



**JOSÉ CARLOS COUTO FERNANDEZ**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA DIVERSIDADE DO  
HIV-1 NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA  
E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE HIV-1 OBTIDAS EM  
DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS**

Tese submetida à Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular da Fundação  
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a  
obtenção do grau de Doutor em Ciências - área  
de concentração Biologia Celular e Molecular

**Instituto Oswaldo Cruz**

**Janeiro  
2000**



Trabalho realizado no Laboratório Avançado em Saúde Pública-LASP, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, e Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, sob a orientação dos Drs. Bernardo Galvão Castro Filho e Mariza Gonçalves Morgado.

## Ficha Catalográfica

Couto-Fernandez, José Carlos

Contribuição ao estudo da diversidade do HIV-1 no Brasil: caracterização genotípica e fenotípica de amostras de HIV-1 obtidas em diferentes regiões geográficas.

234 fls.

Tese: Doutorado em Biologia Celular e Molecular

1. AIDS/HIV 2. Brasil 3. Diversidade 4. Subtipagem genética

5. gp120 6. Análise filogenética 7. Peptídeos sintéticos

I. Instituto Oswaldo Cruz – IOC, FIOCRUZ.

II. Título

Aos meus pais  
e à Saada, meu grande amor,  
esposa e companheira.

## Agradecimentos

. Aos Drs. Margarite “Peggy” Pereira e Hélio Gelly Pereira, *in memorium*, pelo exemplo de dedicação à Ciência e pelo privilégio em iniciar meus conhecimentos em técnicas de biologia celular, utilizadas no isolamento e cultivo do HIV-1, como também na purificação de antígenos virais e no estabelecimento dos primeiros testes sorológicos para detecção da infecção pelo HIV-1 no Brasil.

. Ao meu orientador Dr. Bernardo Galvão Castro Filho, pela minha formação científica e pelo apoio na condução desta tese.

. À minha orientadora Dra. Mariza Gonçalves Morgado, pela orientação e apoio, cuja seriedade, competência e honestidade científica acompanharam todo o desenvolvimento desta tese.

. À Dra. Vera Bongertz pela revisão crítica desta tese e sugestões na elaborações das diferentes publicações científicas incluídas neste estudo.

. Ao corpo científico do laboratório de Virologia do Hospital Bichat Claude-Bernard, Paris, França, principalmente, a Prof. Françoise Brun-Vézinet e aos Drs. François Simon, Ibissan Loussert-Ajaka e Gilles Collin, por todos os ensinamentos nas diferentes metodologias de biologia celular e molecular aplicadas ao isolamento, diagnóstico e caracterização do HIV1/2.

. À Cooperação Técnico-Científica entre o Brasil e a França, na pessoa dos Drs. Euclídes Aires de Castilho e Bernard Larouzé, pelo apoio, empenho e competência na condução de diferentes projetos de colaboração institucional.

. Ao corpo científico do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia, Bélgica, principalmente os Drs. Guido Van der Groen, Wouter Janssens, Léo Hendrickx e Katrine Franzen, pelos ensinamentos em técnicas de biologia molecular e sequenciamento genético adquiridos ao longo da análise de amostras brasileiras de HIV-1.

. Ao corpo científico do Laboratório Retrovirus – IRD/ORSTOM, Montpellier, França, representados pelos Drs. Eric Delaporte, Martine Peeters e Celine Montavon, pela amizade, pelos ensinamentos nos diferentes métodos de filogenia viral, e disponibilidade em sequenciar molecularmente amostras não-B brasileiras.

. Ao Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pelo apoio, seriedade e honestidade com que conduziu todas nossas solicitações.

. Aos colegas do LASP: Noilson, Jurema, Maria Eugênia, Eliana, Elizabeth, Sérgio e Lain Carlos, pela amizade e solidariedade.

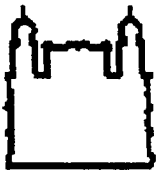
- . Aos antigos colegas do Departamento de Imunologia, Ricardo, Paulo, Eduardo, Antônio Teva, Désio, Dauto, Cláudio, Fátima e Joseli, pela amizade e solidariedade.
- . Aos colegas do Laboratório de AIDS e Imunologia da FIOCRUZ Monick, Aline, Carmen, Luciano, Ivan, Deise e Celso pela amizade e solidariedade.
- . Aos colegas do Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem da FIOCRUZ, Genilton, Heloísa, Romney e Rodrigo, pela amizade e elaboração das figuras e imagens contidas nesta tese.
- . Aos colegas do Laboratório de Genética da UFRJ, Amilcar, Rodrigo e Helena, pela amizade e ajuda no sequenciamento genético de amostras de HIV-1.
- . À Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde, pelo apoio e financiamento institucional.
- . Ao Programa de Recursos Humanos (RHAE) do CNPq, pelo apoio e financiamento institucional.
- . Ao Programa Institucional de AIDS da FIOCRUZ - PIAF, pelo apoio institucional.

**ÍNDICE**

. APRESENTAÇÃO.....	1
. RESUMO.....	2
. ABSTRACT.....	4
. INTRODUÇÃO.....	6
. O agente etiológico.....	7
. Classificação dos retrovírus.....	9
. Classificação filogenética dos lentivírus.....	12
. Morfologia e estrutura do HIV-1.....	14
. Organização genômica.....	17
. Ciclo Replicativo do HIV-1.....	23
. Variabilidade genética do HIV-1.....	29
. Mecanismos de indução da diversidade.....	31
. Epidemiologia molecular do HIV-1.....	34
. Recombinação gênica entre subtipos.....	42
. Diversidade biológica.....	46
. Variabilidade antigênica.....	50
. Imunotipagem.....	53
. Isolamento e caracterização do HIV no Brasil.....	55
. Rede de laboratórios para o isolamento e caracterização do HIV-I no Brasil.....	57
. OBJETIVO GERAL.....	60
. Objetivos específicos.....	60

. RESULTADOS E APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS.....	61
. Documento 1.....	63
. Documento 2.....	71
. Documento 3.....	78
. Documento 4.....	106
. Documento 5.....	115
. Documento 6.....	130
. DISCUSSÃO.....	153
. CONCLUSÕES.....	174
. PERSPECTIVAS E DIRETRIZES.....	177
. BIBLIOGRAFIA.....	179
. TRABALHOS RELACIONADOS.....	221





FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Coord. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Av. Brasil, 4365 - Pav. Arthur Neiva - Térreo  
21.045-900 - Rio de Janeiro  
Tel. / Fax: (021) 598-4337 / 280-5449

**Ata da Defesa de Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular de José Carlos Couto Fernandez, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Mariza Gonçalves Morgado e do Dr. Bernardo Galvão.**

Ao vigésimo quarto dia do mês de janeiro de dois mil, às treze horas, realizou-se no Auditório do INCQS/Fundação Oswaldo Cruz, o exame da Tese intitulada: *“Contribuição ao Estudo da Diversidade do HIV-1 no Brasil: Caracterização Genotípica e Fenotípica de Amostras de HIV-1 Obtidas em Diferentes Regiões Geográficas”*, de José Carlos Couto Fernandez, aluno do Curso de Doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências - Área de Concentração: Imunologia.

