28 (Wu Lijun e cols., 1996; Dimitrov, 1997; Cohen e cols., 1998).

De acordo com o co-receptor utilizado, os isolados virais podem ser classificados como trópicos para CCR5 ou CXCR4. Além disso, de acordo com a habilidade de induzir a formação de células gigantes ou sincícios, os isolados são classificados como indutores da formação de sincícios (SI) ou não indutores da formação de sincícios (NSI). A transição NSI para SI pode ocorrer por mutações de poucos aminoácidos, predominantemente no terceiro domínio variável da proteína do envelope gp 120 (alça V3) (Cohen e cols., 1998). Sabe-se que a alça V3 é o mais importante domínio do envelope relacionado com fenótipo viral e o tropismo celular e representa o principal domínio para anticorpos neutralizantes do HIV.

Em geral, as cepas SI são encontradas mais tardiamente com a progressão clínica da doença, e esta seleção parece estar relacionada com a capacidade desses vírus usarem um repertório maior de moléculas para entrar na célula (Cohen e cols., 1998).

Foi demonstrada por Bou-Habib e colaboradores (Bou-Habib e cols., 1994), diferenças na alça V3 entre vírus NSI e SI. Foram detectadas quatro substituições de aminoácidos e uma inserção, resultando na adição de três cargas positivas. Essas substituições na região V3 ou em outros sítios podem levar a alterações na conformação do envelope viral, afetando sua exposição e antigenicidade. As cepas trópicas para CXCR4, por exemplo, possuem o domínio V3 mais exposto e conseqüentemente mais susceptível a neutralização por anticorpos monoclonais. Enquanto que nas cepas trópicas para CCR5, a



alça V3 é pobremente exposta e, embora ainda capaz de elicitar anticorpos neutralizantes, apresenta resistência à neutralização.

### ***1.8 História Natural***

A infecção primária pelo HIV ocorre quando vírions presentes no sangue, sêmen, ou outros fluidos corporais de um indivíduo infectam células de outro indivíduo. Dependendo do sítio inicial de exposição, células T CD4, monócitos, macrófagos ou células dendríticas podem ser as primeiras células infectadas. É provável, que através da transmissão via mucosa, as células de Langerhans tenham um papel importante na disseminação da infecção para tecidos mais profundos (Kahn e cols., 1998; Abbas, 2000). As células dendríticas carregam o HIV, e uma vez nos tecidos linfóides, podem passá-lo para células T CD4<sup>+</sup> através de interações célula-célula. Dentro de dias após a infecção inicial pode ser detectada nos linfonodos uma replicação abundante, que leva a viremia e a uma variedade de sinais não específicos (Fauci, 1996).

Cerca de três a seis semanas após a infecção primária pelo HIV, aproximadamente 50% dos indivíduos experimentam uma síndrome aguda e curta limitada que persiste por uma semana ou mais. Esta síndrome aguda está associada a altos títulos de replicação viral e diminuição dos níveis de CD4<sup>+</sup> no sangue periférico. Em geral, os níveis de CD4<sup>+</sup> retornam a níveis próximos do normal, porém algumas vezes a queda dessas células é tão brusca e os níveis de viremia tão altos, que infecções oportunistas podem ocorrer. Os níveis de CD8<sup>+</sup> e células B também declinam, porém os níveis de CD8<sup>+</sup> voltam ao normal ou acima dos níveis normais cerca de três ou quatro semanas após a síndrome aguda. Apesar

dos altos níveis de vírus em replicação nesta fase, os testes de rotina para detecção de anticorpos geralmente falham em detectar a nova infecção, pois a síndrome clínica da infecção primária precede a soroconversão. Nesta fase, os testes mais sensíveis são aqueles que detectam o próprio vírus (Cohen e cols., 1998; Kahn e cols, 1998).

Em uma segunda fase, denominada de latência clínica, a viremia plasmática é reduzida, e um estado de equilíbrio é alcançado devido à resposta imune específica, que limita a replicação viral. Neste período, morte celular e a substituição de células estão em equilíbrio com a produção de quantidades relativamente constantes de vírus e células infectadas na circulação, bem como declínio gradual de CD4. Após um período que pode variar entre três e dez anos, os números de CD4 caem a valores muito baixos e os sintomas de AIDS aparecem, juntamente com os altos níveis de carga viral e grande número de células infectadas em circulação. A AIDS é, portanto, caracterizada por uma perda crítica da competência do sistema imune, levando a uma severa imunossupressão, doenças constitucionais, doenças oportunistas e neoplasias (Coffin e cols., 1995; Cohen e cols., 1998; Kahn e cols., 1998).

### ***1.9 Patogênese***

Os indivíduos infectados pelo HIV apresentam disfunções em praticamente todos os componentes do sistema imune, incluindo: diminuição da função de células T auxiliaadoras, resposta de hipersensibilidade tardia alterada, deficiência de resposta T citotóxica, diminuição de células *natural killer*, bem como alteração da atividade de apresentação de antígeno. Células apresentadoras de antígeno (APC) infectadas com HIV possuem propriedades alteradas, com diminuição de MHC-II (complexo maior de

histocompatibilidade classe II) e CD80/86 e aumento de Fas e FasL, o que resulta em sinalização aberrante. Essas alterações induzem a deleção clonal de células T auxiliadora via apoptose (Shearer, 1998).

O sistema imune é cronicamente ativado em resposta a replicação persistente do HIV, o que favorece o aumento da infecção (Cohen e cols., 1998; Shearer, 1998; Lawun e cols., 2001; Sereti e cols., 2001). O ciclo viral do HIV está intimamente ligado ao estado de ativação celular, sendo dependente da exposição de receptores de superfície celular para entrada na célula, das muitas vias citoplasmáticas para eventos aferentes e eferentes do seu ciclo e da maquinária de transcrição do núcleo da célula para a expressão de seus genes. Embora a ativação imune em resposta a microorganismos seja essencial para montar uma resposta efetiva, paradoxalmente, no caso do HIV, ela fornece um ambiente imunológico que direciona a replicação viral e a progressão da doença, e que pode levar ainda a alterações do genótipo e fenótipo viral, aumentar a apoptose das células do sistema imune e suprimir a regulação hematopoiética (Lawn e cols., 2001).

Além de fatores relacionados com o hospedeiro, que incluem ativação celular, resposta imune e presença de certas citocinas, os níveis de replicação do HIV são influenciados por fatores virais, tais como: *fitness* replicativo, taxas de mutação e citopatogenicidade. Um aumento da replicação, de forma consistente, é observado quando o sistema imune de indivíduos infectados com HIV é ativado por estímulos exógenos, como por patógenos oportunistas. Estes fatores exógenos têm um papel fundamental na regulação da replicação viral, por perturbar a ativação celular e produção de citocinas. A infecção pelo HIV pode ainda apresentar um curso mais agressivo em países onde não existem boas condições sanitárias, provavelmente, devido a constante ativação do sistema imune em decorrência do alto nível de doenças endêmicas, como tuberculose, malária, infecções com

helmintos, etc. (Fauci, 1996, Lawn e cols., 2001). Entretanto, uma evolução mais rápida para a AIDS pode ser resultante de fatores diversos tais como a circulação cada vez maior de cepas mais virulentas e à precariedade nos serviços de saúde. Estes fatores contribuem ao mesmo tempo para o surgimento de co-infecções que parecem estar associadas à progressão para AIDS (Lawun e cols. 2001).

Dentre as manifestações da ativação do sistema imune induzidas pelo HIV, podemos citar: hipergamaglobulinemia, proliferação espontânea de linfócitos, ativação de monócitos, aumento da expressão de marcadores de ativação em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, hiperplasia linfóide, aumento da expressão de citocinas proinflamatórias, elevação dos níveis de microglobulina (Cohen e cols., 1998).

A disfunção e depleção de células T CD4<sup>+</sup> são resultados de efeitos diretos do vírus, que infecta e destrói estas células, bem como de efeitos indiretos, que incluem: formação de sincício (que corresponde à fusão entre células infectadas e não infectadas, resultando em células gigantes multinucleadas ou sinciciais), reações de autoimunidade, estimulação por superantígenos, destruição de células não infectadas carregando gp120 na sua superfície levando a infecção de células progenitoras e apoptose (Cohen e cols., 1996; Shearer, 1998). A destruição de células T não infectadas é um dos grandes responsáveis pela depleção de células T periféricas e ocorre em tecidos linfóides, onde essas células entram em contato com outras infectadas ou com gp120 solúvel (Vlahakis e cols., 2001).

Foi demonstrado por Vlahakis e colaboradores (Vlahakis e cols., 2001), que a ativação do receptor de quimiocina pelo envelope do HIV deve determinar o mecanismo de morte celular de linfócitos T infectados ou não. A ativação de CCR5 induz um mecanismo de morte celular dependente de caspases em células T infectadas e não infectadas, enquanto a ativação de CXCR4 por vírus X4 causa morte de células T CD4 infectadas ou não

infectadas e de células T CD8 por mecanismo independente de caspases. Estes resultados sugerem que células T CD8 podem ser depletadas, *in vivo*, quando em contato, dentro do tecido linfóide, com vírus X4 ou com proteínas solúveis do envelope, além disso, demonstram que inibidores de caspases não alteram esse processo de morte celular. Cepas trópicas para CCR5 predominam nos estágios iniciais da infecção e estão associadas com o declínio de CD4, mas não o de células CD8. Nos estágios tardios da infecção as cepas X4 prevalecem e há tanto depleção de células CD4, como de CD8 (Vlahakis e cols., 2001).

Os mecanismos de disfunção de células T CD4 são somente parcialmente compreendidos. Durante a infecção vários marcadores de superfície de ativação, moléculas co-estimulatórias e citocinas são expressos de forma alterada. A perda funcional de células T CD4, além da perda quantitativa, permite a compreensão da dimensão da imunopatogênese do HIV (Cohen e cols., 1998).

As citocinas são mediadores solúveis da inflamação, ativação, diferenciação e processos de quimiotaxia e têm um efeito complexo na resposta ao HIV. A replicação do HIV é regulada positivamente por várias citocinas: IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, TNF- $\beta$ , M-CSF, GM-CSF, sendo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  as mais potentes. Por outro lado, a secreção de outras, como INF- $\alpha$  e INF- $\beta$ , resulta em supressão da replicação (Fauci, 1996; Cohen e cols., 1998).

## ***2.0 Resposta Imune***

Logo após a infecção com HIV, observa-se uma rápida e forte resposta celular específica, com potente atividade de linfócitos T auxiliares e resposta T citotóxica mediada por linfócitos T CD8, cujo pico de atividade corresponde a uma profunda queda da

viremia plasmática (Shearer, 1998). A resposta imune primária também inclui altos títulos de anticorpos específicos para o HIV, que mesmo não sendo neutralizantes, podem propiciar a diminuição da viremia por mecanismos como: lise mediada por complemento, ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos) e outros (Cohen e cols., 1998).

Os anticorpos neutralizantes são detectados na fase crônica e seu papel no controle da replicação do HIV *in vivo* ainda não está claro. Muitos desses anticorpos reconhecem a região V3 da gp120 e impedem a fusão vírus-célula e a entrada do vírus na célula alvo (Cohen e cols., 1998). Os anticorpos neutralizantes são mais eficientes em neutralizar cepas de laboratório trópicas para CXCR4, por estas possuírem o domínio V3 mais exposto, enquanto que nas cepas trópicas para CCR5 a alça V3 é pobremente exposta. Embora estas últimas sejam capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes, apresentam resistência à neutralização (Bou-Habib e cols., 1994). Os vírus primários utilizam preferencialmente o correceptor CCR5 e são mais resistentes à resposta imune humoral.

O papel fundamental dos linfócitos T citotóxicos na supressão da replicação viral é sugerido pela clara relação entre resposta CTL (linfócito T citotóxico) e diminuição da viremia, bem como diminuição da atividade CTL específica com a progressão da doença (Cohen e cols., 1998; Letvin e cols., 2001). Os linfócitos T citotóxicos reconhecem antígenos processados e apresentados juntamente com proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-1) e além de levar à lise celular, produzem vários mediadores solúveis, entre eles citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , quimiocinas (ex: RANTES) e citotoxinas (ex. perforina) (Letvin e cols., 2001; Appay e cols., 2000).

Os mediadores liberados pelos CTLs têm ações variadas e contribuem para a vasta gama de funções exercidas por esses linfócitos. As perforinas, por exemplo, promovem a

destruição da célula através da formação de poros na membrana celular de células alvo. Foi demonstrado por Appay e colaboradores (Appay e cols., 2000), através da análise de fatores solúveis secretados por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos assintomáticos infectados com HIV, que essas células eram funcionais quanto a produção de citocinas, porém produziam muito menos perforina, o que poderia resultar em células incapazes de eliminar o vírus.

## **2.1 Variabilidade genética**

O HIV-1 apresenta alto nível de variação genética resultando em isolados com seqüências de nucleotídeos e aminoácidos divergentes. Essa grande diversidade genética é um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina universal eficaz. Além disso, permite o escape da resposta imune, possibilita o aumento de resistência a drogas e pode interferir na sensibilidade e especificidade de testes diagnósticos (Hu e cols., 1996; Osmanov e cols., 1996; Robertis e cols., 1988; Bonhoeffer e cols. 1995; Peeters e cols, 2000; Thomson e cols, 2001).

A emergência de vírus mutantes pode ser atribuída à rápida geração e *turnover* de variantes virais e a alta taxa de erro da transcriptase reversa do vírus, que resulta na substituição de aproximadamente um nucleotídeo por genoma viral por ciclo de replicação. A transcriptase reversa não apresenta atividade exonucleásica 5'-3' durante o processo de síntese da dupla fita de DNA, o que permite que os erros não corrigidos sejam incorporados durante a síntese do DNA viral. Substituições, deleções e inserções também podem ocorrer, embora a frequência desses erros sejam mais difíceis de estimar (Cohen e cols., 1998; Osmanov e cols., 1996; Zhang e cols., 1997; Robertis e cols., 1988).

Outro mecanismo que favorece o aumento da diversidade viral é o mecanismo de recombinação, que ocorre quando diferentes vírus estão replicando dentro da mesma célula. O alto poder de recombinação do HIV, aparentemente, é consequência do seu genoma dimérico e de uma transcriptase reversa que pode realizar troca de fitas durante a síntese do DNA proviral. Com o aumento da análise de seqüências virais por sequenciamento total do genoma, um grande número de recombinantes e mosaicos têm sido identificados (Robertson e col., 1995, Malim e cols., 2001).

Pressões seletivas do hospedeiro também têm sido propostas como responsáveis pela geração de diversidade e incluem: resposta imune celular e humoral e tropismo celular. A administração de antiretrovirais também pode selecionar formas mutantes. Portanto, a ocorrência de quasispecies virais (seqüências de HIV geneticamente distintas dentro de um mesmo indivíduo), parece ser modulada por uma combinação de mutações e forças de seleção, não devendo ser um evento neutro ou resultante do acaso. (Bonhoeffer e cols., 1995; Zhang e cols., 1997; Cohen e cols., 1998; Coffin e cols., 1995).

### ***2.1.1 Classificação do HIV***

Até o momento, dois tipos virais do HIV foram identificados: HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é encontrado quase que exclusivamente nas regiões Centro-Norte e Noroeste da África e Ásia, enquanto o HIV-1, difundido em todo mundo, é responsável por mais que 99% das infecções. As rotas de transmissão são as mesmas para ambos os vírus, sendo a transmissão heterossexual a de maior importância.