A Banca Examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Vera Bongertz-IOC/FIOCRUZ (Presidente da Banca), Dr<sup>a</sup>. Ester Cerdeira Sabino-Hemocentro/SP, Dr. Francisco Inácio Bastos – CICT/FIOCRUZ, Dr. Amilcar Tanuri – Depto. de Genética/UFRJ e Dr. Luís Brígido – Instituto Adolfo Lutz/SP. Após argüir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou:

Dr<sup>a</sup>. Vera Bongertz

Aprovado

Dr<sup>a</sup>. Ester Cerdeira Sabino

Aprovado

Dr. Francisco Inácio Bastos

Aprovado

Dr. Amilcar Tanuri

Aprovado

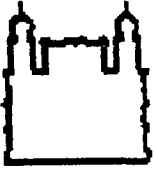
Dr. Luís Brígido

Aprovado

De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, o candidato foi considerado:

Aprovado. Uma vez encerrado o exame, eu Cleide de Almeida Souza, secretária do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, redigi a presente Ata, que assino juntamente com os membros da Banca Examinadora. Rio de Janeiro, vinte e quatro de janeiro de dois mil.

*Handwritten signatures and notes at the bottom of the page, including names like 'José Carlos', 'Francisco BA', and 'Luis Brígido'.*



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Coord. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Av. Brasil, 4365 - Pav. Arthur Neiva - Térreo  
21.045-900 - Rio de Janeiro  
Tel. / Fax: (021) 598-4337 / 280-5449

## ADENDO A ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PÓS-GRADUANDO(A): José Carlos Couto Fernandez**  
**CORREÇÕES A SEREM EFETUADAS PELO(A) PÓS-GRADUANDO(A) (Prazo máximo: 90 dias):**

A BANCA DESTACA A QUALIDADE DO TRABALHO  
E LOUVA O ESFORÇO DO CANDIDATO

Rio de Janeiro, 24 de janeiro de 2000.

**Assinatura dos Membros da Banca Examinadora:**  
**(Usar folhas adicionais, caso necessário)**

Aster Luederig Sobrinho  
Angelo da  
L. M. B. J.

Uca. M.

## APRESENTAÇÃO

Um acentuado grau de diversidade genética entre as diferentes amostras de HIV-1 foi rapidamente evidenciado a partir da análise dos primeiros isolados virais. Atualmente, a análise filogenética de diferentes isolados HIV-1 permitiu classificá-los em três grupos distintos. O grupo M ("major"), mais prevalente, apresenta-se subdividido em pelo menos 14 formas genéticas, constituindo 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e 5 formas recombinantes (A/E, A/G, A/G/I, A/B e A/G/I/J), recentemente denominadas CRFs ("Circulating Recombinant Forms"). O Grupo O ("outlier") agrupa vírus divergentes, principalmente do oeste africano, enquanto que o grupo N é composto de vírus com estrutura genética intermediária entre os grupos M e O. A existência destes tipos e subtipos com características genéticas distintas pode ter impacto sobre a imunopatogenia da infecção, dificultando o desenvolvimento de vacinas anti-HIV-1 pluripotentes.

Buscando melhor conhecer o espectro da diversidade do HIV-1 no Brasil e suas potenciais implicações no estabelecimento de futuros programas imunoproláticos no país, realizamos um conjunto de trabalhos visando analisar o polimorfismo viral em diferentes regiões geográficas, além de participar do esforço nacional para o isolamento e caracterização do HIV-1 nos sítios selecionados pelo Ministério da Saúde para futuros testes de vacinas anti-HIV/AIDS, no contexto da Rede Nacional para o Isolamento e Caracterização do HIV-1 no Brasil. No seu conjunto, foram analisadas amostras de HIV-1 obtidas ao longo de aproximadamente 10 anos da epidemia de AIDS no país. Uma série de análises genotípicas, fenotípicas e antigênicas foram realizadas nestas amostras objetivando determinar o grau de diversidade genética entre as amostras de HIV-1 circulantes no país, além de melhor conhecer a distribuição dos diferentes subtipos virais. A determinação do fenótipo viral em diferentes linhagens celulares permitiu conhecer a diversidade biológica destas amostras que, juntamente com a análise das seqüências do envelope, permitiu estudar o impacto de determinadas substituições de aminoácidos na estrutura da alça V3 do HIV-1, como determinante do fenótipo indutor de sincício. A diversidade antigênica, avaliada pela reatividade de soros de indivíduos positivos para o HIV-1 frente a diferentes peptídeos sintéticos subtipo-específicos, bem como, a utilização desta técnica sorológica como método de sorotipagem, são amplamente discutidos.

A possível associação do subtipo viral com via de transmissão, sexo e fator racial, foi investigada em populações de risco com características socio-demográficas africanas. Além disso realizamos o sequenciamento genômico do gene do envelope e genes acessórios de uma amostra brasileira do subtipo D, permitindo conhecer de forma detalhada sua estrutura molecular.

Estes resultados em conjunto permitiram uma avaliação abrangente dos níveis de diversidade do HIV-1 no Brasil, enfatizando a necessidade do estabelecimento de um programa de vigilância contínuo para o monitoramento desta diversidade em diferentes regiões geográficas. Estas informações serão de fundamental importância no conhecimento da patogenia da infecção e para futuros testes de vacinas anti-HIV-1/AIDS a serem estabelecidos no Brasil.

## RESUMO

Desde o estabelecimento em cultura do primeiro isolado de HIV-1 no Brasil (Galvão-Castro e cols., 1987), já podíamos perceber um polimorfismo genético e biológico em amostras obtidas no início da epidemia de AIDS no país, indicando que esta heterogeneidade seria similar a descrita para o HIV-1 em outras partes do mundo (Couto-Fernandez e cols., 1992). Nos anos subsequentes, buscando um melhor detalhamento da estrutura genética destes isolados, entre outros, sequenciamos um fragmento genômico de aproximadamente 860pb correspondentes as regiões V3, V4, V5 e parte da gp41 do envelope viral de 6 amostras coletadas entre 1987 e 1989 (documento 1). A análise filogenética mostrou que estas amostras brasileiras eram do subtipo B, com níveis de diversidade variando entre 5,9 e 13, 1%. A análise das seqüências de aminoácidos da alça V3 revelou que 3 amostras possuíam o motivo GPGR no topo da alça, característico de isolados Norte Americanos/Europeus, enquanto que nas outras três existia uma substituição da prolina pelo triptofano (W), metionina (M) e fenilalanina (F), respectivamente. O grau de diversidade antigênica, avaliado pela reatividade sorológica de 114 soros obtidos de pacientes do Rio de Janeiro, coletados no período de 1990 a 1992, frente à diferentes peptídeos sintéticos subtipo-específicos, mostrou que 60,5% deles reagiram com peptídeos do subtipo B e 15,8% mostraram reatividade específica para o peptídeo Bra-cons (GWG). Um elevado percentual de soros (37,7%) não mostrou reatividade com os diferentes peptídeos usados.

Buscando conhecer o espectro da diversidade do HIV-1 nos sítios selecionados para futuros testes de vacinas anti-HIV/AIDS, foi estabelecida a Rede Nacional de Laboratórios para Isolamento e Caracterização do HIV-1 no Brasil que, permitiu uma análise abrangente e sistematizada de amostras coletadas em diferentes regiões do país.

Estes estudos, realizados primeiramente em amostras do Rio de Janeiro (documento 2) e, subsequente, de forma mais detalhada em amostras provenientes de três grandes cidades brasileiras (São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte), permitiu a identificação de três subtipos genéticos do HIV-1, na proporção de 82,9% das amostras do subtipo B, 14,3% subtipo F e 2,9% subtipo C (documento 3). A variante B'' foi identificada em 45% das amostras do subtipo B. A análise filogenética de 25 isolados virais utilizando seqüências genômicas correspondentes a região C2V3 do envelope viral, mostrou 100% de concordância com os resultados da análise da mobilidade de heteroduplexes - HMA. Não foi observada associação significativa entre os diferentes subtipos genéticos e propriedades biológicas *in vitro*. Confirmando dados anteriores, não foi demonstrada associação entre subtipos genéticos e perfis de soro-reatividade frente a peptídeos subtipo-específicos ou neutralização heteróloga.

Reconhecendo a existência de lacunas no conhecimento sobre os níveis de diversidade do HIV-1 em outras regiões do Brasil, fora do eixo Rio - São Paulo, realizamos a subtipagem genética do HIV-1 em amostras obtidas de diferentes populações de risco na cidade de Salvador-Bahia (documento 4) que, atualmente, concentra o segundo maior número de casos de AIDS na região nordeste. Neste estudo foram analisadas amostras de usuários de drogas injetáveis (UDI) e de indivíduos infectados por via sexual. No grupo dos UDI, 89,5% das amostras foram classificadas como subtipo B, 3% subtipo F e 7,5% mostrou um perfil B/F na análise pelo HMA. No grupo de transmissão sexual, 95% das amostras eram do subtipo B, 3,4% mostrou um perfil B/F e uma amostra o perfil B/C/E no HMA. O sequenciamento genômico das amostras com múltiplos perfis no HMA permitiu classificá-las filogeneticamente como sendo do subtipo B, enquanto que as amostras do subtipo F, se agruparam com amostras brasileiras referência do mesmo subtipo. A análise da reatividade sorológica frente á diferentes peptídeos sintéticos subtipo-específico mostrou níveis elevados de reatividade cruzada entre os diferentes peptídeos, não permitindo a discriminação sorológica dos diferentes subtipos do HIV-1 no Brasil, bem como da variante B'. Ainda no referido estudo, não pudemos verificar associação entre os subtipos de HIV-1 e via de transmissão, sexo ou fator racial.

Estimativas do Programa de AIDS das Nações Unidas (1999) calculam que nos próximos anos, vírus do subtipo não-B serão os principais responsáveis pelo surgimento de novos casos de AIDS, principalmente nos países em desenvolvimento. Neste contexto, buscando obter informações detalhadas sobre a estrutura molecular de vírus não-B circulante no Brasil, realizamos o sequenciamento molecular de uma amostra do subtipo D, recentemente identificada no Rio de Janeiro. A análise das seqüências de nucleotídeos da amostra D brasileira mostrou estreita relação filogenética com isolados africanos do mesmo subtipo (documento 5). Os resíduos de cisteínas se mostraram relativamente conservados, novos sítios de glicosilação e uma grande inserção foi detectada na região V1/V2 do envelope viral, enquanto que o domínio GPGQ estava presente no topo da alça V3. Nenhum evento de recombinação foi verificado no envelope e genes acessórios, contudo, a porção 5' do gene *nef* mostrou relação filogenética com vírus do subtipo B.

Concluindo, realizamos um estudo comparativo dos níveis de diversidade da região V3 das amostras de HIV-1 incluídas neste estudo, procurando determinar o envolvimento de substituições de aminoácidos básicos, bem como da distribuição de cargas nesta região, como determinante do fenótipo/tropismo viral (documento 6). Aparentemente, a variabilidade da região V3 não implicou em alteração significativa da sua estrutura espacial. Apesar de não existir diferença significativa da carga total, ponto isoelétrico (pI) e percentual de aminoácidos básicos da região V3, pudemos detectar uma maior concentração de cargas positivas nos isolados T-linfotrópicos, indutores de sincício. Não houve correlação dos parâmetros acima analisados com subtipo genético do HIV-1, fenótipo biológico ou distribuição geográfica.

## ABSTRACT

Since the first isolation of a Brazilian HIV-1 strain (Galvão-Castro e cols., 1987) a genetic and biologic polymorphism of HIV-1 samples obtained at beginning of AIDS epidemic in Brazil was evident. Similar to that described for HIV-1 in other regions of the world (Couto-Fernandez e cols., 1992). Subsequently, to better know the genomic structure of this and other isolates, we sequenced a 860-base pair envelope fragment including V3, V4, V5, and the beginning of gp41 of six Brazilian HIV-1 strains, isolated between 1987 and 1989. The phylogenetic analysis classified all Brazilian samples as genotype B, with interhost distances between 5.9 and 13,1%. The amino acid sequence analysis of the V3 loops revealed that three strains contained the North American/European GPGR motif at the top of the loop whereas in the other three strains proline (P) was substituted by tryptophan (W), methionine (M), or phenylalanine (F), respectively. The antigenic diversity was analyzed through the serological reactivity of 114 sera of HIV-1 infected patients from Rio de Janeiro (1990/1992), against subtype-specific HIV-1 synthetic peptides. Sixty-nine sera (60.5%) reacted with peptides belonging to genotype B and 15,8% had binding antibodies to the Bra-cons (GWG) peptide. A high number of sera (37,7%) had no antibodies to any of the V3 peptides tested.

To better understand the spectrum of HIV-1 diversity in three potential HIV vaccine sites in Brazil, was established the Brazilian Network for HIV isolation and Characterization for a systematic surveillance of HIV variability in different geographic regions.