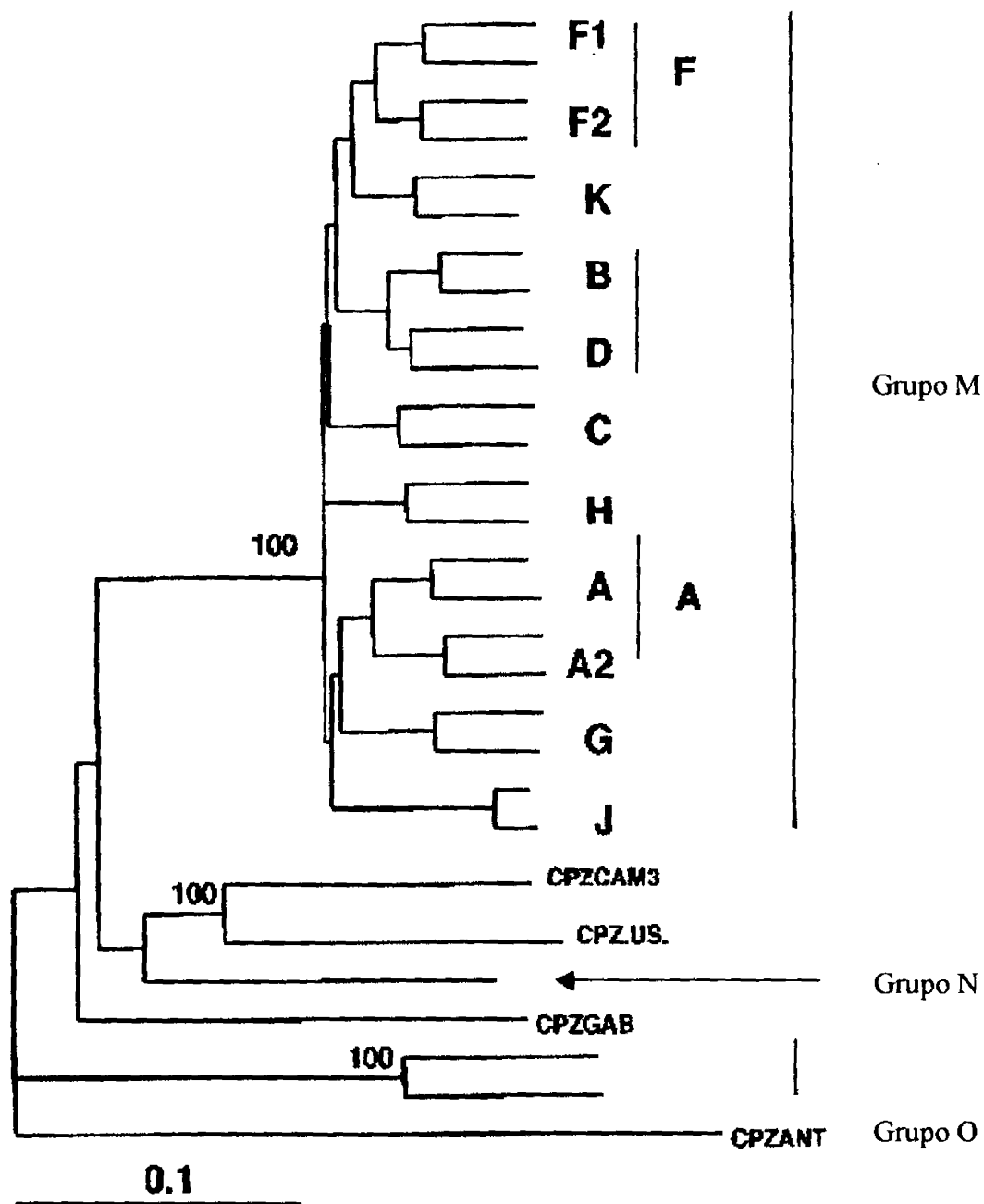
Com base na análise filogenética de diferentes isolados virais, o HIV-1 foi dividido em três grupos: o M (*major*) e O (*outlier*) e o grupo N (“*new*” ou “*non M-non O*”) (Simon e cols., 1998). O grupo O é raro, sendo encontrado principalmente na República dos



Camarões, Gabão e Guiné Equatorial. O grupo N foi descrito em um número limitado de isolados provenientes de Camarões (Simon e cols., 1998). O grupo M agrupa pelo menos 20 tipos genéticos, subdivididos em 9 subtipos distintos (A-D, F, G, H, J e K) (Figura 7) e 11 formas recombinantes circulantes (Tabela 1) (Peters M., 2000; Moore e cols., 2001; Thomson e cols, 2001).

Dentro de um mesmo subtipo, a percentagem de divergência das seqüências C2V3 da gp120 está entre 7-20% e entre dois subtipos diferentes entre 20 e 30%. Quando se analisam regiões diferentes do genoma o grau de divergência também é variável, os subtipos virais diferem um do outro em cerca de 14% nas regiões codificadoras de *gag* (core viral) e em cerca de 30% nas seqüências que codificam *env* (Leitner e cols., 1996). Este alto grau de diversidade pode indicar que vacinas baseadas em apenas um subtipo podem não elicitar uma resposta imune ampla para evitar a infecção por outros subtipos (Sharp e cols., 1994).

Um vírus recombinante é identificado quando seqüências de diferentes subtipos podem ser observadas em um mesmo genoma viral, o que requer a infecção simultânea de uma célula com duas cepas diferentes. A descoberta de um grande número de recombinantes indica claramente que co-infecção com cepas diferentes do HIV-1 não é um evento raro (Cornelissen e cols., 1996; Peeters e cols., 2000). Em qualquer região geográfica, a probabilidade da ocorrência de um vírus recombinante depende de vários fatores: prevalência de diferentes subtipos, probabilidade de certos grupos populacionais adquirirem e transmitirem infecções múltiplas e do *fitness* do vírus recombinante gerado. A manutenção dessa forma genética depende de vantagens competitivas do vírus quimérico,



**Figura 07:** Relação evolucionária entre cepas de HIV-1 não recombinantes e linhagem HIV-1/SIVcpz. A árvore filogenética mostra os diferentes grupos, subtipos e sub-subtipos do HIV-1.

(retirado e adaptado de Peeters M., 2000)

**Tabela 1. Resumo das Formas Recombinantes Circulantes (CRF) definidas do grupo M do HIV-1**

<b>Nome</b>	<b>Subtipos envolvidos</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
CRF01-AE	A, E	predominante no sudeste da Ásia, esporádico na Ásia Central
CRF02-AG	A, G	predominante no oeste e centro da África
CRF03-AB	A, B	Rússia
CRF04-cpx	A, G, H, K, U	Grécia, Ciprus
CRF05-DF	D, F	República Democrática do Congo
CRF06-cpx	A, G, J, K	oeste da África (Mali, Senegal, Nigéria, Niger, Burkina Faso)
CRF07-BC	B, C	noroeste da China
CRF08-BC	B, C	Sudeste da China
CRF09-cpx	não publicado	Senegal, US
CRF10-CD	C, D	Tanzânia
CRF11-cpx	A, E, G, J	África central (Camarões, Gabão, República Africana Central)

(adaptado a partir de Peters M., 2000)

sendo a seleção baseada na geração de combinações benéficas dos produtos dos genes *env* e *gag* (Cornelissen e cols., 1996). Uma infecção mista, por sua vez, ocorre quando múltiplas cópias filogeneticamente distintas de um mesmo gene representando diferentes genomas virais estão presentes dentro de um mesmo indivíduo. (Ramos e cols., 1999).

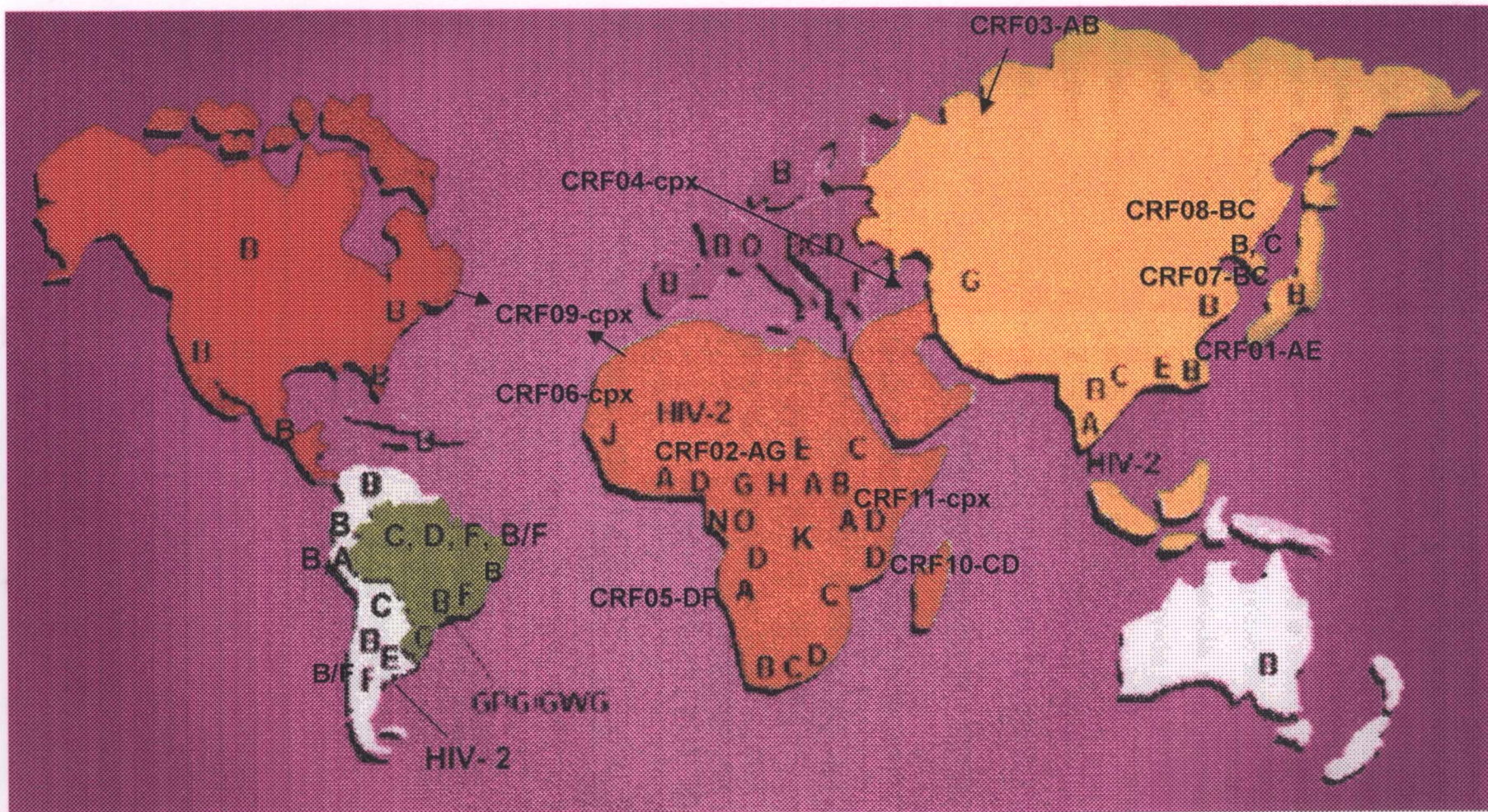
Alguns genomas recombinantes do HIV-1 são únicos, entretanto, outros, foram identificados em vários indivíduos aparentemente não relacionados e têm um papel importante na epidemia global da AIDS, sendo denominados de “formas recombinantes circulantes” (CRF) (Carr e cols., 1998). A designação CRF inclui as letras dos subtipos parentais (por exemplo: CRF01\_AE), porém se o CRF for derivado de mais que três subtipos, as letras são trocadas por *cpx* (*complex*) (Moore e cols., 2001). Os vírus identificados inicialmente como subtipos I e E são considerados agora como recombinantes intersubtipos e são denominados CRF04\_cpx e CRF01\_AE respectivamente.

Para definir um novo subtipo ou CRF são necessárias três seqüências quase completas do genoma, ou duas completas, juntamente com seqüências parciais, identificadas em pelo menos três indivíduos sem ligação epidemiológica (Peeters e cols., 2000).

### ***2.1.2 Distribuição das variantes do HIV-1 no mundo (Figura 8)***

Todos os grupos e subtipos virais estão presentes na África, enquanto que no resto do mundo a distribuição é bastante heterogênea e dinâmica. Os subtipos C e A correspondem à maioria das infecções, seguidos pelo subtipo B e recombinantes CRF01\_AE e CRF\_AG (Moore e cols., 2001). O subtipo A é prevalente na África Central e encontrado também na Europa, Rússia e leste da Ásia. O subtipo B compreende a maioria dos vírus isolados nos Estados Unidos, sendo também prevalente na Europa, Austrália,





**Figura 08:** Distribuição mundial dos diferentes subtipos de HIV-1 do grupo M, grupo O e HIV-2 (adaptado a partir de HU e cols., 1996; Peeters M., 2001 – revisado em março de 2002)



cols., 2000; Peeters e cols., 2000; Thomson e cols., 2001). A determinação dos subtipos do HIV é muito útil também para o entendimento da origem e disseminação global do vírus (Tatt e cols., 2000). O estudo da diversidade do HIV fornece ainda informações sobre a dinâmica da replicação viral, a pressão exercida pela resposta imune do hospedeiro ou pela terapia, e a compartimentalização da resposta viral do hospedeiro (Cohen e cols., 1998).

Tem sido relatada ainda, para algumas formas genéticas uma susceptibilidade diminuída, *in vitro*, a algumas drogas antiretrovirais (Decamps e cols., 1998). Dentro deste mesmo contexto alguns estudos têm demonstrado que ensaios de determinação de carga viral podem não fornecer resultados equivalentes para diferentes subtipos do HIV (Mercado e cols., 1999). A determinação dos subtipos circulantes também permite que testes sorológicos e de diagnóstico molecular possam ser constantemente reavaliados, a fim de evitar que subtipos ou recombinantes não sejam detectados (Thomson e cols., 2001).

A introdução em uma população, de subtipos diferentes ou de formas recombinantes pode, portanto, representar um grande impacto na epidemiologia do HIV-1, modificando o polimorfismo genético vigente. Isto enfatiza a necessidade de uma vigilância epidemiológica continuada tanto no Brasil, quanto no mundo.

## ***2.2 Polimorfismo viral do HIV-1 no Brasil***

A epidemia no Brasil assume diferentes padrões de transmissão e distribuição dos subtipos dependendo da região geográfica. Os subtipos B, C, D, F têm sido detectados no Brasil (Sabino e cols., 1996; Galvão-Castro e cols., 1996; Morgado e cols., 1998; Couto-Fernandez e cols., 1999; Stefani e cols., 2000; Rossini e cols., 2001; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization), bem como recombinantes B/F (Sabino e cols., 1994;

Tanuri e cols., 1999; Ramos e cols., 1999), com clara predominância do subtipo B em todas as regiões. Recentemente, foi detectado ainda, em amostras provenientes do Rio de Janeiro, um subtipo A (Caride et al, 2001; Morgado et al, 2002).

Recombinantes B/F foram demonstrados primeiramente por Sabino e col, em 1994, através da análise da seqüência do gene *env*, a partir de dois indivíduos no Rio de Janeiro. Tanuri e colaboradores (Tanuri e cols., 1998), analisando amostras de doadores de sangue do Rio, encontraram além de genomas B/F, potenciais mosaicos B/D. Além disso, infecções mistas também tem sido bem documentadas. Janini e colaboradores (Janini e cols., 1998) demonstraram a primeira evidência tanto de transmissão horizontal como vertical de dois subtipos distintos do HIV-1 de uma pessoa infectada para outra. Em outro trabalho, a análise de 79 amostras também no Rio de Janeiro revelou através de uma combinação de ensaios moleculares e sequenciamento, 3 infecções duplas entre os subtipos F e B, F e D e B e D, bem como 6 genomas recombinantes envolvendo os subtipos B e F (Ramos e cols., 1999). De acordo com Ramos e colaboradores (Ramos e cols., 1999), a frequência de infecções mistas deve ser subestimada, já que estas infecções provavelmente não são detectadas pelos métodos usuais utilizados com o propósito de subtipar o HIV.

Tem sido sugerido que os subtipos do HIV podem estar associados com diferentes modos de transmissão, porém este fato é bastante controverso na literatura. Morgado e colaboradores (Morgado e cols., 1998), analisando 131 amostras do Rio de Janeiro, não encontraram nenhuma associação estatisticamente significativa entre subtipo e categoria de exposição, sexo ou modo de transmissão. Ramos e colaboradores (Ramos e cols., 1999), também analisando amostras provenientes do Rio de Janeiro, não encontraram nenhuma associação entre infecções duplas ou recombinação e variáveis clínicas ou demográficas. Em outro trabalho, conduzido pela Rede Brasileira para Isolamento e Caracterização do

HIV, também não foi encontrada nenhuma associação significativa entre subtipos e modo de transmissão ou propriedades biológicas dos isolados do HIV provenientes dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Entretanto, Sabino e colaboradores (Sabino e cols., 1996), analisando amostras de São Paulo, sugeriram que a presença do subtipo F estava associado com usuários de drogas injetáveis. Neste trabalho, o subtipo F esteve presente em 6% dos casos totais, mas em 33% dos casos associados ao uso de drogas injetáveis. Outro estudo realizado com amostras da Bahia detectou subtipo F apenas entre usuários de drogas endovenosas, embora a porcentagem de F (2 amostras–3%) tenha sido muito baixa (Couto-Fernandez et al, 1999). Foi sugerido ainda, por Pinto et al, em 2000, que o subtipo F parece ser menos susceptível a drogas antiretrovirais do que o subtipo B. Além disso, Mercado e colaboradores (Mercado e cols., 1999) demonstraram que métodos de amplificação não conseguiram detectar a carga viral de forma acurada, ou seja, falharam em detectá-la em amostras brasileiras definidas como subtipo F.