These studies were first performed in HIV-1 samples obtained from patients from Rio de Janeiro (document 2) and, subsequently more detailed analysis of isolates from three big Brazilian cities (São Paulo, Rio de Janeiro and Minas Gerais), revealed the presence of three genetic subtypes of HIV-1 identified by HMA: B (in 82,9% of the samples), F (14,3%) and C (2,9%) [document 3]. The HIV-1 B'' variant was identified in 45% of subtype B samples. Phylogenetic analysis based on the C2V3/*env* DNA sequence from all 25 specimens examined was 100% concordant with the heteroduplex mobility assay -HMA results. No significant association was found between HIV-1 subtypes and the mode of transmission or biological properties of the HIV-1 isolates. Consistent with previous results, no relationship between viral subtype and peptide ELISA seroreactivity or neutralization was evidenced.

To expand the analysis to regions not belonging to the southeast Brazilian region, we investigated the distribution of HIV-1 genetic subtypes in different populations from Salvador – Bahia (document 4), where the second major concentration of AIDS cases from the northeast Brazil is found nowadays. Blood samples from HIV-1 seropositive injecting drug users (UDIs) and individuals infected sexually were analyzed using HMA. In the IDU group, 89,5% were classified as subtype B, 3% as subtype F, and 7,5% showed a B/F HMA

profile. In the sexual transmission (ST) group, 95% were identified as B subtype, 3,4% showed a B/F profile, and 1,6% a B/C/E HMA profile. All Brazilian samples that showed multiple reactivities in HMA analysis clustered on sequencing with North American/European HIV-1 B subtype isolates in the phylogenetic analysis, whereas the F subtypes clustered with F Brazilian HIV-1 isolates. Serologic reactivities of IDU's sera were examined using a panel of synthetic V3 loop peptides representative of the different HIV-1 subtypes. A high level of cross-reactivity was observed against the different peptides, not permitting the serologic HIV-1 typing of the genetic subtypes circulating in Brazil, even the B'' variant. No difference in the serologic reactivity between F and B subtype plasma could be observed. In this study, no significant association was found between HIV-1 subtypes and the mode of transmission.

For the coming decades the AIDS Program of the United Nations (UNAIDS, 1999) estimates that non-B subtypes of HIV-1 will be responsible for the majority of new AIDS cases in developing countries. In this context, we genetically characterized a novel HIV-1 subtype D strain recently identified in Rio de Janeiro, Brazil. The nucleotide sequence of the Brazilian subtype D clearly grouped with African HIV-1 viruses from the same subtype (document 5). The cysteine residues were relatively well conserved, new glycosilation sites and a big insertion was detected in the V1/V2 envelope region. However, the V3 displayed the characteristic GPGQ motif in the top. No recombinant events were observed in the viral envelope and accessory genes. However, the 5' region of the *nef* gene appears to be closer to subtype B sequences.

In conclusion, in order to evaluate the molecular diversity in the envelope V3 region of the Brazilian HIV-1 strains included in this study, we analyzed the patterns of amino acid substitutions of NSI-like and SI-like isolate sequences to verify the involvement of basic amino acid substitutions, as well as the distribution of charges in this region, as predictor of viral phenotype/tropism (document 6). Apparently, the V3 region diversity was not implied in significant changes in its spatial structure. Although no significant differences in the total charges, isoelectric points (pI) and percentages of basic amino acids in the V3 region of Brazilian strains, a higher concentration of positive charges in T-lymphotropic syncytium inducing isolates, could be detected. No correlation was observed between the parameters analyzed and HIV-1 genetic subtype, biologic phenotype or geographic distribution

## INTRODUÇÃO

A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, SIDA (ou, em inglês, AIDS), foi reconhecida como uma nova entidade clínica em 1981, a partir da identificação nos Estados Unidos da América (EUA) de um grande número de casos de Sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis carinii* acometendo, principalmente, homossexuais/bissexuais masculinos jovens, previamente saudáveis e sem uma causa aparente para tal quadro clínico (Gottlieb, e cols., 1981; Masur e cols., 1981). A maioria dos pacientes apresentava infecções graves causadas por agentes oportunistas e uma profunda depressão da resposta proliferativa de linfócitos T à estimulação por antígenos ou mitógenos (CDC, 1982; revisado por Andreolli e cols., 1993).

A AIDS se caracteriza por um importante quadro de imunodeficiência, acompanhado de um amplo espectro de manifestações clínicas, como infecções oportunistas, vários tipos de câncer e degeneração do sistema nervoso central (Rutherford e cols., 1990). A evolução do quadro clínico da AIDS está frequentemente associada ao colapso do sistema imunológico, frequentemente, levando o indivíduo infectado à morte. Entretanto, com a recente introdução de terapias antiretrovirais combinadas, está havendo uma tendência de mudança da história natural da infecção em alguns países, como por exemplo, o Brasil, onde já existe uma queda sensível nos índices de morbidade e mortalidade (Boletim Epidemiológico AIDS, Ministério da Saúde, ano XII n<sup>o</sup>03, agosto 1999).



A epidemia de AIDS tem se expandido rapidamente por todas as regiões do mundo. Aproximadamente, 50 milhões de pessoas se infectaram desde o começo da epidemia com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Até novembro de 1999, o Programa Conjunto de AIDS das Nações Unidas (UNAIDS/ONUSIDA) registrou 33,5 milhões casos de AIDS em todo o mundo, com mais de 16 milhões de mortes. Estima-se que aproximadamente 16 mil pessoas se infectam, diariamente em todo o mundo (UNAIDS, Relatório Epidemiológico, novembro 1999). A transmissão heterossexual atualmente é responsável pelo maior número de novos casos no mundo, e a incidência entre mulheres na idade reprodutiva vem aumentando progressivamente desde o início da epidemia (UNAIDS, 1999). Apesar do esforço integrado de diferentes setores da comunidade médico-científica, esta infecção continua representando um grave problema de Saúde Pública, principalmente para países em desenvolvimento, onde, somente no Brasil, o Ministério da Saúde registrou até agosto de 1999, 170.073 casos de AIDS, sendo 41.052 destes casos em mulheres (24,1%) [Boletim Epidemiológico AIDS, Ministério da Saúde, ano XII nº03, agosto1999].

### **O agente etiológico**

O primeiro lentivírus humano foi isolado em 1983, dois anos depois da descrição dos primeiros casos de AIDS pelo grupo de Luc Montagnier do Instituto Pasteur de Paris, França (Barré-Sinoussi e cols., 1983). Este vírus, isolado a partir da cultura de células de linfonodo de um paciente apresentando síndrome de linfadenopatia persistente (SLP), recebeu a denominação de LAV ("lymphadenopathy associated virus"). Logo em seguida, outros dois grupos isolaram um retrovirus que foi denominado, respectivamente, HTLV-III, de "human T-lymphotropic virus type III" (Popovic e cols., 1984; Gallo e cols., 1984),

devido à sua semelhança com vírus do grupo dos HTLV, e ARV, de "AIDS related virus" (Levy e cols., 1984).