Vários estudos têm mostrado que muitos isolados brasileiros têm na alça V3 da gp120 uma composição típica de aminoácidos (GWGR). Assim, no Brasil, se encontram duas variantes principais do subtipo B, uma correspondente a GPGR que é relativamente bem conservada em muitos isolados da África, Europa e Estados Unidos, e outra chamada B'' ou BBr, que apresenta o motivo GWGR tipicamente encontrada no Brasil (Morgado e cols., 1998; Covas e cols., 1998; Morgado e cols., 1998; Santoro-Lopes e cols., 2000). Além disso, a variante B'' difere do B na composição de aminoácidos nas regiões V1 e V2 do envelope viral (Costa e cols., 1995; Santoro-Lopes e cols., 2000; Brazihan Network, 2000). Em muitos isolados brasileiros, o motivo GWGR é tão comum como o motivo GPGR. Alguns trabalhos relatam uma frequência de GWGR de 30 a 57%, dependendo da região geográfica (Galvão-Castro e cols., 1996; Covas e cols., 1998; Morgado e cols.,



1998). De acordo com Costa e colaboradores (Costa e cols., 1995), a alta prevalência de GWGR pode indicar que alguma pressão seletiva ou vantagem evolutiva deve ter ocorrido no Brasil e que esta variante deve ter um antecessor comum. Covas e colaboradores (Covas e cols., 1998), encontraram em amostras de Ribeirão Preto/São Paulo, uma prevalência de 57% de GWGR e sugerem que este fato pode decorrer de um efeito fundador ou resultado de um maior potencial infectivo desta variante.

Proporções similares de B e B'' foram detectadas por Morgado e colaboradores (Morgado e cols, 1998), independentemente do sexo ou via de transmissão. Os autores sugerem que a variante B'', provavelmente, emergiu ou foi introduzida desde o início da epidemia da AIDS e se espalhou entre todas as categorias. Casseb e colaboradores (Casseb e cols,1998) usando testes sorológicos baseados no motivo V3, também encontraram distribuições semelhantes das variantes GWGR e GPGR em São Paulo, bem como prevalência similar entre homens e mulheres. Além disso, foi observado também nesse trabalho, igual distribuição de GPGR e GWGR independentemente da contagem de células CD4, estadiamento clínico e modo de transmissão. Santoro-Lopes e colaboradores (Santoro-Lopes, 2000) utilizando amostras provenientes do Rio e metodologia de sorotipagem de peptídios da alça V3, também não encontraram diferença entre B e B'' em relação ao sexo, nível de educação, carga viral e contagem de células CD4<sup>+</sup>. Entretanto, neste mesmo estudo, foi observado que indivíduos infectados com o sorotipo B progridem mais rápido para a AIDS do que aqueles com sorotipo B''. Portanto, os resultados desse estudo sugerem que os dois principais sorotipos que causam infecção no Brasil podem influenciar no prognóstico da infecção pelo HIV. Foi demonstrado ainda, por Covas e colaboradores (Covas e cols., 1998), através de RFLP, uma prevalência maior de GWGR em mulheres provenientes de Ribeirão Preto/SP, independentemente da via de transmissão.

Através de ensaios de sororeatividade da alça V3 foi detectado em amostras do Rio de Janeiro por Santoro-Lopes e colaboradores (Santoro-Lopes, 2000), os sorotipos B, F, A, C, D. De acordo com os autores, há uma boa correlação entre os ensaios usados e os resultados de sequenciamento genômico para os subtipos B, B” e C. Outros ensaios utilizando a metodologia de sororeatividade à peptídios da alça V3 não conseguiram distinguir entre infecções com os subtipos B e F, ou seja, nenhuma diferença de sororeatividade pode ser observada (Couto-Fernandez e cols., 1999; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, 2000). Além disso, padrões de neutralização cruzada foram observados entre variantes genéticas do subtipo B no Brasil, sugerindo que a neutralização viral não é um obstáculo maior quando se considera a variabilidade do subtipo B, especificamente na alça V3 (Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, 2000).

## 2. OBJETIVOS

### *2.1 Geral:*

- Estudar o polimorfismo viral do HIV no estado do Ceará.

### *2.2 Específicos:*

- Estimar a prevalência de subtipos de HIV-1 no estado do Ceará;
- Verificar a existência do fenômeno de recombinação;
- Verificar a existência ou não de possíveis associações entre diferentes variáveis clínicas e demográficas e subtipos de HIV-1;
- Determinar a porcentagem de amostras caracterizadas como típicas brasileiras quanto à seqüência GWGR na região V3 da glicoproteína 120.

### 3. JUSTIFICATIVA

A pandemia HIV/AIDS tem afetado profundamente a economia, os trabalhadores e suas famílias, com conseqüências muito dispendiosas, especialmente em países pobres. A doença acomete geralmente as pessoas durante a idade mais produtiva, afetando tanto a produtividade e renda familiar, como gastos nacionais com saúde (Gayle e cols., 2001).

Estima-se que desde o início da epidemia da AIDS mais de 60 milhões de pessoas já se infectaram com o HIV. A maioria das novas infecções ocorre em adultos jovens, sendo as mulheres jovens particularmente vulneráveis (UNAIDS, 2001). Segundo a OMS/UNAIDS, cerca de 34,3 milhões de pessoas estavam vivendo com AIDS no final de 1999 e deste total, 95% residiam em países em desenvolvimento.

Vários fatores, como a pobreza, migração, instabilidade econômica, fatores sociais e ambientais, uso de drogas e altas taxas de DSTs, favorecem a disseminação do HIV (Gayle e cols., 2001). Além disso, o aumento na quantidade de viagens internacionais e migração têm contribuído para a rápida disseminação do HIV-1 ao redor do mundo (Janini e cols., 1998, Thomson e cols., 2001).

Em virtude da grande diversidade e aumento da disseminação das formas genéticas do HIV-1, bem como em função do aumento do número de casos de AIDS nos estados do nordeste, tornou-se imperativo ampliar o conhecimento para outras regiões do país. Até então, no nordeste, apenas os estados da Bahia e Sergipe possuíam estudos de caracterização genotípica do HIV-1.

Diante desta realidade, foram coletadas amostras de pacientes, provenientes do Ceará, com sorologia positiva para o HIV-1, a fim de se estimar prevalência dos subtipos do HIV-1 neste estado, bem como avaliar possíveis associações entre os subtipos genéticos

com sexo, estadiamento clínico, parâmetros como contagem de células CD4<sup>+</sup>, e outros, nos pacientes infectados.

O estado do Ceará é um dos estados mais pobres do Brasil, juntamente com Alagoas, Piauí e Maranhão, sendo o terceiro estado do nordeste em número total de casos notificados de AIDS, com 3.165 casos até setembro de 2000. Nesse estado, a disseminação do HIV está relacionada ao êxodo rural, que concentra, na periferia, grandes aglomerados de baixa renda, baixa escolaridade e pouco acesso aos serviços básicos de saúde (Ministério da Saúde, 2000). Além disso, o turismo sexual é outro fator importante para a disseminação do vírus e está relacionado com a possibilidade de introdução de novos subtipos. A introdução de novos subtipos implica no re-planejamento de estratégias terapêuticas e profiláticas e na possibilidade de emergência de novos vírus recombinantes. Estas formas genéticas são geradas em indivíduos infectados com vírus de diferentes subtipos, o que não é uma situação rara em áreas onde mais de um subtipo estão co-circulando.

Embora evidências demonstrando diferenças significativas na transmissão e patogenicidade entre as diferentes formas genéticas do HIV-1 sejam inconclusivas, o conhecimento da prevalência e das mudanças temporais na incidência de infecção dessas variantes em diferentes áreas geográficas é relevante por vários motivos. Corrobora no delineamento da origem e propagação da epidemia em cada região geográfica, o que pode ser útil na implementação de medidas preventivas. Pode também ser relevante para o desenho de vacinas adaptadas especificamente para variantes do HIV circulantes em cada área. A determinação dos subtipos circulantes possibilita ainda que testes sorológicos e de diagnóstico molecular sejam constantemente reavaliados e monitorados, a fim de evitar que subtipos ou formas recombinantes não sejam devidamente detectados.

Considerando os aspectos relacionados ao vírus e à epidemia causada por ele, fica evidente a necessidade de reforçar e/ou implementar o sistema de vigilância do polimorfismo do HIV a fim de se realizar, tanto no Ceará quanto em outros estados que não possuem esse tipo de medida uma rápida detecção da possível propagação de vírus não B ou de recombinantes.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 População do estudo

Para realização deste estudo foram coletadas amostras de sangue total de 149 pacientes. Foram incluídos pacientes atendidos no hospital de referência para doenças infecto-contagiosas do estado do Ceará – Hospital São José, encaminhados para exames de carga viral, com intuito de monitorar tratamento ou avaliar a necessidade de se iniciar a terapia. Todos apresentavam sorologia positiva para anti-HIV determinada por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e confirmada por imunofluorescência ou Western blot, de acordo com o fluxograma recomendado pelo CN/DSTAIDS/MS. A faixa etária dos pacientes variou de 2 a 70 anos e a coleta do material foi realizada de março a setembro de 2000.

O Hospital São José de doenças infecto-contagiosas é o maior centro de referência para portadores de HIV/AIDS no estado do Ceará. Este centro acompanha atualmente, em ambulatório, cerca de 1500 pacientes. Recebe 30-40 pacientes novos/mês, provenientes dos mais diversos municípios.

No momento anterior à coleta, todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado elaborado no LASP/CPQGM/FIOCRUZ com as informações referentes ao estudo (Anexo 1). O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, tendo recebido parecer favorável.

O estudo tem as características de um estudo descritivo observacional do tipo corte transversal, onde foram analisados os dados epidemiológicos, clínicos e o DNA proviral dos pacientes.

#### ***4.2 Coleta de sangue***

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção asséptica em tubos monovetes contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético). A coleta de 5ml de sangue total foi realizada no Hospital São José e as amostras enviadas inicialmente ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do Ceará para contagem de células CD4<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Em seguida, as amostras foram enviadas no mesmo dia, por avião, para o LASP-FIOCRUZ/CPqGM.

#### ***4.3 Separação de células mononucleares de sangue periférico por centrifugação em gradiente de ficol/hypaque.***

Após recebimento do sangue total, o plasma foi coletado por centrifugação a 1.500 rpm e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ao sedimento (2-3ml) foi adicionado PBS (*Phosphate Buffered Saline*) em quantidade superior ao plasma colhido. Após homogeneização, o sangue foi transferido para tubos de 15 ml contendo 5 ml de ficol/hypaque e centrifugado por 20 minutos a 2000 rpm à temperatura ambiente. O anel de células mononucleares foi coletado, transferido para outro tubo, e realizado procedimento de lavagem. O sedimento foi ressuspenso com PBS, distribuído em dois tubos eppendorf, centrifugado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



#### **4.4 Extração do DNA**

A obtenção do DNA genômico, a partir de leucócitos do sangue periférico, foi realizada pelo método de extração por fenol-clorofórmio. Esta técnica permite a desnaturação de proteínas presentes na fase orgânica e a separação dos ácidos nucleicos na fase aquosa.

Ao sedimento de células mononucleares do sangue periférico foi adicionado 400µl da solução de extração (proteínase K e tampão de lise na proporção 1:200) e a mistura incubada a 56<sup>0</sup> C por 3 horas. Em seguida, o lisado foi transferido para outro tubo e adicionado 45 µl de acetato de sódio e 500 µl de fenol. A suspensão foi misturada e centrifugada por 4 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionado fenol-clorofórmio. Após mistura em vortex, o tubo foi centrifugado por 4 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi coletada, adicionado 500 µl de clorofórmio e realizado o mesmo procedimento com fenol-clorofórmio. A fase aquosa foi novamente coletada e adicionado 1000 µl de etanol 100%. O material foi deixado por 12 horas a -70<sup>0</sup> C e em seguida centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 300 µl de etanol a 70%, com posterior centrifugação por 2 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco em termobloco a 70<sup>0</sup> C por 10 minutos. Foi adicionado 50 µl de água estéril e o DNA deixado em temperatura ambiente por cerca de 24 horas para homogenização.

#### 4.5 Identificação dos subtipos de HIV-1 pela técnica de HMA (Ensaio de Mobilidade do Heteroduplex), a partir dos genes *env* e *gag*

##### 4.5.1 HMA *env*

Os subtipos de HIV-1 foram determinados pelo ensaio de mobilidade do heteroduplex (Delwart et al, 1993).

A reação de PCR (Reação da polimerase em cadeia) foi realizada em duas etapas (PCR *nested*). Os primers usados na primeira etapa foram ED5/ED12 que amplificam aproximadamente 1,2 kb correspondente ao fragmento V1-V5 do gene *env* do HIV-1. Para a segunda etapa, utilizamos os primers ED31/ED33 que amplificam 600pb da C2-C3, ou ES7/ES8 que amplificam 700pb da V3-V5 (Tabela 2 e Figura 9). O volume de DNA usado foi estabelecido de acordo com a concentração da amostra, de forma a se utilizar cerca de 1µg de DNA genômico em cada reação. As reações de PCR foram feitas no Termo Ciclador Perkin Elmer 9600 seguindo as seguintes condições: três ciclos de 97<sup>0</sup> C (1min), 55<sup>0</sup> C (1min), 72<sup>0</sup> C (2min), seguido de 32 ciclos de 95<sup>0</sup> C (45seg), 55<sup>0</sup> C (1min), e 72<sup>0</sup> C (2min) e um ciclo de 10 min a 72<sup>0</sup> C. As reações de PCR foram realizadas num volume de 100µl contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 200mM de cada dNTP, 20pmol de cada primer, 1,25 mM MgCl (primeira etapa) ou 1,8 mM MgCl<sub>2</sub> (segunda etapa) e 2,5U de Taq polimerase (Pharmacia, Fine Chem., Swedem).

Foi utilizado controle negativo em todas as reações de PCR para monitorar a presença de possíveis contaminações.

**Tabela 2** – Apresentação das seqüências e posições dos primers utilizados para amplificação de regiões do envelope viral do HIV-1.

Gene env	Região	Seqüência (5'-3')	Posição
Primer externo	V1-V5	ED5 ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6556-6581
		ED12 AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG	7822-7792
Primers internos	V3-V5	ES7 TGTAACGACGGCCAGTCTGTAAATGGCAGTCT AGC	7001-7020
		ES8 CAGGAAACAGCTATGACCCACTTCTCCAATTGTCC CTCA	7667-7647
	C2-C3	ED31 CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG ED33 TTACATAGAAAAAATCCCCTC	6816-6844 7359-7380

(retirado e adaptado de Delwart et. al., 1993)

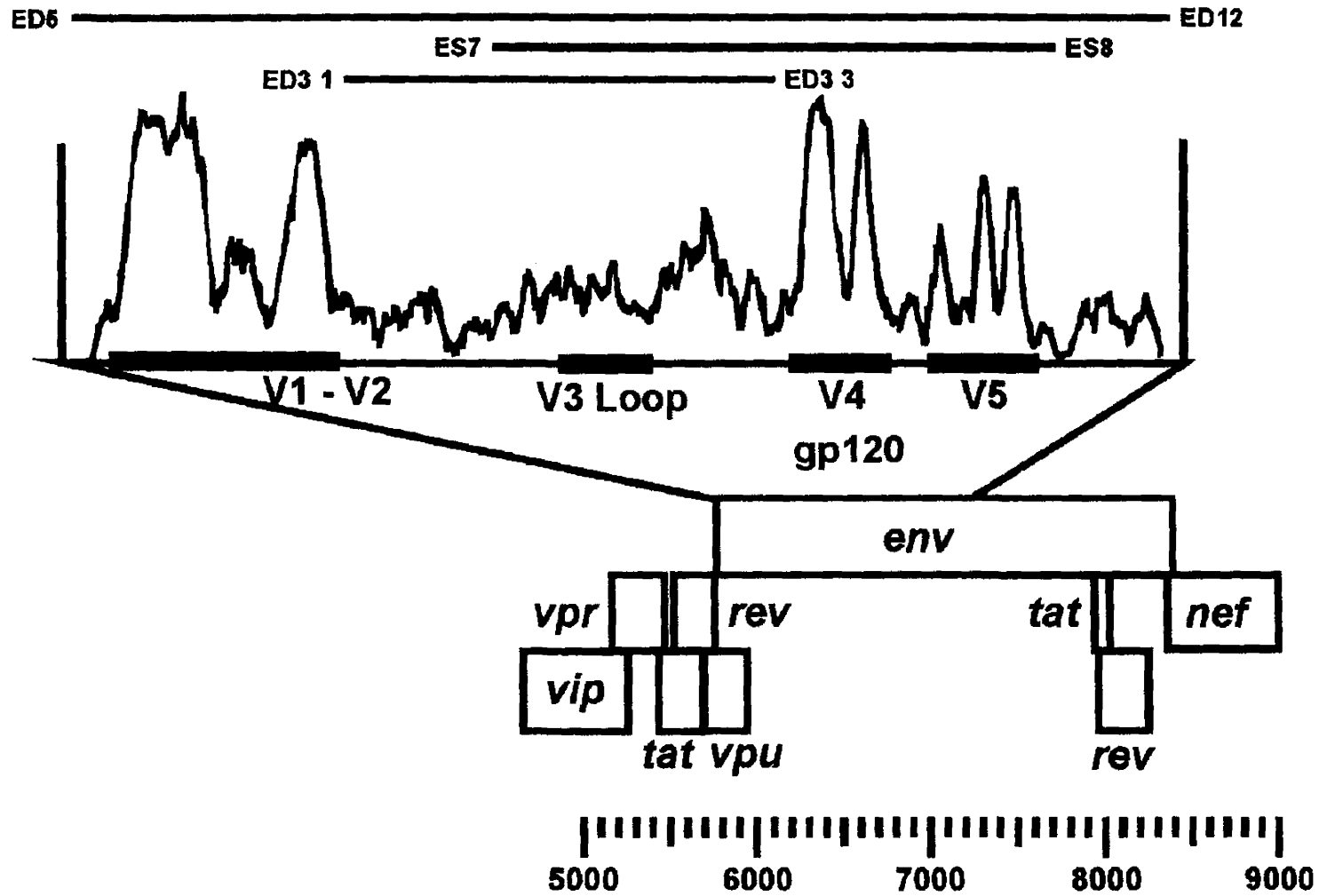


Figura 09: Representação esquemática das regiões amplificadas no gene *env* da gp120 do HIV-1

Para confirmar a amplificação, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tampão acetato EDTA) e corados com brometo de etídio.

Para formação dos heteroduplexes, 5µl dos produtos da segunda fase do PCR foram adicionados, individualmente, a 5µl dos produtos de PCR de amostras de referência fornecidas pelo *kit* para subtipagem por HMA e 1,1µl de tampão de hibridização 10X (NaCl 2M, Tris HCl 1M pH 7.8, EDTA 0,5M e H<sub>2</sub>O). Os heteroduplexes são formados a partir da etapa de desnaturação a 94<sup>0</sup> C por dois minutos, seguida por resfriamento por 10 minutos em banho de gelo.

As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida/bisacrilamida 5% para migração por eletroforese em tampão TBE (Tampão borato EDTA) 1X (Figura 10).

O subtipo foi determinado de acordo com a distância relativa de migração dos heteroduplexes, após a visualização do gel corado com brometo de etídio em transiluminador de UV.

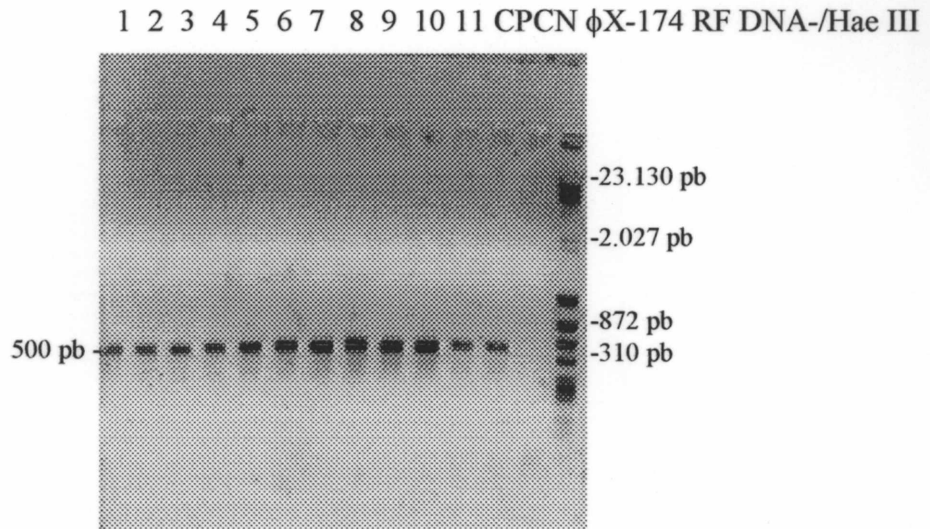
#### **4.5.2 HMA gag**

Os subtipos de HIV-1 foram determinados pelo ensaio de mobilidade do heteroduplex (Delwart et al, 1993), de acordo com os procedimentos descritos em Heyndrickx et al (2000).

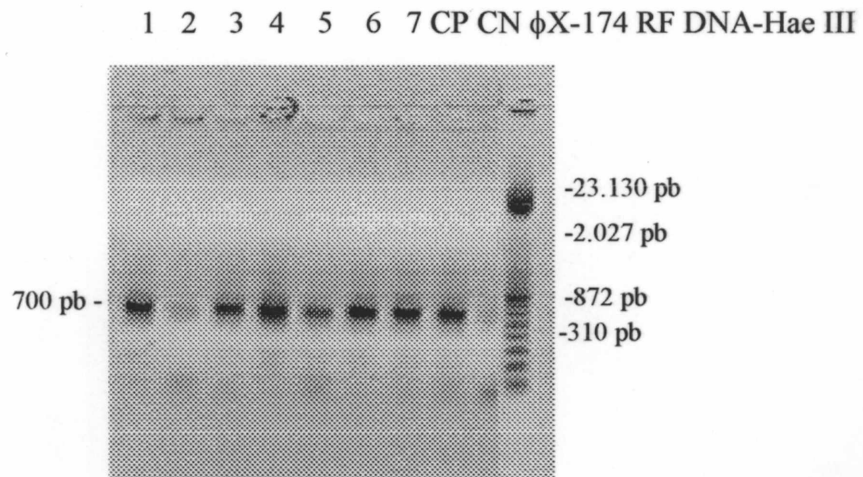
A reação de PCR foi realizada em duas etapas (PCR *nested*). Os primers utilizados na primeira etapa foram H1G77/H1P202 que amplificam 1,1 kb correspondente à região do aminoácido 16 da p24 do gene gag ao aminoácido 33 do gene da protease (Figura 12). Para

## Gene env

### a) Região C2 - C3



### a) Região V3 - V5



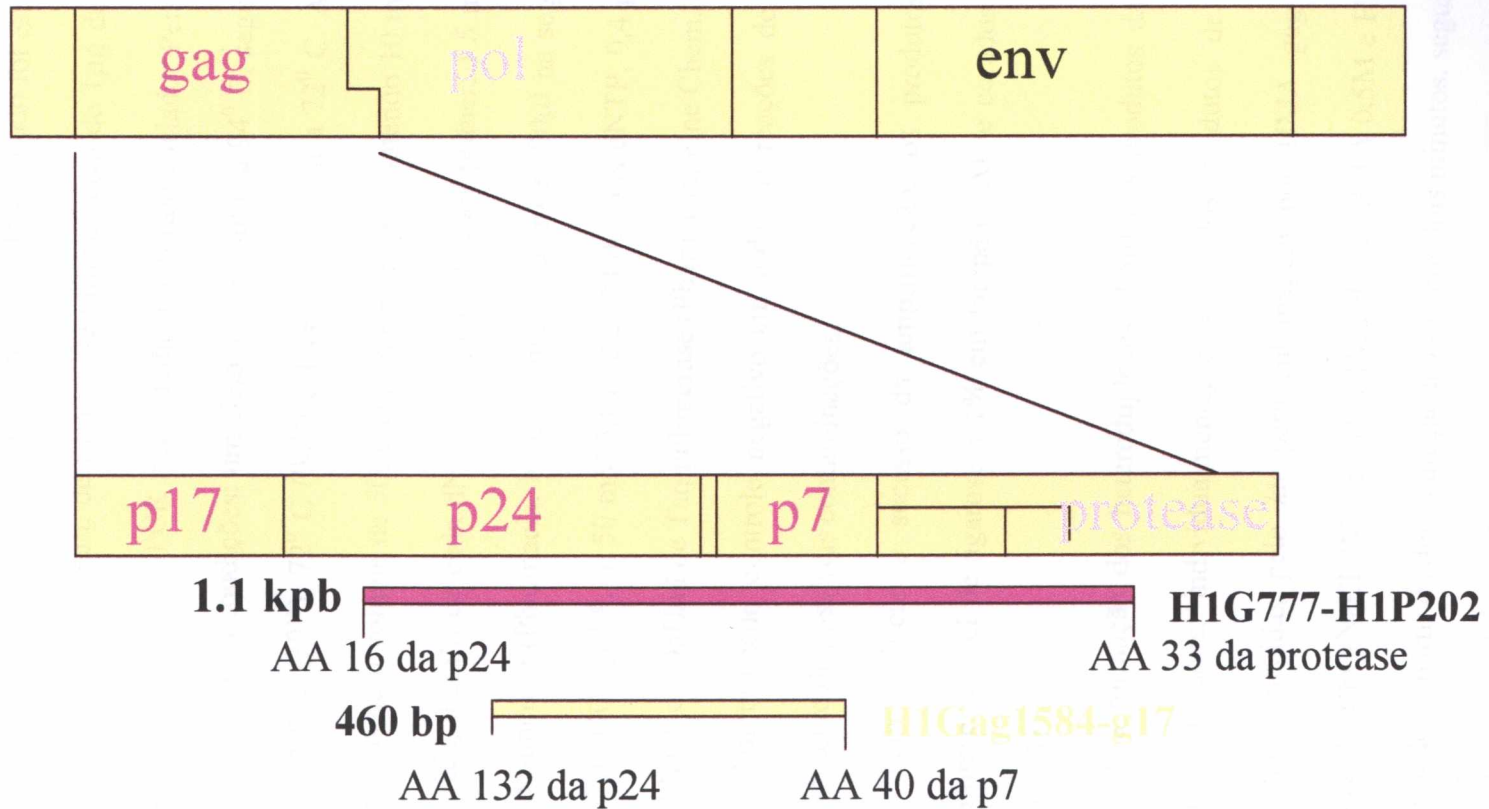
**Figura 10. Avaliação dos fragmentos de DNA proviral de HIV-1 amplificadas por PCR (gene env)**

Géis de eletroforese representativos: (a) fragmento da região C2-C3 de 500 pb do gene env e (b) fragmento da região V3-V5 de 700pb do gene env

## HMA gag

**H1G777-H1P202 – Primers do 1o. Round**

H1Gag1584-g17 – Primers do 2o. Round



**Figura 12.** Representação esquemática das regiões amplificadas no gene *gag* do HIV-1

a segunda etapa, utilizamos os primers H1Gag1584/g17 que geram um fragmento do gene gag de 460pb, correspondendo a região codificante para o aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7 (Tabela 3). O volume de DNA usado foi estabelecido de acordo com a concentração da amostra, de forma a se utilizar cerca de 1µg de DNA genômico em cada reação. As reações de PCR foram feitas no Termo Ciclador Perkin Elmer 9600 de acordo com as seguintes condições: um ciclo de 2 minutos a 94<sup>0</sup> C, seguido de 35 ciclos de 94<sup>0</sup> C (30''), 50<sup>0</sup> C (30''), 72<sup>0</sup> C (90'') e 1 ciclo de 7 min a 72<sup>0</sup> C. As reações de PCR foram realizadas num volume de 50µl na primeira etapa, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,2mM de cada dNTP, 0,2 pmol de cada primer, 1,5 mM MgCl e 0,05U/ul de Taq polimerase (Pharmacia, Fine Chem.,Swedem) e 100µl na segunda etapa, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl,, 0,2mM de cada dNTP, 0,4 pmol de cada primer, 2,5 mM MgCl e 0,05U/ul de Taq polimerase (Pharmacia, Fine Chem.,Swedem)

Foi utilizado controle negativo em todas as reações de PCR para monitorar o aparecimento de possíveis contaminações.

Para verificar o sucesso da amplificação, os produtos foram migrados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE e corados com brometo de etídio (Figura 13).

Para formação dos heteroduplexes, 4,5µl dos produtos da segunda fase do PCR foram adicionados, individualmente, a 4,5µl dos produtos de PCR de amostras de referência fornecidas pelo *kit* para subtipagem por HMA gag e 1µl de tampão de hibridização 10X (NaCl 2M, Tris HCl 1M pH 7.8, EDTA 0,5M e H<sub>2</sub>O). Os heteroduplexes são formados a partir da desnaturação a 94<sup>0</sup>C por dois minutos, seguida de resfriamento por 10 minutos em banho de gelo.

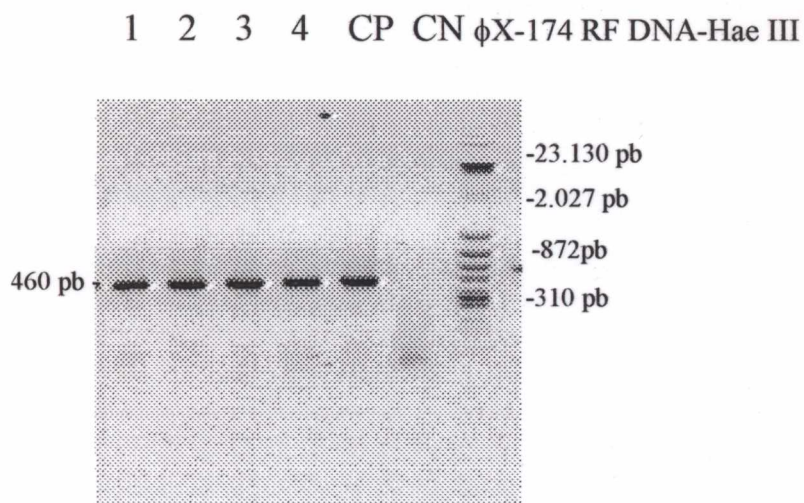


**Tabela 2** – Apresentação das seqüências e posições dos primers utilizados para amplificação de regiões do envelope viral do HIV-1.

Gene	Região	Seqüência (5'-3')	Posição
env			
Primer externo	V1-V5	ED5 ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6556-6581
		ED12 AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG	7822-7792
Primers internos	V3-V5	ES7 TGTAACGACGGCCAGTCTGTAAATGGCAGTCT AGC	7001-7020
		ES8 CAGGAAACAGCTATGACCCACTTCTCCAATTGTCC CTCA	7667-7647
	C2-C3	ED31 CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG	6816-6844
		ED33 TTACATAGAAAAAATCCCCTC	7359-7380

(retirado e adaptado de Delwart et. al., 1993)

### Gene Gag



**Figura 13. Avaliação dos fragmentos de DNA proviral de HIV-1 amplificadas por PCR (gene gag)**

Gel de eletroforese representativo de fragmentos do gene gag de 460pb, correspondendo a região codificante para o aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7

As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida/bisacrilamida 5% preparados com tampão TBE com concentrações de uréia a 20 ou 30% para migração por eletroforese.

O subtipo foi determinado de acordo com a distância relativa de migração dos heteroduplexes, após a visualização do gel corado com brometo de etídio em transiluminador de UV.

#### ***4.6 Determinação de polimorfismo das amostras do subtipo B por Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)***

A fim de evidenciarmos a presença das seqüências correspondentes a variante do subtipo B encontrada tipicamente no Brasil (B''), que apresenta a seqüência GWGR no topo da alça V3, os produtos de PCR das amostras identificadas como subtipo B correspondentes a região C2-C3 do envelope viral foram digeridos com a enzima Fok I (Amersham Life Science, III, USA). Através da análise do perfil de restrição, resultante da digestão nas seqüências GGATG (N) 9 e CCTAC (N) 13 é possível identificar bandas de 0,4 kb e 0,2 kb, quando o subtipo é o B''.

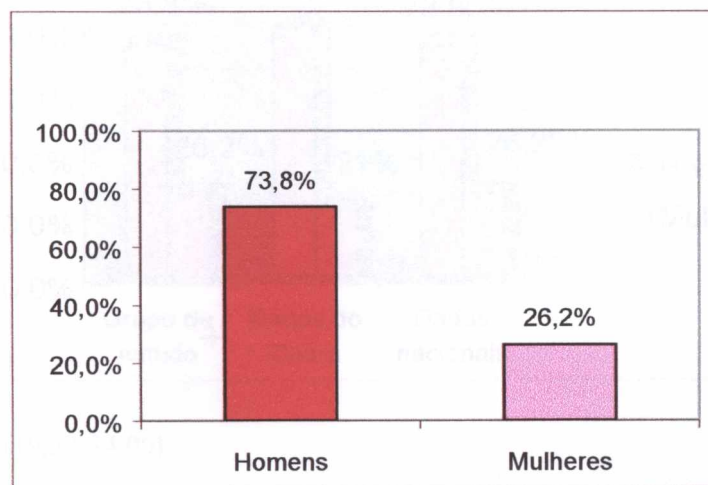
Assim, após a segunda etapa do PCR com os primers ED31/ED33, 10ul do DNA amplificado a partir das amostras de subtipo B foram digeridos com 6U da enzima de restrição FokI, em um volume final de 25ul contendo o tampão 1X(Amersham Life Science, III, USA), por 2h a 37<sup>0</sup>C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 2% por 1 hora a 100V, em TBE 1X e avaliados sob a luz ultravioleta. Os pares de bases dos fragmentos de restrição foram determinados baseados na migração do marcador de pares de bases  $\phi$ X-HaeIII (Sigma, Chem Co., Mo, USA).