A análise genética destes três vírus mostrou tratar-se na realidade de variantes do mesmo retrovírus (Alizon e cols., 1984; Wain-Robson e cols., 1985; Ratner e cols., 1985). No entanto, esta classificação como membro do grupo dos HTLVs passou a ser controversa, principalmente em função da observação do declínio do número de linfócitos TCD4+ nos pacientes com AIDS (Stahl e cols., 1982), contrariando dados sobre a imunopatogenia da infecção pelos HTLVs. Finalmente, de acordo com as características morfoestruturais e biológicas obtidas de diferentes isolados virais (Gelderblom e cols., 1987), estes vírus foram reconhecidos como membro do subgrupo dos lentivírus, os quais estão associados a infecções persistentes com longos períodos de evolução clínica. A denominação HIV ("human immunodeficiency virus"), para o vírus da imunodeficiência humana, foi então adotada para a classificação destes vírus (Coffin e cols., 1986).

Em 1986, Clavel e colaboradores isolaram de um paciente com AIDS um outro retrovírus morfológicamente semelhante ao HIV, compartilhando o mesmo tropismo por linfócitos CD4+. Este novo vírus, distinto sorologicamente do HIV-1, foi denominado HIV-2. A análise da sua estrutura genética, mostrou uma organização genômica muito similar ao HIV-1. A homologia na seqüência de nucleotídeos destes dois vírus é de aproximadamente 50% (Clavel e cols., 1986). Atualmente, o HIV-1 é o principal responsável pela pandemia de AIDS, estando os casos de infecção pelo HIV-2 restritos, principalmente, a alguns países da África central e oriental (Clavel e cols., 1986; Romieu e cols., 1990). Apesar de existirem registros isolados da presença do HIV-2 em outras

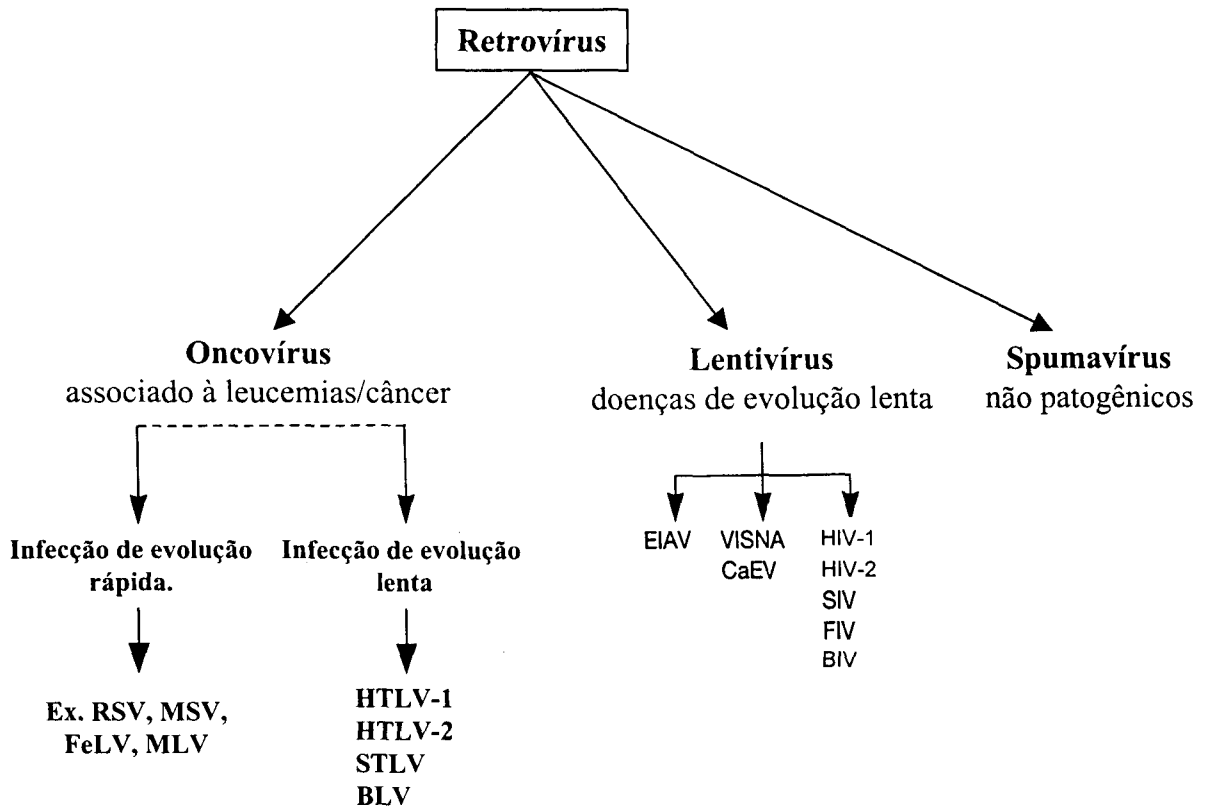
regiões do mundo, como, Estados Unidos e Europa (Sullivan e cols., 1998; Cazein e cols., 1996), Ásia (Rübsamen-Waigmann e cols., 1991), Brasil (Pianiazek e cols., 1991), e mais recentemente, na Argentina (Libonatti e cols., 1998).

Aparentemente, estes dois vírus possuem patogenicidade diferenciadas, pois, embora ambos tipos virais induzam a progressão para a AIDS, o tempo necessário para o aparecimento dos primeiros sintomas na infecção pelo HIV-2 é sensivelmente mais longo que para o HIV-1 (Marlink e cols., 1994).

### **Classificação dos Retrovírus**

A família dos retrovírus, que compreende toda partícula viral com genoma RNA e que possua a enzima transcriptase reversa, se apresenta dividida em três subfamílias (*oncovirinae*, *spumavirinae* e *lentivirinae*), classificadas segundo seu poder patogênico e também segundo parâmetros filogenéticos (figura 1).

- A subfamília *oncovirinae* compreende vírus amplamente distribuídos em numerosos grupos de espécies animais, se caracterizando por um acentuado poder oncogênico ou pela capacidade de induzir transformação das células que eles infectam. Os HTLV-I e HTLV-II são os únicos oncovírus humanos identificados até o momento (Poiesz e cols., 1980). Estes foram identificados ao fim dos anos setenta entre pacientes apresentando leucemia T ou linfoma cutâneo (HTLV-I) e, posteriormente, a partir de células brancas de um paciente apresentando leucemia de células pilosas do tipo T (HTLV-II) [Kalyanaraman e cols., 1982; Gallo e cols 1986].