#### ***4.7 Análise estatística***

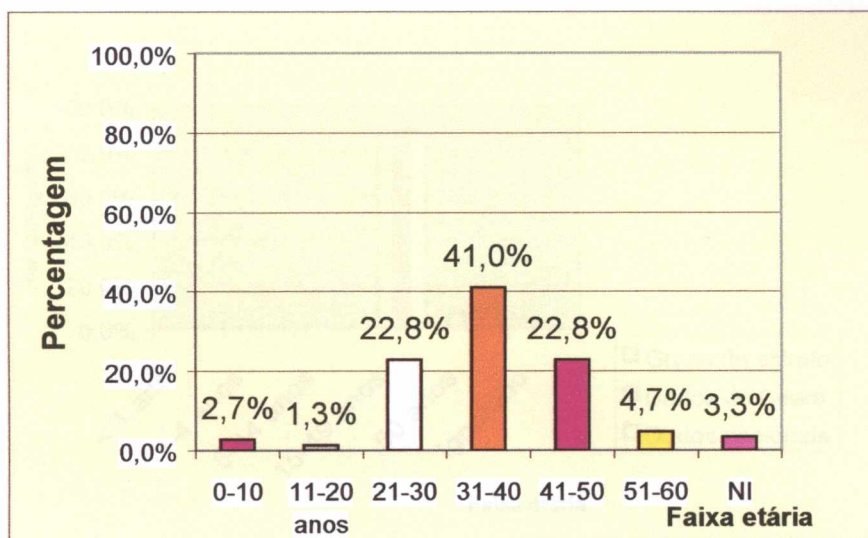
As amostras foram analisadas de acordo com os subtipos genéticos encontrados, bem como segundo variáveis demográficas e laboratoriais. O Banco de Dados utilizado foi o EpiInfo Versão 6, tendo sido calculado, quando indicado no texto, o intervalo de confiança [IC] a 95% pelo método exato binomial. Foi aplicado também o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) não corrigido para avaliar possíveis correlações entre variantes genéticas do subtipo B do HIV-1 e sexo, estadiamento clínico e contagem de células CD4<sup>+</sup>. Um valor de  $p$  de 0,05 foi definido como estatisticamente significativo. “n” representa o número de amostras analisadas.

## 5. RESULTADOS

Para caracterização dos subtipos do HIV-1 no estado do Ceará, foram analisadas amostras provenientes de 149 pacientes. Destes, 110 (73,8%) pertenciam ao sexo masculino e 39 (26,2%) ao sexo feminino (Gráfico 1), dando uma relação de aproximadamente 3 homens infectados para 1 mulher. Em relação à idade, a faixa etária com maior número de casos foi a de 31-40 anos, com 61 pacientes (41%). Em seguida, com uma prevalência de 22,8%, vieram as faixas de 21-30 anos e 41-50 anos, com 34 pacientes em cada uma. Além disso, 4 pacientes (2,7%) estavam na faixa de 0-10 anos, 2 (1,3%) entre 11 e 20 anos, 07 (4,7%) entre 51-60 anos, 2 (1,3%) com mais de 60 anos e 5 (3,3%) sem informação sobre idade (Gráfico 2). A média de idade na população feminina foi de 33 anos e na masculina de 36 anos. De acordo com a análise de dados epidemiológicos, nossos dados mostram-se consistentes com aqueles relatados para epidemia no Ceará e no Brasil (Gráficos 3 e 4).

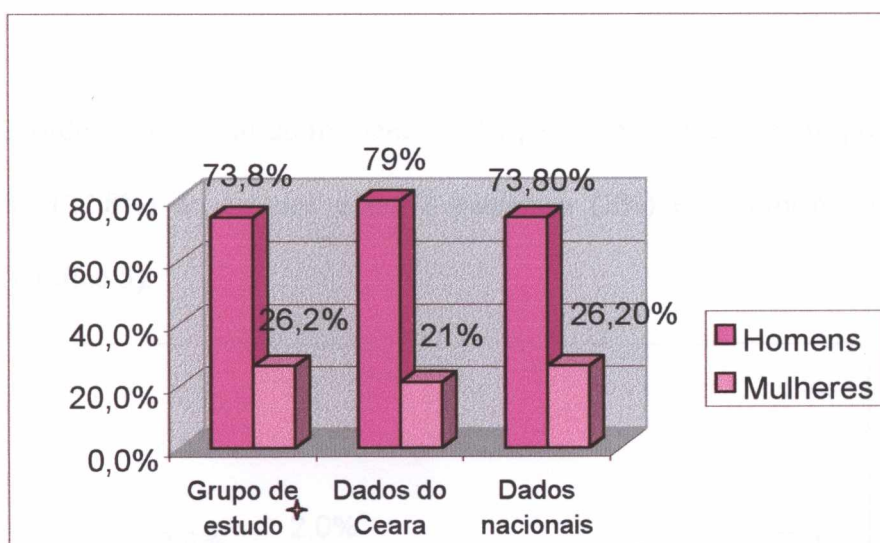


**Gráfico 1 .** Perfil da população estudada quanto ao sexo (n=149)



\*NI, dados não informados.

**Gráfico 2 .** Distribuição do grupo estudado por faixa etária (n=149)

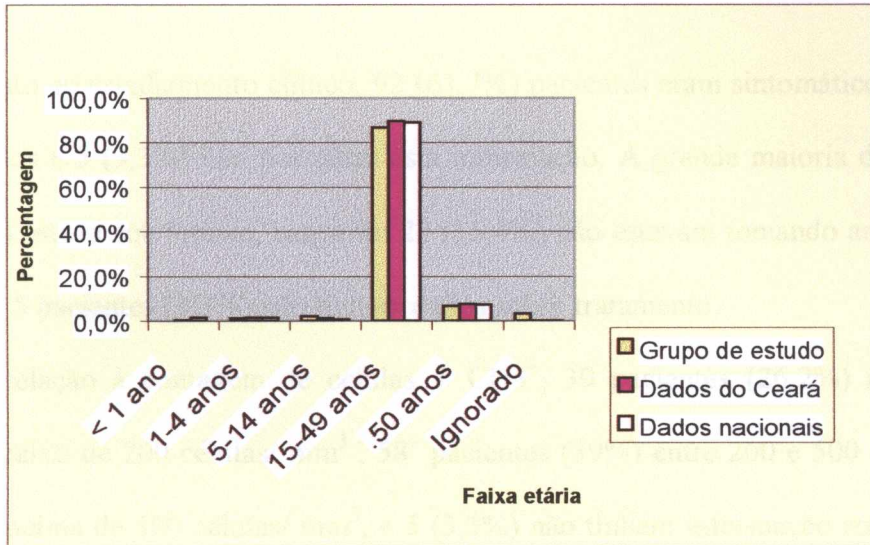


✦  
IC: [19,32-34,00]

**Gráfico 3:** Percentual de pacientes do sexo masculino e feminino no grupo estudado (n=149) quando comparados dados do Ceará (n=3.165) e dados nacionais da epidemia da AIDS (n=215.810)

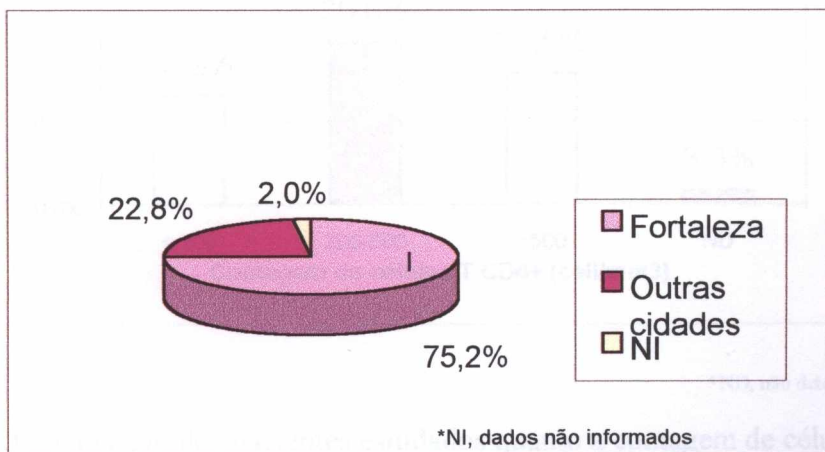
grupo estudado quanto a procedência (n=149)





**Gráfico 04:** Distribuição dos pacientes estudados (n=149) quanto a faixa etária quando comparados com dados do Ceará (n=3.165) e dados nacionais da epidemia da AIDS (n=215.810)

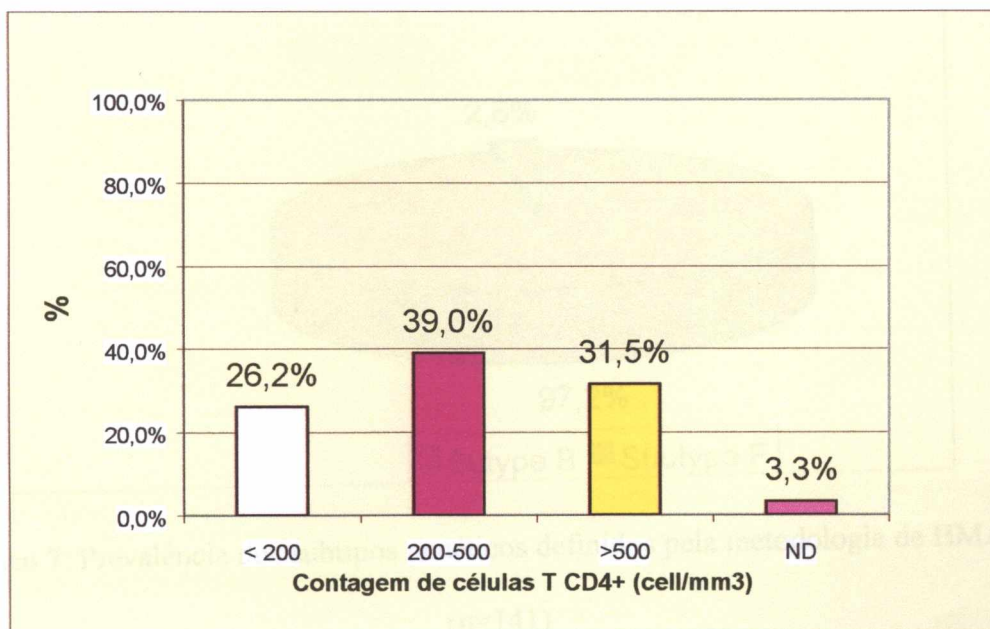
De acordo com o local de residência, 112 pacientes (75,2%) eram provenientes de Fortaleza, 34 (22,8%) do interior e em 3 pacientes (2%) esta informação não estava disponível (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Perfil da população estudada quanto a procedência (n=149)

Quanto ao estadiamento clínico, 92 (61,7%) pacientes eram sintomáticos, 53 (35%) assintomáticos e 5 (3,3%) não possuíam esta informação. A grande maioria dos pacientes (121-81,2%) estava sob terapia, enquanto 23 (15,4%) não estavam tomando antiretrovirais. Além disso, 5 pacientes (3,3%) não tinham dados sobre tratamento.

Em relação à contagem de células T CD4<sup>+</sup>, 39 pacientes (26,2%) apresentaram contagem abaixo de 200 células/ mm<sup>3</sup>, 58 pacientes (39%) entre 200 e 500 células/mm<sup>3</sup>, 47 (31,5%) acima de 500 células/ mm<sup>3</sup>, e 5 (3,3%) não tinham informação sobre os dados de CD4<sup>+</sup>(Gráfico 6).



\*ND, não determinado.

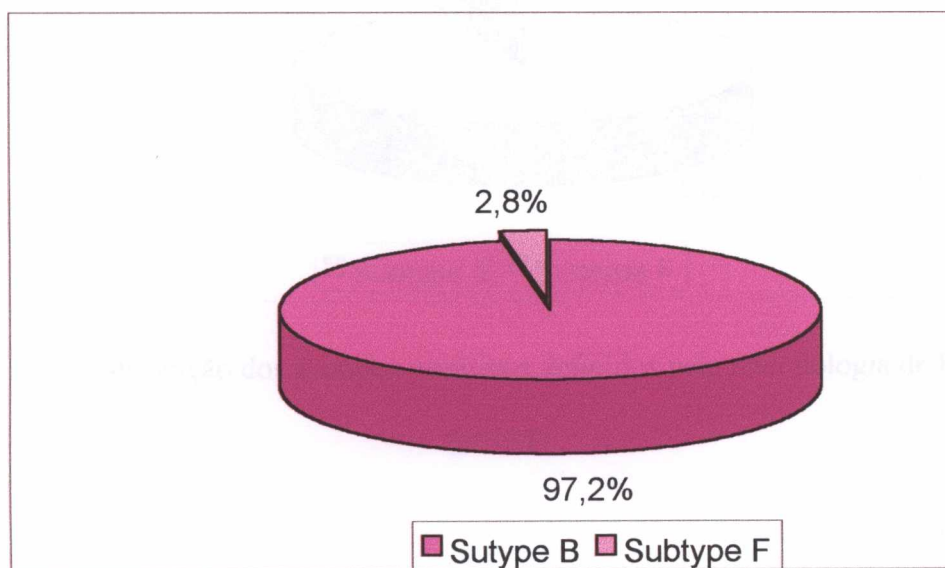
**Gráfico 6:** Distribuição dos pacientes estudados quanto a contagem de células T CD4<sup>+</sup>

(n=149)



Os subtipos genéticos do HIV-1 foram identificados a partir de duas regiões do genoma viral (*env* e *gag*), utilizando o ensaio de mobilidade de heteroduplex. Foram analisadas 149 amostras, sendo na grande maioria identificado o subtipo B. As amostras foram amplificadas, em ambas as partes do genoma, através de *nested* PCR.

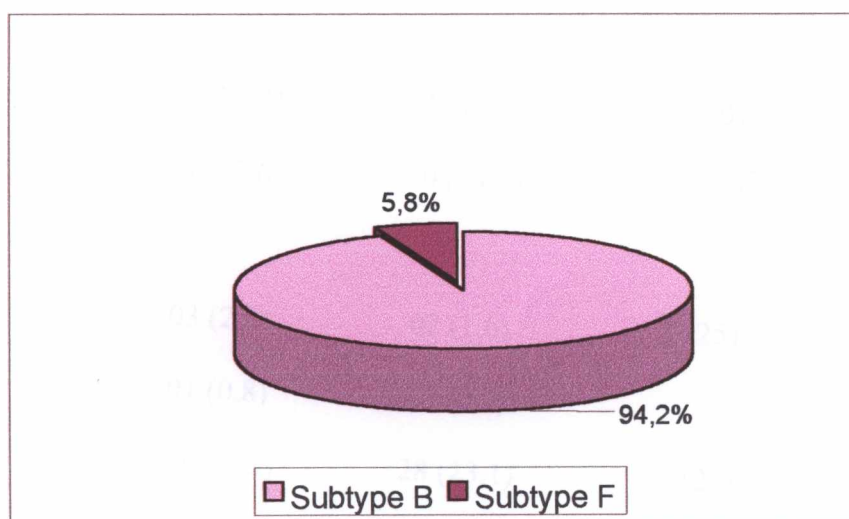
Na análise por HMA *env*, foi possível a identificação de subtipo em 141 amostras (94,6%), enquanto que em 8 (5,4%) o subtipo não pode ser determinado. O subtipo B foi identificado em 137 amostras (97,2%), e o subtipo F em 4 amostras (2,8%) (Gráfico 7 e Figura 11).



**Gráfico 7:** Prevalência dos subtipos genéticos definidos pela metodologia de HMA *env* (n=141)

Quando a subtipagem foi realizada a partir do gene *gag*, 137 amostras (92%) tiveram o subtipo genético definido, enquanto que em 12 amostras (8%) não foi possível

identificar o subtipo. O subtipo B também foi encontrado na grande maioria das amostras analisadas. Foram detectados 129 amostras (94,2%) com perfil B e 8 subtipos F (5,8%) (Gráfico 8 e Figura14). Quando os subtipos genéticos determinados por HMA env e gag são comparados, verifica-se que foi encontrado o dobro de amostras tipadas como F quando a análise do subtipo genético foi feita por HMA gag. Quatro amostras apresentaram, portanto, subtipo B determinado por HMA env e subtipo F quando HMA gag foi realizado.



**Gráfico 8:** Distribuição dos subtipos genéticos definidos pela metodologia de HMA gag  
(n=137)

As tabelas 3, 4, 5 resumizam os dados demográficos e os subtipos genéticos do HIV-1 das amostras analisadas simultaneamente por HMA env e gag (n=129; 86,6%). As amostras que não puderam ser definidas por qualquer uma das técnicas (n=20; 13,4%) não foram incluídas nestas tabelas. Na tabela 6 estão incluídos todos os pacientes estudados (n=149).

**Tabela 3.** Dados referentes a sexo e idade dos pacientes cujas amostras foram subtipadas simultaneamente por HMA env e gag.

Variável	Testados n (%)	Subtipo		
		B n(%)	F n(%)	B/F n(%)
<b>Total</b>	129 (100)	121 (94)	4 (3)	4 (3)
<b>Sexo</b>				
Masculino	96 (74,4)	91 (75,2)	2 (50)	3 (75)
Feminino	33 (25,6)	30 (24,8)	2 (50)	1 (25)
<b>Idade</b>				
<10	03 (2,3)	02 (1,6)	1 (25)	-
11-20	01 (0,8)	01 (0,8)	-	-
21-30	29 (22,5)	28 (23,1)	1 (25)	-
31-40	56 (43,4)	54 (44,6)	1 (25)	1 (25)
41-50	29 (22,5)	25 (20,7)	1 (25)	3 (75)
51-60	07 (5,4)	07 (5,8)	-	-
>60	01 (0,8)	01 (0,8)	-	-
NI*	03 (2,3)	02 (1,6)	-	-

\* NI, dados não informados

**Tabela 4.** Contagem de células CD4<sup>+</sup> dos pacientes cujas amostras foram subtipadas simultaneamente por HMA env e gag.

Variável	Testados n (%)	Subtipo		
		B n(%)	F n(%)	B/F n(%)
<b>Total</b>	129 (100)	121 (94)	4 (3)	4 (3)
< 200	31 (24)	30 (24,8)	-	01 (25)
200-500	54 (41,9)	52 (43)	01 (25)	01 (25)
>500	40 (31)	36 (29,7)	02 (50)	02 (50)
NI*	4 (3,1)	3 (2,5%)	01 (25)	-

\* NI, dados não informados

**Tabela 5.** Dados referentes ao uso de terapia e estadiamento clínico dos pacientes cujas amostras foram subtipadas simultaneamente por HMA env e gag.

Variável	Testados N (%)	Subtipo		
		B n(%)	F n(%)	B/F n(%)
<b>Total</b>	129 (100)	121 (94)	4 (3)	4 (3)
<b>Terapia</b>				
Sim	105 (81,4)	100 (82,6)	02 (50)	03 (75)
Não	20 (15,5)	18 (14,9)	01 (25)	01 (25)
NI	04 (3,1)	03 (2,5)	01 (25)	-
<b>Estadiamento</b>				
<b>Clínico</b>				
Sintomático	79 (61,2)	76 (62,8)	02 (50)	01 (25)
Assintomático	46 (35,6)	42 (34,7)	01 (25)	03 (75)
NI*	04 (3,1)	03 (2,5)	01 (25)	-

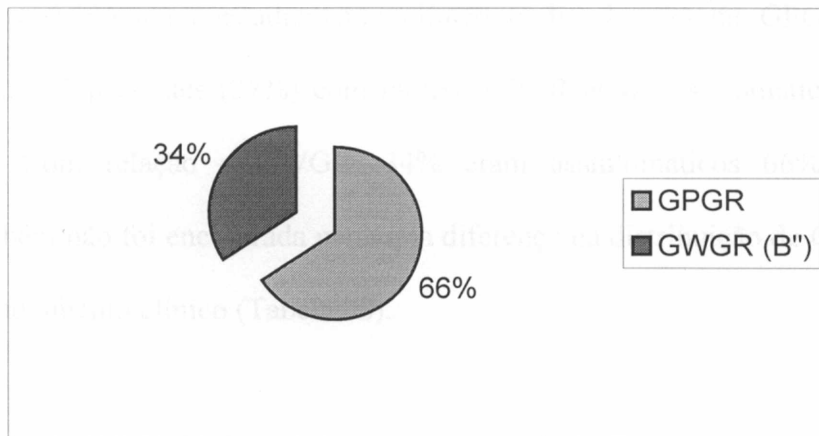
\*NI, dados não informados

**Tabela 6.** Características sócio-demográficas, clínicas e laboratoriais dos 149 indivíduos estudados.

<b>Características</b>	<b>No. de pacientes (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	110 (73.8%)
Feminino	39 (26.2%)
<b>Idade (anos)</b>	
Média (Masculino / Feminino)	36 / 33
<10	4 (2.7%)
11-20	2 (1.3%)
<b>21-30</b>	<b>34 (22.8%)</b>
31-40	61 (41%)
41-50	34 (22.8%)
51-60	07 (4.7%)
NI*	05 (3.3%)
<b>Origem</b>	
Área urbana (Fortaleza)	112 (75.2%)
Área rural	34 (22.8%)
NI*	3 (2%)
<b>Contagem de células T CD4/mm<sup>3</sup></b>	
<200	39 (26.2%)
200-500	58 (39%)
>500	47 (31.5%)
NI*	5 (3.3%)
<b>Sintomas clínicos</b>	
Sintomático	92 (61.7%)
Assintomático	53 (35%)
NI*	05 (3,3%)
<b>Subtipagem - HMA gag/env</b>	
Benv/Bgag	121 (81,2%)
Fenv/Fgag	04 (2,7%)
Benv/Fgag	04 (2,7%)
ND	20 (13,4%)

NI, dados não informados; ND, não determinado para regiões de *env* ou *gag*

Após a digestão, com enzima de restrição Fok I, do produto de 600 pb amplificado por ED31/ED33, os padrões dos fragmentos de restrição gerados (400pb-200pb ou 400pb-120pb-80pb) foram detectados por eletroforese em gel de agarose (Figura 15). Utilizando esta metodologia, 90 amostras (65,7%) dentre as 137 subtipadas como B por HMA env, foram relacionadas com o motivo GPGR da alça V3. Quarenta e sete amostras (34,3%) foram identificadas com o motivo GWGR, encontrado predominantemente no Brasil (Gráfico 9). Não foi encontrada nenhuma diferença na distribuição de GPGR e GWGR quando realizada correlação com o sexo (Tabela 7).



**Gráfico 9:** Distribuição de GPGR e GWGR entre as amostras definidas como subtipo B pelo ensaio de mobilidade de heteroduplexes para o gene *env*

Estadístico clínico	GPGR	GWGR
Sexo	49 (54,3%)	47 (34,3%)
Idade (anos)	13 (14,3%)	16 (34)
Níveis de CD4	32 (37,8%)	31 (66)

**Tabela 7.** Dados referentes à distribuição de GWGR/ GPGR, quando correlacionados com o sexo dos pacientes estudados

<b>Sexo</b>	<b>Distribuição GWGR/ GPGR n(%)</b>	
	<b>GPGR</b>	<b>GWGR</b>
	90 (65,7)	47 (34,3)
<b>Masculino</b>	66 (73,3)	35 (74,5)
<b>Feminino</b>	24 (26,7)	12 (25,5)

p=0,8861

Quando se compara estadiamento clínico e distribuição de GPGR/GWGR, foi encontrado que 33 pacientes (37%) com motivo GPGR eram assintomáticos e 57 (63%) sintomáticos. Com relação a GWGR, 34% eram assintomáticos 66% sintomáticos. Portanto, também não foi encontrada nenhuma diferença na distribuição de GWGR/(GPGR quanto ao estadiamento clínico (Tabela 08).

**Tabela 8.** Dados referentes à distribuição de GWGR/ GPGR, quando correlacionados com estadiamento clínico dos pacientes estudados

<b>Estadiamento clinico</b>	<b>Distribuição GWGR/ GPGR n(%)</b>	
	<b>GPGR</b>	<b>GWGR</b>
	90 (65,7)	47 (34,3)
<b>Assintomático</b>	33 (37)	16 (34)
<b>Sintomático</b>	57 (63)	31 (66)

p=0,7610



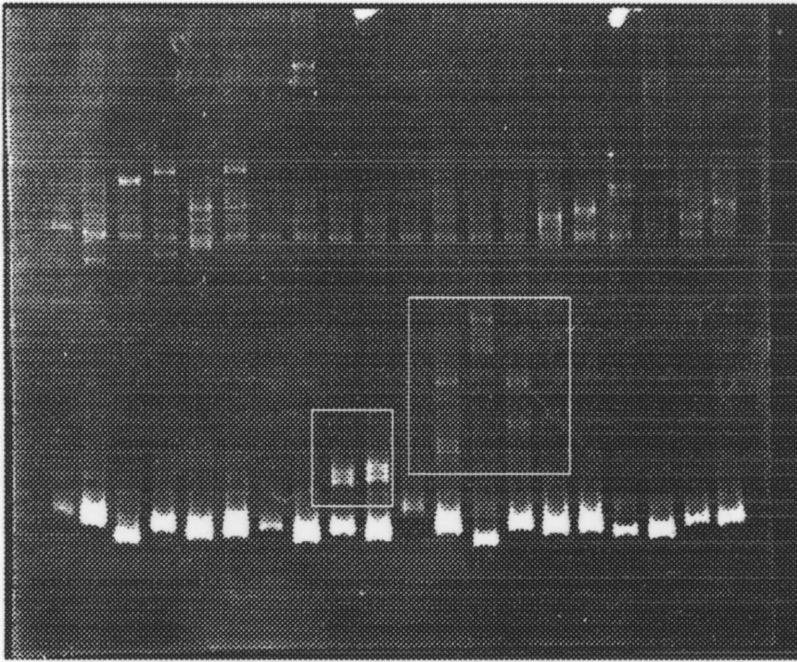
Em relação à distribuição de GPGR/GWGR e contagem de células T CD4<sup>+</sup>, foi encontrado que 27 pacientes (30%) com motivo GPGR tinham contagem de CD4<sup>+</sup> menor que 200 células/mm<sup>3</sup>, 36 (40%) entre 200 e 500, e 27 (30%) maior que 500 células/mm<sup>3</sup>. Quando analisado GWGR, foram encontrados 10 pacientes (22,5%) com contagem de CD4<sup>+</sup> abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>, 19 (40%) entre 200 e 500, e 18 (37,5%) acima de 500 células/mm<sup>3</sup> (Tabela 09).

**Tabela 9.** Dados referentes à distribuição de GWGR/ GPGR, quando relacionados com a contagem de células T CD4<sup>+</sup> (céls/mm<sup>3</sup>)

Contagem de células T CD4 <sup>+</sup> (céls/mm <sup>3</sup> )	Distribuição GWGR/ GPGR n(%)	
	GPGR	GWGR
	90 (65,7)	47 (34,3)
< 200	27 (30)	10 (22)
200 – 500	36 (40)	19 (40)
> 500	27 (30)	18 (37)

p=0,5402

a) B1B2B3C1 C2 D1D3F1F2H B1 B2 B3C1C2D1D3F1F2H



**Figura 11. Tipagem molecular baseada no ensaio de mobilidade de heteroduplex a partir do gene env**

(a) Gel representativo de um subtipo F e de um B

## 6. DISCUSSÃO

Para realização deste estudo de caracterização molecular do HIV-1 no estado do Ceará, foram analisadas 149 amostras de indivíduos HIV-1 positivo. Quanto à distribuição por sexo, 73,8% dos pacientes pertenciam ao sexo masculino e 26,2% ao feminino, fornecendo uma relação de aproximadamente 3 homens infectados para 1 mulher. A faixa etária de maior prevalência da infecção foi a de 31-40 (41%). A média de idade na população feminina foi de 33 anos e na masculina de 36 anos. Quanto ao local de residência, a grande maioria dos pacientes (75,2%) era proveniente de Fortaleza. A análise comparativa dos dados epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo com aqueles apresentados pelo estado e com os dados nacionais da epidemia da AIDS, mostrou que nossa amostragem apresenta dados consistentes com o perfil da epidemia no país e no estado do Ceará.

Este estudo, utilizando a metodologia do HMA para duas regiões do genoma viral, revelou a presença dos subtipos B (94%), F (3%) e recombinantes B/F (3%) em um total de 129 amostras subtipadas simultaneamente por HMA env e gag. Todos os recombinantes B/F eram provenientes de pacientes residentes em Fortaleza. Com relação ao subtipo F, apenas um paciente residia no interior, enquanto os demais eram da capital do estado.

Anteriormente, em um estudo com apenas 20 amostras e utilizando HMA para a região do envelope, foram detectados apenas subtipos B (Galvão-Castro, comunicação pessoal). Não podemos afirmar se a detecção de subtipo F e recombinantes B/F decorre de uma introdução recente no estado ou se é consequência do aumento no número de amostras estudadas, o que amplia a possibilidade de detecção de subtipos de menor prevalência. Estudos futuros com uma maior amostragem e coletadas em momentos diferentes são

necessários a fim de se estabelecer uma vigilância do polimorfismo genético do HIV-1 no Ceará e determinar o futuro papel de vírus não B na dinâmica da epidemia no estado.

A coexistência em uma dada região de subtipos diferentes tem implicações nas estratégias terapêuticas e profiláticas e, por colocar diferentes formas genéticas em contato pode favorecer a geração de vírus recombinantes. Em um estudo realizado pela Rede Brasileira para Isolamento e Caracterização do HIV (Brazilian Network for HIV-1 Isolation e Characterization, 2000) onde foram analisadas amostras de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, através de análise filogenética, chegou-se à conclusão que o subtipo F foi introduzido posteriormente ao B. Além disso, ao se analisar dois trabalhos realizados pela Rede, porém em momentos diferentes (1998 e 2000), verificou-se aumento recente das prevalências dos subtipos F e C. Pinto e colaboradores (Pinto e cols, 2000), utilizando análises de padrões de restrição em amostras provenientes do Rio de Janeiro, também sugerem uma introdução mais recente de subtipo F nesse estado. O subtipo F foi detectado no Brasil no início da década de noventa (Louwaige e cols, 1994; Morgado e cols, 1994) e desde então uma crescente prevalência desse subtipo tem sido demonstrada.

No Brasil, a epidemia parece apresentar diferentes padrões e distribuição de subtipos, porém o subtipo B tem se mostrado o mais prevalente nos mais diferentes grupos de risco (Sabino e cols., 1996; Galvão-Castro e cols., 1996; Morgado e cols., 1998; Couto-Fernandez e cols., 1999; Stefani e cols., 2000; Rossini e cols., 2001; Brazilian Network for HIV-1 Isolation e Characterization). Os subtipos C, D, F também tem sido detectados no Brasil, bem como recombinantes B/F (Sabino e cols., 1994; Morgado e cols., 1998; Tanuri e cols., 1999; Ramos e cols., 1999) e infecções duplas (Janini e cols., 1998; Ramos e cols., 1999). Recentemente, foi detectado também, em amostras provenientes do Rio de Janeiro, um subtipo A (Caride et al, 2001). Tanto no Brasil, como em países da América do Norte e

Europa oriental tem sido demonstrado um aumento de formas genéticas não B, bem como aumento de novas formas genéticas por recombinação entre vírus de subtipos diferentes circulando localmente (Thomson e cols, 2001). A identificação e caracterização dos subtipos não B são de extrema importância para a compreensão da epidemia e de sua dinâmica em nosso país.

Dentre as amostras analisadas, 8 (5,4%) não foram definidas por HMA env, enquanto 12 (8%) não tiveram o subtipo definido por HMA gag. Todas as amostras não subtipadas por uma das técnicas foram definidas como subtipo B pela outra técnica. Dentre as causas da não definição dos subtipos, podemos considerar a pouca quantidade do DNA extraído ou a não formação de qualquer padrão de bandas de heteroduplex que permitisse sua caracterização no gel de HMA, apesar de uma boa concentração de DNA. Uma porcentagem similar de amostras não definidas por essa metodologia é relatada em vários trabalhos que utilizam a mesma técnica (Delwart e cols., 1993; Morgado e cols., 1998; Heyndrickx e cols, 2000; Stefani e cols., 2000). É preconizado que nesses casos seja realizado sequenciamento e isto faz parte dos nossos objetivos futuros. Uma quantidade um pouco maior de amostras não subtipadas pelo HMA gag pode ser atribuída a questões meramente técnicas, já que esta metodologia foi implantada recentemente em nosso laboratório, enquanto que o HMA env já se encontra estabelecida desde 1997.

Em amostras provenientes da África, foram demonstrados casos de discordância env/gag em 54% das amostras dos Camarões, 41% de Benin, 27% de amostras do Kenia e nenhuma discordância em amostras da Zâmbia (McCutchan e cols., 2000). Neste estudo, em relação às amostras subtipadas por HMA env e gag, foram encontradas 4 amostras (3%) com divergência entre *env* e *gag*, sendo estas definidas como subtipo B em env e F em gag e portanto classificadas como recombinantes B/F. A distribuição global de diferentes

formas do HIV-1 é um processo dinâmico e quanto mais subtipos estiverem presentes em uma dada região, maior a probabilidade de geração de recombinantes.

A escolha do HMA como técnica para subtipagem das amostras foi baseada na eficácia, reprodutibilidade, rapidez e custo desta metodologia. Devido a essas características, o HMA foi indicado pela Organização Mundial de Saúde como método para determinação dos subtipos genéticos do HIV-1, deixando o sequenciamento apenas para casos de difícil definição. A técnica de HMA tem sido utilizada em vários lugares do mundo, por ser bastante útil em estudos em larga escala.

O HMA foi desenvolvido em 1993 por Delwart e colaboradores, sendo a subtipagem baseada no gene *env*. Devido a crescente disseminação e detecção de vírus recombinantes em todo mundo foi necessário expandir esta técnica para outras regiões do genoma e em 2000 foi desenvolvido por Heyndrickx e colaboradores um HMA a partir do gene *gag*. Acredita-se que o HMA *env/gag* constitua o melhor método para triagem dos subtipos circulantes e recombinantes. O HMA *env* tem mostrado forte correlação entre os subtipos obtidos por esse método e aqueles obtidos por sequenciamento ou análise filogenética, o que respalda ainda mais a utilização dessa técnica (Delwart e cols., 1993; Sabino e cols., 1996; Morgado e cols., 98; Heyndrickx e cols., 1998; Brazilian Network For HIV Isolation And Characterization, 2000). Quanto ao HMA *gag*, foi demonstrado por Kazenova e colaboradores (Kazenova e cols, 2001) uma sensibilidade e especificidade de 100% do HMA *gag*, quando comparado com sequenciamento. Em outro trabalho, de 79 amostras caracterizadas geneticamente, apenas um subtipo D não foi classificado por HMA *gag*, além de dois subtipos J para os quais não havia ainda representantes no painel de referência (Heyndrickx e cols., 2000).