RSV - vírus de Sarcoma de Rous

MSV - vírus sarcomatígeno murino

FeLV - vírus da leucemia felina

MLV - vírus da leucemia murina

HTLV-1 - vírus linfotrópico por células T humanas tipo 1

HTLV-2 - vírus linfotrópico por células T humanas tipo 2

BLV - vírus de leucemia bovina

EIAV - vírus da anemia infecciosa equina

CaEV - vírus da artrite e encefalite de ovinos

Visna - vírus da artrite de ovinos

SIV - vírus da imunodeficiência símia

FIV - vírus da imunodeficiência felina

BIV - vírus da imunodeficiência bovina

HIV-1 - vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2 - vírus da imunodeficiência humana tipo 2

Figura 1. Classificação de retrovírus (adaptado de SIDA edition 1998 - Virologie fondamentale de l'infection VIH - doin éditeurs - Paris, França)

Em 1983, um vírus similar, denominado STLV ("Simian T-cell leukemia virus"), foi isolado entre várias espécies de macacos da Ásia. A análise genômica destes vírus mostrou que eles apresentam estreita relação filogenética com o HTLV-I (Coffin e cols., 1992).

- A subfamília dos *spumavirinae* compreende o grupo dos "foamy" vírus, não estando até o momento associados a nenhuma patologia conhecida. Entretanto, estes vírus apresentam efeito citopático característico em culturas celulares.

- A subfamília *lentivirinae* compreende o grupo de vírus que se caracteriza, principalmente, por uma acentuada variabilidade genética e pela capacidade de indução de sincício *in vitro*. Entre os animais, foram identificados o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV-"equine infectious anemia virus"), o "Visna virus", o vírus Maedi e o vírus responsável por encefalites e artrites em caprinos (CEAV). Mais recentemente, foram identificados o BIV ("bovine immunodeficiency virus") e o vírus da imunodeficiência felina (FIV-"feline immunodeficiency virus"), responsáveis por imunodeficiências, respectivamente, em bovinos e gatos domésticos (Olmsted e cols., 1989). Em 1994, um novo lentivírus próximo ao FIV foi isolado em leões Africanos (Brown e cols., 1994).

Entre os seres humanos, os HIV ("human immunodeficiency virus") são os agentes responsáveis pela AIDS. Até o momento, dois tipos virais foram identificados: o HIV-1 e o HIV-2. Entre os primatas, vírus próximos filogeneticamente aos HIV, denominados SIV ("simian immunodeficiency virus") foram isolados, de diferentes espécies (macaco Rhesus, macaco verde, mangabeis, mandrís e chimpanzés (Hayami e cols., 1994).

## Classificação filogenética dos lentivírus

A análise comparativa das seqüências de nucleotídeos entre os diferentes lentivírus permitiu o estabelecimento de sua classificação filogenética (Sharp e cols., 1994). Todos os lentivírus humanos (HIV) e de primatas são mais próximos entre si que entre os outros lentivírus de mamíferos, como os vírus de felinos e ovinos (Myers, 1997). A análise filogenética das seqüências conhecidas dos diferentes lentivírus de primatas permite separá-los em 5 grupos (figura 2). Os grupos 3, 4 e 5 contém respectivamente vírus específicos de três espécies de símios, que são: macaco verde africano (“African green monkey”- agm); mandril (mnd) e macaco “sykes” (syk) [revisado por Hayami e cols., 1994]. O primeiro grupo abrange também os vírus encontrados respectivamente entre humanos (HIV) e chimpanzés (SIVcpz). O grupo 2 compreende os vírus humanos do tipo 2 (HIV-2) e os vírus SIV que infectam macacos (*Macaca mulatta* - SIVmac) e os “sooty mangabey” (SIVsm) [Hirsch e cols., 1989; Gao e cols., 1992]. De fato, os altos níveis de homologia das seqüências genômicas entre os dois vírus (HIV-2 e SIVsm) parecem evidenciar a origem do HIV-2 (Chen e cols., 1997).

Os vírus mais próximos geneticamente do HIV-1 são os vírus encontrados entre os chimpanzés (SIVcpz). Pelo menos três isolados virais de SIVcpz foram identificados causando infecção ativa em animais selvagens capturados no Gabão (SIVcpzGAB1 e SIVcpzGAB2) [Peeters e cols., 1989 ] e em um animal exportado do Zaire para a Bélgica (SIVcpzANT) [Peeters e cols., 1992]. A análise filogenética destes três isolados virais (Huet e cols., 1990; Janssens e cols., 1994a; Van den Haesevelde e cols., 1996), mostrou uma acentuada diversidade genética do isolado SIVcpzANT estando os dois isolados do Gabão mais relacionados filogeneticamente (Myers, 1997).

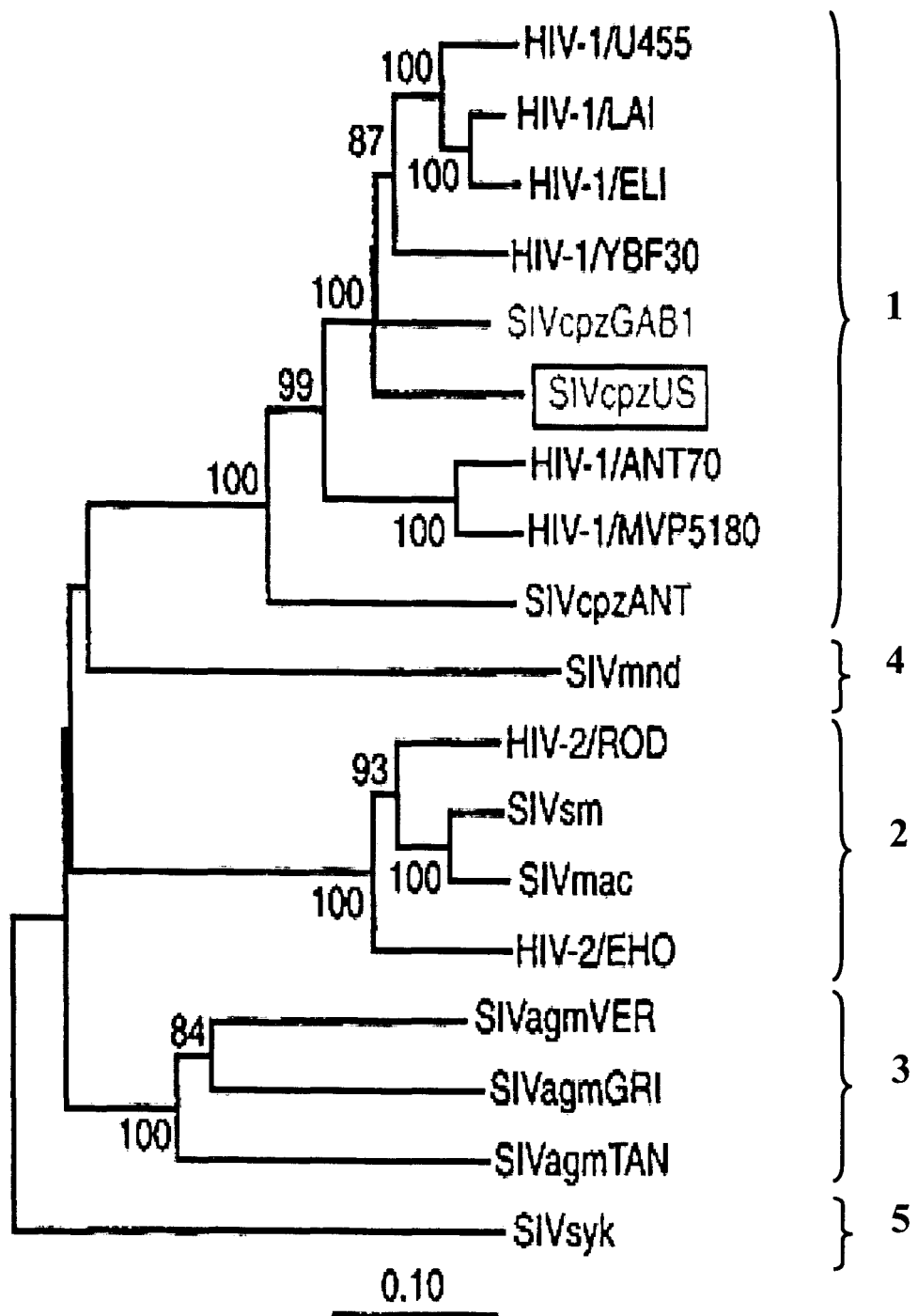


Figura 2. Árvore filogenética de lentivírus de primatas (adaptado de Gao e cols., 1999)

Mais recentemente, o grupo de Hahn e colaboradores (Gao e cols., 1999) isolaram de uma subespécie de chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) capturado na África e exportado para os EUA, um novo vírus (SIVcpzUS), que tudo indica ser o ancestral do HIV-1 em primatas, caracterizando definitivamente esta infecção como uma zoonose transmitida inter-espécies (Gao e cols., 1999). Comparando a posição filogenética deste vírus com os demais isolados de SIVcpz (figura 2), foi observado uma relação filogenética mais estreita entre o SIVcpzGAB1 e SIVcpzGAB2, do que com o SIVcpzANT (Gao e cols., 1999).

### **Morfologia e estrutura do HIV-1**

O HIV-1 se apresenta à microscopia eletrônica como uma partícula esférica de aproximadamente 100 nm de diâmetro, contendo um nucleocapsídeo denso e excêntrico sob a forma de bastão (figura 3). Conforme os demais retrovírus, o HIV-1 é um vírus envelopado, seu nucleocapsídeo é constituído de proteínas internas e nele está contido seu material genômico (RNA), a enzima necessária à replicação, a transcriptase reversa, e duas outras enzimas intimamente relacionadas ao RNA viral necessárias a replicação do HIV (integrase e polimerase) [figura 4].

A porção mais externa do vírus, o envelope, é formado por uma dupla camada fosfolipídica de origem celular proveniente da membrana plasmática da célula hospedeira, a partir do brotamento da partícula viral. No envelope estão inseridas as duas glicoproteínas virais de superfície: a gp120, que estabelece a ligação com o receptor CD4, bem como aos co-receptores, participando respectivamente nos processos de ligação e entrada do vírus na célula hospedeira (Freed e cols., 1994; D'Souza e cols., 1996).



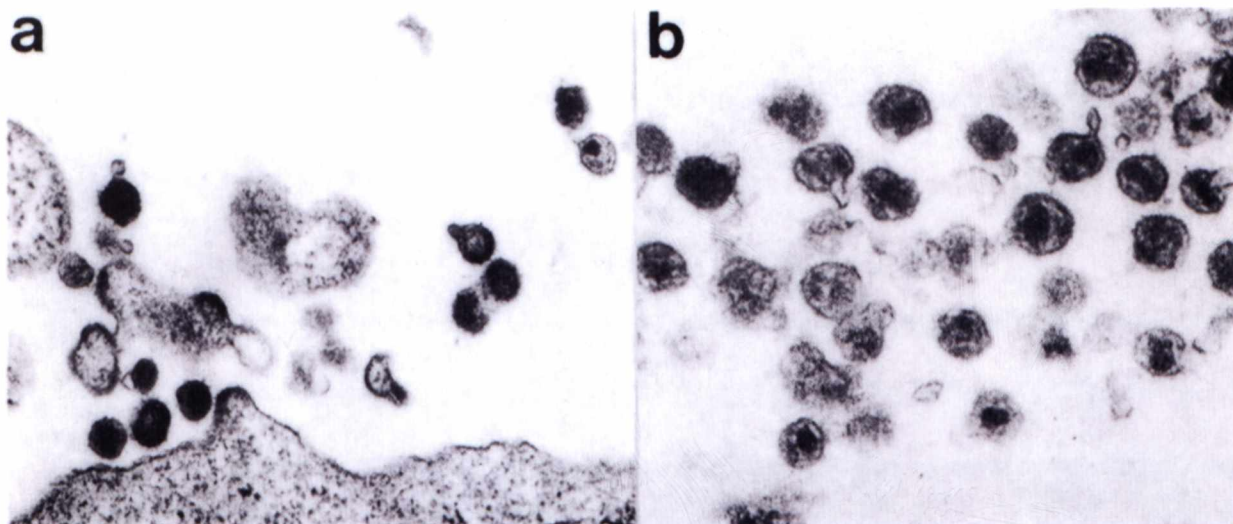


Figura 3. Fotografia em microscopia eletrônica da primeira amostra de HIV-1 isolada no Brasil (retirado de Galvão-Castro e cols., 1987). a) partículas virais em brotamento a partir de culturas de células H9, aumento 49.200 X; b) partículas virais maduras, aumento 72.800 X.

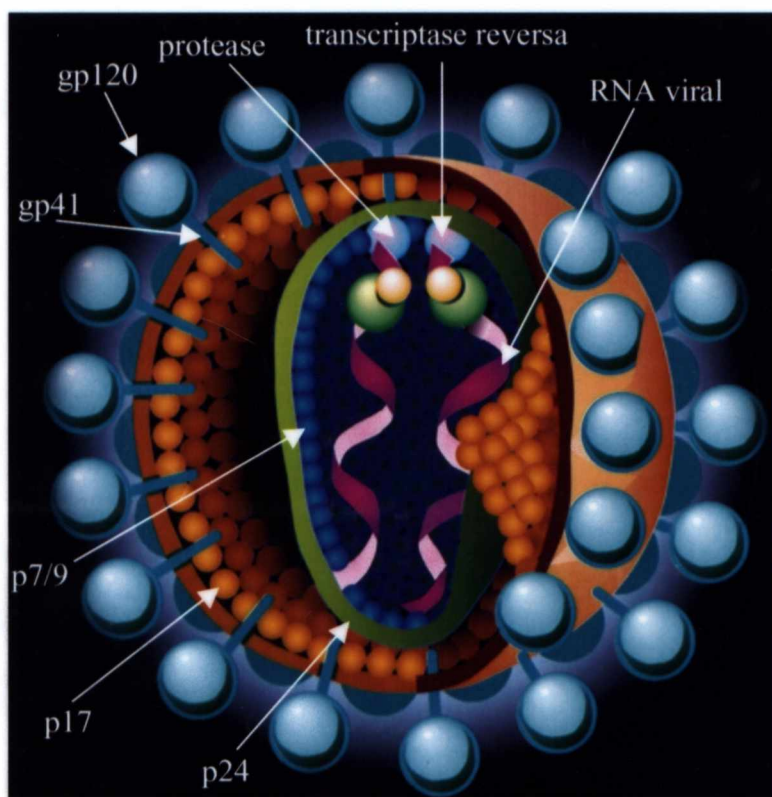


Figura 4. Representação esquemática do HIV-1 (adaptado de Science & Vie - Dossiers SIDA, 1994).