A associação entre diversos subtipos genéticos com diferentes vias de transmissão e progressão para a AIDS tem sido bastante analisada (Gali e cols., 1997; Perhrson e cols.; 1997; Amornkul e cols., 1999; Kanki e cols., 1999), porém evidências definitivas que confirmem ou rejeitem essa associação ainda não foram encontradas. A extensa divergência observada sugere que de alguma forma ela poderia interferir nas características biológicas do HIV-1. Alguns estudos mostram dados que sugerem que subtipos do HIV-1 podem diferir no tempo de progressão para a AIDS e em algumas propriedades biológicas importantes (Tscherming e cols., 1998; Kanki e cols., 1999). Estes resultados têm sido questionados e considerados controversos por outros autores (Gali e cols., 1997; Morgado e cols., 1998; Ramos e cols., 1999; Amornkul e cols., 1999; Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization, 1996). Entretanto, Sabino e colaboradores (Sabino e cols., 1996) analisando amostras de São Paulo, sugeriram que o subtipo F estava associado com o uso de drogas injetáveis. Outro estudo, com amostras da Bahia detectou subtipo F apenas entre usuários de drogas endovenosas, embora a casuística nesse estudo tenha sido muito pequena (Couto-Fernandez e cols., 1999). No presente trabalho não pudemos avaliar a existência ou não dessa associação, pois os dados sobre via de transmissão não estavam disponíveis.

A técnica de digestão com a enzima FokI, realizada nas amostras do Ceará de HIV-1, para determinar a prevalência do tetrapeptídeo GWGR, característico do subtipo B brasileiro, revelou uma prevalência de 34,3% desta variante. Este resultado é similar ao percentual encontrado para esta variante (30-57%) em outras regiões do país, em análises utilizando a mesma metodologia (Galvão-Castro e cols, 1996; Covas e cols., 1998; Morgado e cols., 1998).

Tem sido sugerido que a alta frequência de GWGR no Brasil pode estar ligada a alguma pressão seletiva ou vantagem evolutiva (Costa e cols., 1996). Sugere-se ainda que essa alta prevalência pode decorrer de um efeito fundador ou como resultado de um maior potencial infectivo dessa variante (Morgado e cols., 1998; Covas e cols., 1998). Embora a importância do subtipo B brasileiro na epidemia da AIDS não esteja bem estabelecida, a alta prevalência de GWGR indica que ela é epidemiologicamente importante e pode ser relevante para o planejamento de vacinas no Brasil.

Após a detecção de GWGR e GPGR, tentamos verificar possíveis associações entre a distribuição dessas variantes e alguns dados epidemiológicos, porém nenhuma associação entre GWGR e GPGR e distribuição por sexo, estadiamento clínico e contagem de células CD4<sup>+</sup> foi encontrada. Proporções similares dessas variantes, independentemente do sexo, estadiamento clínico, contagem de células CD4<sup>+</sup> e modo de transmissão foram relatadas em outros estudos (Morgado e cols., 1998; Casseb e cols., 1998; Santoro-Lopes e cols., 2000). Entretanto, Covas e colaboradores (Covas e cols., 1998) demonstraram maior prevalência de GWGR em mulheres, independente da forma de transmissão. Além disso, Santoro-Lopes e colaboradores (Santoro-Lopes e cols., 2000) sugerem que indivíduos infectados com a variante GPGR progridem mais rápido para a AIDS.

O presente trabalho proporcionou o conhecimento da distribuição dos subtipos do HIV-1 no estado do Ceará em amostras coletadas ao longo do ano 2000. Este conhecimento contribui para os dados da diversidade do HIV no Brasil, fornecendo informações para estudos futuros. A vigilância epidemiológica continuada das formas genéticas do HIV permite detectar rapidamente a introdução de novos subtipos e verificar o aumento da diversidade genética. O aumento na diversidade do HIV em uma população pode dificultar o diagnóstico de novos casos, o desenho de vacinas eficazes, e o



monitoramento da resposta a terapias com drogas antiretrovirais através da detecção da carga viral. Além disto, a determinação dos subtipos genéticos do HVI-1 representa uma ferramenta poderosa para o monitoramento de alterações nos padrões de transmissão locais e para o mapeamento da epidemia local e global.

## 7. CONCLUSÕES

1. A caracterização molecular de amostras de HIV-1 provenientes do Ceará, através da metodologia de HMA para as duas regiões do genoma viral, *env* e *gag*, revelou a presença dos subtipos B (94%), F (3%) e recombinantes B/F (3%). Este é o primeiro relato da presença de subtipo F e recombinantes B/F no estado do Ceará.
2. A combinação do estudo de dois genes virais (*env* e *gag*) permite realizar uma estimativa mínima de recombinantes, sendo bastante útil, especialmente com a emergência dessas formas em todo o mundo.
3. Uma menor prevalência de subtipo F foi encontrada no Ceará em comparação com o sudeste do Brasil (Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, 2000). Além disso, não foi detectado nenhum subtipo C, revelando que a distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 assume padrões diferentes em diferentes regiões do país (Morgado e cols, 2002).
4. A análise das características epidemiológicas do grupo de pacientes incluídos nesse estudo revelou ser esta uma população representativa da situação da epidemia do HIV no Ceará e no Brasil. A faixa etária com a maior prevalência da infecção pelo HIV foi a de adultos jovens (31-40 anos; 41%), sendo 73,8% dos pacientes pertencentes ao sexo masculino e 26,2% ao sexo feminino.

5. Foi encontrada uma prevalência de 33,4% do motivo GWGR da alça V3, característico do subtipo B brasileiro, revelando que esta variante também é epidemiologicamente importante no Ceará. Nenhuma associação entre GWGR e GPGR e distribuição por sexo, estadiamento clínico e contagem de células CD4<sup>+</sup> foi encontrada

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Congenital and Acquired Immunodeficiency. In: Cellular and molecular immunology, 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. cap. 20. p. 393-408.
2. ALAEUS A. Significance of HIV-1 genetic subtypes. **Scand. J. Infect. Dis.**, **32**: 455-463, 2000.
3. AMORNKUL P. N.; TANSUPHASAWADIKUL S.; LIMPAKARNJANARAT K.; LIKANONSAKUL S.; YOUNG N.; EAMPOKALAP B.; KAEWKUNGWAL J.; NAIWATANAKUL T.; VON BARGEN J.; HU D. J.; MASTRO T. D. Clinica disease associated with HIV-1 subtype B'and E infection among 2104 patients in Thailand. **AIDS**, **13**: 1963-1969, 1999.
4. APPAY, V.; NIXON, D.F.; DONAHOE, S.M.; GILLESPIE, G.M.A.; DONG, T.; KING, A.; OGG, G.S.; SPIEGEL, H.M.L; CONLON, C.; SPINA, C.A.; HAVLIR, D.V.; RICHMAN, D.D.; WATERS, A.; EASTERBROOK, P.; McMICHEL, A.J.; ROWLAND-JONES, S.L. HIV-specific CD8+YT cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. **J. Exp. Med.**, **192**: 63-75, 2000.
5. ARYA, S.K.; GALLO, R.C. Human immunodeficiency virus (HIV) type-mediated inhibition of HIV type 1: anew approach to gene therapy of HIV infection. **Proc. Natl Acad. Sci. (USA)** **93**: 4486-4491, 1996.

6. BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMAN, J.C.; REY, P.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GUEST, J.; DAUGHET, C.; AXLER-BLIN, C.; BRUN-VÉZINET, F.; ROUZIQUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAIGNER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, **220**:868-871, 1983.
7. BARRÉ-SINOUSSE F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, **346**:31-45, 1996.
8. BELDA, F.J.; BARLOW, K.L.; CLEWLEY, J.P. Subtyping HIV-1 by improved resolution of heteroduplexes on agarose gels. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **16**:218-220, 1997.
9. BONHOEFFER, S.; HOLMES, E.C.; NOWAK, M.A. Causes of HIV diversity. **Nature**, **376**:125, 1995.
10. BOU-HABIB, D.C.; RODERIQUEZ, G.; ORAVECZ, T.; BERMAN, P.W.; LUSSO, P.; NORCROSS, M.A. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic Human Immunodeficiency Virus type1 from antibody neutralization. **J. Virol.**, **68**:6006-6013, 1994.
11. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Epidemia da AIDS no Brasil. 1998. Disponível em:<<http://www.aids.gov.br>> Acesso em: 27. mar. 2000.

12. BRASIL. MINISTÉRIO DE LA SALUD. La Respueta Brasileña al VIH/SIDA: Experiencias ejemplares. Brasília:Cordinación Nacional de ETS y SIDA. 1999. 187p.
13. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Contextualização da AIDS no Ceará. 2000. Disponível em :<<http://www.aids.gov.br>.> Acesso em: 24. out. 2000.
14. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Implantação da Vigilância de Gestantes HIV+ e Crianças Expostas** (mimeo). Brasília, 2000.
15. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação Nacional de DST e AIDS. **AIDS-Bol. Epidemiol.**, 14(2):2001.
16. BRAZILIAN NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION: BONGERTZ, V.; BOU-HABIB, D.C.; BRÍGIDO, L.F.M.; CASEIRO, M.; CHEQUER P.J.N.; COUTO-FERNANDEZ J.C.; FERREIRA, P.C.; GALVÃO-CASTRO B.; GRECO, D.; GUIMARÃES, M.L.; CARVALHO, M.I.L.; MORGADO, M.G.; OLIVEIRA, C.A.F.; OSMANOV, S.; RAMOS, C.A.; ROSSINI, M.; SABINO, E.; TANURI, A.; UEDA, M.. HIV-1 Diversity in Brazil: Genetic, Biologic, and Immunologic Characterization of HIV-1 strains in three Potentials HIV Vaccine Evaluation Sites. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, 23:184-193, 2000.

17. CARIDE, E; BRINDEIRO R.; HERTOOGS K.; LARDER B.; DEHERTOGH P.; MACHADO E.; SÁ C.A.M.; EYER-SILVA W.A.; SION F.S.; PASSIONI L.F.C.; MENEZES J.Á.; CALAZANS A.R.; TANURI A. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. **Virology**, 274: 84-92, 2001.
18. CARNEIRO, M.; ANTUNES, C.M.F.; GRECO, M.; OLIVEIRA, E.; ANDRADE, J.; LIAGNANI, L.; GRECO, D.B. Design, Implementation, and Evaluation at Entry of a Prospective Cohort Study of Homosexual and Bisexual HIV-1-Negative Men in Belo Horizonte, Brazil: Project Horizonte. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, 25:182-187, 2000.
19. CARR, J.K.; FOLEY, B.; LEITNER, T.; SALMINEN, M.; KORBER, B.T.; McCUTHAN, F.E. Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV-1 in the pandemic. In: **Human Retrovirus and AIDS. Part III**. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1998.
20. CASSEB, J.; HONG, M.A.; GONSALEZ, C.; BRIGIDO, L.F.; DUARTE, A.J.S.; MICHAEL-HENDRY, R. Two variants of HIV-1 B serotype are transmitted heterosexually in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31:1243-1246, 1998.

21. CHAM, F.; HEYDRICKX, L.; JANSSENS, W.; VEREECKEN, K.; HOUWER, K.; COPPENS, S.; VAN DER AWERA, G.; WHITTLE, H.; VAN DER GROEN, G. Development of a one-tube multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the simultaneous amplification of HIV type 1 group M *gag* and *env* heteroduplex mobility assay fragments. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **16**:1503-1505, 2000.
22. CHAM, F.; HEYDRICKX L.; JANSSENS W.; VAN DER AWERA, G.; VEREEKEN, K.; HOUWER, K.; COPPENS, S.; WHITTLE, H.; VAN DER GROEN G. Study of HIV type 1 *gag/env* variability in the Gambia using a multiplex DNA polymerase chain reaction. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **16**:1915-1919, 2000.
23. CHEINGSONG-POPOV, R.; OSMANOV, S.; PAU, C.P.; SCHOCHETMAN, G.; BARIN, F.; HOLMES, H.; FRANCIS, G.; RUPPACH, H.; DIETRICH, U.; LISTER, S.; WEBER, J.; UNAIDS NETWORK FOR HIV-1 ISOLATION AND CHARACTERIZATION. Serotyping of HIV type 1 infections: definition, relationship to viral genetic subtypes and assay evaluation. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **14**:311-318, 1998.



24. CLAVEL, F; GUÉÍTARD, D; BEUN-VÉZINET, F; CHAMARET, S.; REY, M.; SANTOS-FERREIRA, M.O.; LAURENT, A.C.; DAUGUET, C.; KATLAMA, C.; ROUZIUX, C.; KLATZMANN, D.; CHAMPALIMAUD, J.L.; MONTAIGNER, L. Isolation of a new retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, **233**:343-346, 1986.
25. COFFIN J.M.; HAASE J.A.; LEVY L.; MONTAGNIER L.; OROSZLAN S.; TEICH N.; TEMIN H.; TOYOSHIMA K.; VARMUS H.; VOGT P.; AND WEISS R.. Human immunodeficiency viruses. **Science** **232**:697, 1986.
26. COFFIN, J.M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. **Science**, **267**:483; 489, 1995.
27. COHEN, O.; WEISSMAN, D.; FAUCI, A.S. The immunopathogenesis of HIV infection. In: PAUL, W.E. In: **Fundamental immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, 1998. cap 44, p.1455-494
28. CORNELISSEN, M.; KAMPINGA G.; ZORGDRAGER, F.; GOUDSMIT, J.; UNAIDS NETWORK FOR HIV-1 ISOLATION AND CHARACTERIZATION. Human immunodeficiency virus type 1 defined by env show high frequency of recombinants gag genes. **J. Virol.**, **70**: 8209-8210, 1996.

29. COSTA, SM.; SCHECHTER, M.; SHINDO, N.; VICENTE, A.C.P.; OLIVEIRA, E.F.; PINTO, M.E.; TANURI, A. Sequence and phylogenetic analysis of glycoprotein 120 of an HIV type 1 variant (GWGR) prevalent in Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **11**:1143-1145, 1995.
30. COUTO-FERNANDEZ, J.C.; MORGADO M.G.; BONGERTZ V.; TANURI A.; ANDRADE, T.; BRITES C.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Retrovirol.**, **22**: 288-293, 1999.
31. COVAS, D.T.; BÍCARO, T.A.; KASHIMA, S.; DUARTE, G.; MACHADO, A.A. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in southeast Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Retrovirol.**, **19**:74-79, 1998.
32. DECAMPS, D.; APETREI, C.; COLLIN, G.; DAMOND, F.; SIMON, F.; BRUN-VIZINET, F. Naturally occurring decrease susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors. **AIDS**, **12**:11109-11111, 1998.
33. DELWART, E.L.; SHPAER, E. G.; LOUWAGIE, J.; McCUTCHAN, F.E.; GREZ, M.; RUBSAMEN-WAIGMANN, H.; MULLINS, J. I. Genetic relationships determined by a DNA Heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env. genes. **Science**, **3**:838-878, 1993.

34. DELWART, E.L.; HANLEY, T.; HERRING B.; LEARN JUNIOR, G.H., LYAGOBA, F.; RODRIGO, A.G.; SHANKARAPPA, R. Heteroduplex Mobility Analysis HIV-1 env subtyping kit. Protocol Version 3. NIH AIDS Research & Reference Program, 1995. 26p.
35. DHALIA, O.; BARREIRA, P.; CASTILHO E.A. A AIDS no Brasil: situação atual e tendências. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>> Acesso em: 21. jan. 2001.
36. DIMITROV, DS. How do viruses enter cells? HIV coreceptor teach us a lesson of complexity. **Cell**, **91**: 721-730, 1997.
37. DOURADO, I.; NORONHA, C.V.; BARBOSA, A.M.; LAGO, R. Considerações sobre o quadro de AIDS na Bahia. **IESUS**, **2**: 1-25, 1997.
38. FAUCI, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. **Nature**, **384**:529-534, 1996.
39. FIELDS, B.N; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Human Immunodeficiency Viruses and their Replication. In: Virology. 3. ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1996, cap. 60. p.1767-1848.
40. GALAI N.; KALINKOVICH <sup>a</sup>; BURSTEIN R.; VLAHOV D.; BENTWICH Z. African HIV-C and rate of progression among Ethiopian immigrants in Israel. **Lancet**, **349**: 180-181, 1997.

41. GALLO, R.C.; SALAHUDDIN, S.Z.; POPOVIC, M.; SHEARER G.M.; KAPLAN, M.; HAYNES, B.F.; PALKER, T.J.; REDFIELD, R.; OLESKE, J.; SAFAI, B.; WHITE, G.; FOSTER, P.; MARKHAM, P.D. Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, **224**:500-503, 1984.
42. GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. Slaview And Phylo Win: Two grafic tools sequence aligment and molecular phylogeny. **Computing Application Biosc.**, **12**: 543-548, 1996.
43. GALVÃO-CASTRO, B.; IVO-DOS-SANTOS J.; COUTO-FERNANDEZ J.C.; BONGERTZ V.; BOU-HABIB D.C.; SION F.S.; BARTH O.M.; PEREIRA H.; PEREIRA M.S. Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**:453-456, 1987.
44. GALVÃO-CASTRO, B.; COUTO-FERNANDEZ, J.C.; MELLO, M.A.; LINHARES-DE-CARVALHO, M.I.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; BONGERTZ, B.; FERREIRA, P.C.P.; MORGADO, M.; SAVINO, E.; TANURI, A.; THE BRAZILIAN NETWORK FOR THE HIV-1 ISOLATION AND CHARACTERIZATION. A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**:335-338, 1996.

45. GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D.L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C.M.; MICHAELL, S. F.; CUMMINS, L.B.; ARTHUR, L.O.; PEETERS, M.; SHAW, G. M.; SHARP, P.M.; HAHN, B.H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, **397**:436-441, 1999.
46. GAYLE, H.D.; HIEL, G.L. Global Impact of Human Immunodeficiency virus and AIDS. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14**:327-335, 2001.
47. GEIJTENBEEK, T.B.H.; KWON, D.S.; TORENSMA, R.; VAN VLIET, S.J.; VAN DUIJNHOFEN, G.C.F.; MIDDEL, J.; CORNELISSEN, I.L.M.H.A.; NOTTET, H.S.L.M.; KEWALRAMANI, V.N.; LITTMAN, D.R.; FIGDOR, C.G.; VAN KOOYK, Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T-cells. **Cell**, **100**:587-597, 2000.
48. HAHN, B.H. Viral genes and their products. In: **Textbook on AIDS Medicine**. New York: Williams & Williams, 1994. cap.3, p21-43.

49. HEYNDRIKX, L.; JANSSENS, W.; ZEKENG, L.; MUSONDA, R.; ANAGONOU, S.; VAN DER AWERA, G.; COPPENS, S.; VEREECKEN, K.; DE WHITE, K.; VAN RAMPENBERGH, R.; KALHINDO, M.; MORISON, L.; McCUTHAN, F.E.; CARR, J.K.; ALBERT, J.; ESSEX, M.; GOUDSMIT, J.; ASJO, B.; SALMINEN, M.; BUVÉ, A.; STUDY GROUP ON HETROGENEITY OF hiv EPIDEMICS IN African cities; VAN DER GROEN, G. Simplified strategy for detection of recombinant HIV-1 group M isolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. **J. Virol.**, **74**:363-370, 2000.
50. HU, D.J.; DONDERRO, T.J.; RAYFIELD, M.A.; GEORGE, R.; SCHOCHETMAN, G.; JAFFE, H. W.; LUO, C.; KALISH, M. L.; WENIGER, B. G.; PAU, C.; SCHAB, C.A.; CURRAN, J. W. The emerging genetic diversity of HIV. **JAMA**, **275**:210-216, 1996.
51. HU, D.J.; BUVÉ, A.; BAGGS, J.; VAN-DER-GROEN, G.; DONDERO, T;J. What role does HIV-1 subtype play in transmission and pathogenesis? An epidemiological perspective. **AIDS**, **13**: 873-881, 1999.
52. HWANG, S.S.; BOYLE, T.J.; LYERLY H.K.; CULLEN B.R.. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. **Science**, **253**:71-71, 1991.
53. ISSELBACHER, K.J. In: **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 13. ed. New York: Mac Graw Hill, 1994.

54. JANINI, L.M.; TANURI, A.; SHECHTER, M.; PERALTA, J.M.; VICENTE, A.C.P.; TORRE, N.D.; PIENIAZEC, N.J.; LUO, C.; RAMOS, A.; SORIANO, V.; SCHOCHETMAN, G.; RAYFIELDS, M.A.; PIENIAZEC, D. Horizontal and Vertical Transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1 Dual Infections Caused by Viruses of Subtypes B and C. **J. Infect. Dis.** **177**: 227-231, 1998.
55. KAHN, J.O.; WALKER, B.D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **N. Engl. J. Med.**, **339**:33-39, 1998.
56. KANKI P. J.; HAMEL D. J.; SANKALÉ J.; HSIEH C.; THIOR I.; BARIN F.; WOODCOCK S. A.; GUÈYE-NDIAYE A.; ZHANG E.; MONTANO M.; SIBY T.; MARLINK R.; NDOYE I.; ESSEX M. E.; MBOUP S. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. **J. Infect. Dis.**, **179**:68-73, 1999.
57. KOKOTOU, E.G.; SANKALÉ, J.L.; MANI, I.; GUÈYE-NDIAYE, A.; SCHWARTZ, D.; ESSEX, M.E.; MBOUP, S.; KANKI, P.J. In vitro correlates of HIV-2-mediated HIV-1 protection. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, **97**: 6797-6802, 2000.
58. KORBER, B.T.M.; OSMANOV, S.; ESPARZA, J.; MEYERS, G.; WHO NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION. The World Health Organization Global Program on AIDS – Proposal for Standardization of HIV Sequence Nomenclature. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **10**: 355-1358, 1994.

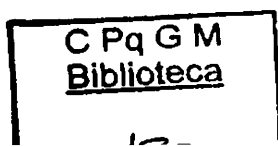
59. LAWN, S. D.; BUTERA, S. T.; FOLKS, T. M. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14**: 753-777, 2001.
60. LETVIN, N.L.; WALKER, B.D. HIV versus the immune system: another apparent victory for the virus. **J. Clin. Invest.**, **107**:273-275, 2001.
61. LOUWAGIE J.; DELWART, E. L.; MULLINS J. I.; McCUTCHAN F. E.; EDDY G.; BURKE D. S. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **10**:561-567, 1994.
62. MALIM, M.H & EMERMAN M. HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. **Cell**, **104**:469-472, 2001.
63. McCUTCHAN, F.E.; SALMINEN, M.O; CARR, J.K.; BURKE, D.S. HIV genetic diversity. **AIDS**, **10**:513-520, 1996.
64. McCUTCHAN, F.E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **AIDS**, **14**:S31-S44, 2000. Suppl. 3.
65. MERCADO, J.M.M.; DIO, R.; PRADAL, M.G. Genetic diversity of HIV-1 subtype F from Brazil: failure of HIV-1 viral load testing based on molecular biology amplification methods. **AIDS**, **13**:2183-2185, 1999.



66. MOIR, S.; MALASPINA, A.; LI, Y.; CHUNG, T.W.; LOWE, T.;  
ADELSBERGER, J.; BASELER, M.; EHLER, L.A.; LIU, S.; DAVEY, R.T.D.;  
MICAN, J.A.M., FAUCI, A.S. B cells of HIV-1-infected patients bind virions  
through CD-21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T  
cells. **J. Exp. Med.**, **192**:637-645, 2000.
67. MOORE, J.P.; PARREN, P.W.H.I.; BURTON, D.R. Genetic Subtypes, Humoral  
Immunity, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccine Development. **J.**  
**Viro.**, **75**:S721-S729, 2001.
68. MORGADO M. G.; SABINO E. C.; SHPAER E. G.; BONGERTZ V.; BRIGIDO  
L.; GUIMARAES M. D. C.; CASTILHO E. A.; GALVÃO-CASTRO B.;  
MULLINS J. I.; HENDRY R. M.; MAYER A. V3 region polymorphisms in HIV-1  
from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from north  
american/european prototype and detection of subtype F. **AIDS Res. Hum.**  
**Retroviruses**, **10**:569-576, 1994.

69. MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; GRIPP, C.B.G.; COSTA, C.I.; NEVES, I.; VELOSO, G.V.; LINHARES-CARVALHO, M.I.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; BASTOS, F.I.; KUIKEN, C.; CASTILHO, E.A.; GALVÃO-CASTRO, B.; BONGERTZ, V.; EVANDRO CHAGAS HOSPITAL AIDS CLINICAL RESEARCH GROUP. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: High Prevalence of HIV-1 Subtype B and Identification of an HIV-1 Subtype D Infection in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **18**: 488-494, 1998.
70. MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; NEVES, I.; VELOSO, V.G.; LINHARES-CARVALHO, M.I.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; BASTOS, F.I.; CASTILHO, E.A.; GALVÃO-CASTRO, B.; BONGERTZ, V.; THE HOSPITAL EVANDRO AIDS CLINICAL RESEARCH GROUP. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: Polymorphism of the Antigenically Distinct HIV-1 B subtype strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**:383-386, 1998.
71. MORGADO, MG; GUIMARÃES, ML; GALVÃO-CASTRO, B 2002. HIV-1 Polimorphism: a challenge for vaccine development – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97**: 143-150.
72. OSMANOV, S.; HEYWARD, W.L.; ESPARZA, J. HIV-1 genetic variability: implications for the development of HIV vaccines. **Antiib. Chemoth.**, **48**:30-38, 1996.

73. PEETERS, M.; SHARP, P.M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. **AIDS**, **14**:S129-149, 2000. Supplemento 3.
74. PEETERS, M. Recombinants HIV sequences: their role in the global epidemic. In: KUIKEN, C; et al (Eds). **HIV sequence compendium 2000**. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics/ Los Alamos National Laboratory, 2000. p54-72.
75. PEHRSON, P.; LINDBACK S.; LIDMAN C.; GAINES H.; GIESECKE J. Longer survival after HIV infection for injecting drug users than for homosexual men: implications for immunology. **AIDS**, **11**: 1007-1012, 1997.
76. PINTO, M.E.; TANURI, A.; SCHECHTER M. Molecular and epidemiologic evidence for discontinuous introduction of subtypes B and F into Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **19**:310-311, 1998.
77. PINTO, G.H.N.; TURCATO, G.; LEWI, D.S.; DIAZ, R.S. Effects of CCR5 genetic polymorphism and HIV-1 subtype in antiretroviral response in Brzilian HIV-1-infected patients. **J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **24**:399-400, 2000.



78. RAMOS, A.; TANURI, A.; SHECTER, M.; RAYFIELD, M.A.; HU, D.J.; CABRAL, M.C.; BANDEA, C.I.; BAGGS, J.; PIENIAZEC, D. Dual and Recombinant Infections: an Integral Part of the HIV-1 Epidemic in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, 5:65-74, 1999.
79. ROBERTIS, J.D.; BEBENEK, K.; KUNNEL, T.A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science**, 242:1171-1173, 1988.
80. ROBERTSON, D. L.; HAHN, B.H.; SHARP, P.M. Recombination in AIDS viruses. **J. Mol. Evol.**, 40:249-259, 1995.
81. ROSSINI, M.A.A.; DIAZ, R.S.; CASEIRO, M.; TURCATO, G.; ACCETTURI, C.A.; SABINO, E.C. HIV-1 subtypes among intravenous drug users from two neighboring cities in São Paulo State. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34:45-47, 2001.
82. SABINO, E.C.; SHPAER, E.G.; MORGADO, M.G.; KORBER, B.T.M.; DIAZ, R.S.; BONGERTZ, V.; CAVALCANTE, S.; GALVÃO-CASTRO, B.; MULLINS, J.I.; MAYER, A. identification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J. Virol.**, 68:6340-6346, 1994.

83. SABINO, E.C.; DIAZ, R.S.; BRIGIDO, L.C.F.; LEARN, G.H.; MULLINS, J.I.; REINGOLD, A.L.; DUARTE, A.J.S; MAYER, A.; BUSCH, M.P. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in Sao Paulo City, Brazil. **AIDS**, **10**:1579-1584, 1996.
84. SANTORO-LOPES, G.; HARRISON, L.H.; TAVARES, M.D.; XEXÉO, A.; SANTOS, A.C.E.; SHECHTER, M. HIV-1 disease progression and V3 serotypes in Brazil: is B different from B-Br? **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **16**:953-958, 2000.
85. SERETI I. & LANE C. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus: implications for immune-based therapies. **Clin. Infect. Dis.**, **32**: 1738-1755, 2001
86. SHARP, P.M; ROBERTSON, D.L; GAO, F.; HAHN, B.H. Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. **AIDS**, **8**:527-542, 1994.
87. SHEARER, G.M. HIV-induced immunopathogenesis. **Immunity**, **9**:587-593, 1998.
88. SIMON, F.; MAUCLÉRE, P.; ROQUES, P.; LOUSSERT-AJAKA, I.L.; MULLER-TRUTWIN, M.C.; SARAGOSTI, S.; GEORGES-COURBOT, M.C.; BARRÉ-SINOUSI, F.; BRUN-VÉNIZET, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct form group M and group O. **Nat. Med.**, **4**:1032-1037, 1998.

89. SOITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evolution**, **4**:406-425, 1987.
90. STEFANI, M.M.A; PEREIRA, G.A.S; MARTINELLI, C.M.T.; SHINDO, N.; GALVÃO-CASTRO, B. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **23**:205-207, 2000.
91. TAJIMA, F.; NEI, M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. **Mol. Biol. Evolution**, **1**:269-285, 1996.
92. TANURI, A.; SWANSON, P.; DEVARE, S.; BERRO, O.J.; SAVEDRA, A.; COSTA, L.J.; TELLES, J.G.; BRINDEIRO, R.; SCHABLE, C.; PIAZENIC, D.; RAYFIELSD, M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr Hum. Retrovirol.**, **20**:60-66, 1999.
93. TATT, I.D.; BARLOW, K.L.; CLEWLEY, J.P. A gag gene heteroduplex mobility assay for dubtying HIV-1. **J. Virol. Methods**, **87**:41-50, 2000.
94. THOMSON, M.M.; NÁJERA, R. Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetic forms into western countries. **Clin. Infec. Dis.**, **32**:1732-1737, 2001.

95. TRUJILLO, J.R.; GOLETIANI, N.V.; BOSH, I.; KENDRICK, C.; ROGERS, R.A.; TRUJILLO, E.B.; ESSEX, M.; BRAIN, J.D. T-tropic sequence of the V3 loop is critical for HIV-1 infection of CXCR-4 positive colonic HT-29 epithelial cells. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr Hum. Retrovirol**, **25**:1-10, 2000.
96. TSCHERNING C.; ALAEUS A.; FREDRIKSSON R.; BJORNDAL A.; DENG H.; LITTMAN D. R.; FENYO E. M.; ALBERT J. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. **Virology**, **241**:181-188, 1998.
97. UNAIDS. Joint united nation programme on HIV/AIDS. Characterization of globally prevalent HIV strains in relation to HIV vaccine development. In: **REPORT OF THE MEETING OF THE TECHNICAL WORKING GROUP, 2.**, Geneva, july, 1998.
98. UNAIDS. AIDS epidemic update/ Decamber 2001 – Global overview. 2001. Disponível em: <<http://www.unaids.org>.> Acesso em: 18. jan. 2002.
99. UNAIDS. HIV and AIDS in Americas: an epidemic with many faces. 2001. Disponível em: <<http://www.unaids.org>.> Acesso em: 18. jan. 2002.

100. VELARDE-DUNOIS, K.G.; GUIMARÃES, M.L.; FUENTE, C.; ANDRADE, R.; ARÉVALO, R.; PANTOJA, S.; MARISCAL, R.; SANDOVAL, R.; IRIARTE, F.; CHAMÓN, V.; MELGAR, M.L.; CARVAJAL, R.; MORGADO, M.G. Molecular characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals from Bolivia reveals the presence of two distinct Genetic Subtypes B and F. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **16**:1921-1926, 2000.
101. VLAHAKIS, S.R., ALGECIRAS-SCHIMNICH, A.; BOU, G.; HEPPELMANN, C.J.; VILLASIS-KEEVER, A.; COLLMAN, R.G.; PAYA, C.V. Chemokine-receptor activation by *env* determines the mechanism of death in HIV-infected and uninfected T lymphocytes. **J. Clin. Invest.**, **107**:207-215, 2001.
102. ZHANG, L.; DIAZ, R.S.; HO, D.D.; MOSLEY, J.W.; BUSCH, M.P.; MAYER, A. Host-specific driving force in Human Immunodeficiency Virus type 1 evolution *in vivo*. **J. Virol.**, **71**:2555-2561, 1997.
103. ZHU, T.; KORBER, B.T.; NAHMIAS, A.J.; HOOPER, E.; SHARP, P.M.; HO, D.D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. **Nature** **391**: 594-597, 1998.
104. WEISS, R.A. Gulliver's travels in HIVland. **Nature**, **410**: 963-967, 2001.



105. WU, L.; GERARD, N. P.; WYATT, R.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; RUFFING, N.; BORSETTI, A.; CARDOSO, A. A.; DAESJARDIN, E.; NEWMAN, W.; GERARD, C.; SODROSKI, J. CD-4 induced interaction of primary HIV-1 gp 120 glycoproteins with chemokine receptor CCR-5. *Nature*, 384:179-183, 1996.