A proteína trans-membranar gp41 é responsável pela fusão da membrana viral à membrana da célula hospedeira no momento da entrada do vírus. A região C-terminal desta proteína está voltada para o interior da partícula viral, interagindo com a proteína da matriz, conferindo estabilidade à estrutura do vírion.

Intimamente associadas ao material genômico do HIV-1, organizam-se monômeros de duas proteínas do nucleocapsídeo: as proteínas p7 e p9. Na proteína de 7Kd existem dois motivos estruturais, em cuja composição de aminoácidos encontramos seqüências características do tipo "zinc finger", conferindo a esta proteína a capacidade de interagir com os ácidos nucleicos. O segundo motivo é igualmente necessário à estabilidade das partículas virais infecciosas (Dannull e cols., 1994; Mizuno e cols., 1996). Associadas a este complexo ribo-protéico p7/p9-RNA encontramos as enzimas virais:

- A transcriptase reversa, com 66Kd, faz a retrotranscrição do RNA viral em DNA dupla fita. Esta enzima apresenta uma subunidade de 55Kd com atividade DNA/RNA polimerase dependente e outra subunidade de 11Kd com atividade de ribonuclease H associada (Barber e cols., 1990).

- A integrase ou endonuclease, com 32Kb, é responsável por três funções catalizantes da integração do DNA proviral ao genoma da célula hospedeira: clivagem do DNA proviral, clivagem do DNA celular e sua posterior integração do DNA proviral clivado ao sítio de integração celular (Bushman & Craige, 1991; Halsentine e cols., 1992).

- A protease, com 11 Kd, é a enzima responsável pelo processamento dos diferentes precursores protéicos nas etapas finais do ciclo replicativo do HIV-1. A protease é igualmente necessária para uma melhor eficácia na produção de vírions (Kaplan e cols., 1994).

Envolvendo este complexo ribonucleoprotéico, encontramos uma proteína de 24Kd (p24), responsável pela formação do capsídeo que constitui o *core* cilíndrico da partícula viral madura (Liu e cols., 1995).

No espaço constituído entre o *core* e o envelope viral encontramos uma proteína de 17Kd (p17), miristilada na sua porção NH<sub>2</sub>-terminal, denominada proteína da matriz. A adição do resíduo de ácido mirístico confere à proteína a capacidade de se associar à face interna do envelope viral estabilizando a estrutura do vírion como um todo (Green, 1991; Bugelski e cols., 1995). Esta proteína é igualmente importante durante o processo de brotamento da partícula viral, permitindo a incorporação seletiva das proteínas do envelope à membrana plasmática da célula hospedeira (Dorfman e cols., 1994).

### **Organização genômica**

O genoma do HIV é constituído por duas fitas de RNA cadeia simples de polaridade positiva contendo aproximadamente 9.500 nucleotídeos (10Kb), que apresenta associada à sua extremidade 5' uma molécula de tRNA-lys. Como todos os retrovirus, o HIV possui três genes estruturais: *gag* (grupo antígeno), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). Estes vírus possuem ainda seis outros genes acessórios e regulatórios na sua estrutura genômica,

sendo cinco (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef*) comuns aos dois tipos virais e, *vpu* e *vpx* para o HIV-1 e HIV-2, respectivamente (figura 5a). Estes genes suplementares são, na sua grande maioria, implicados em fenômenos de regulação da expressão de proteínas virais e, conseqüentemente, nos níveis de replicação viral.

O genoma do HIV é flanqueado por duas regiões contendo seqüências repetitivas, denominadas longos terminais de repetição ("LTR-long terminal repeat"). Nas LTRs estão localizadas as principais seqüências promotoras para a transcrição dos genes virais (figura 5b). A região LTR-5', composta da região repetitiva R e região U5, contém numerosos elementos de regulação, sítios para fixação de fatores transcricionais celulares e também a região TAR ("trans-activation-responsive region"), alvo da proteína transativadora viral Tat. A região LTR localizada na extremidade 3' é composta igualmente pela região repetitiva R e a região U3, onde existem elementos de terminação e de poliadenilação para os RNA mensageiros (Wain-Hobson e cols., 1985).

### **Genes estruturais**

O gene *gag* (grupo antigênico) é codificado por um mRNA que é traduzido sob a forma de um precursor de 55Kd. Este precursor é inteiramente clivado pela protease viral para gerar as proteínas maduras constitutivas: proteínas da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo viral (p7/9).

O gene *pol* codifica uma poliproteína p160 *gag/pol* que será posteriormente clivada gerando as proteínas enzimas virais: a protease (p11), a transcriptase reversa (p66) e a integrase (p32).

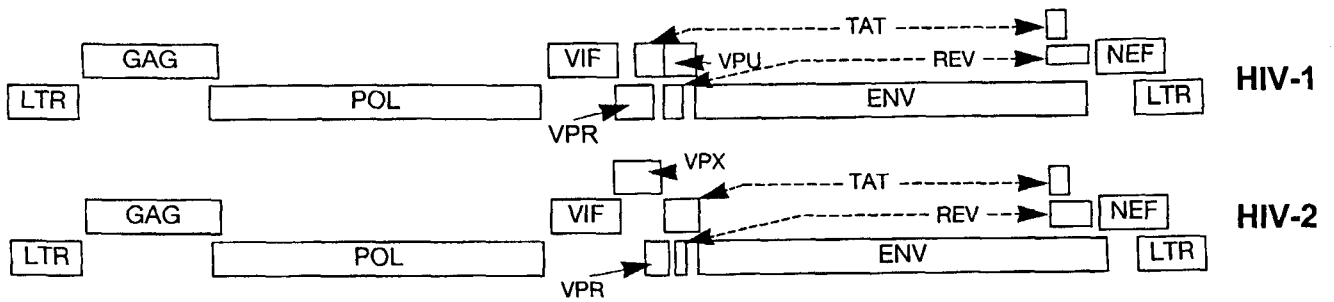


Figura 5a. Representação esquemática da organização genômica do HIV-1 e HIV-2 (adaptado de Fields e cols., 1991).

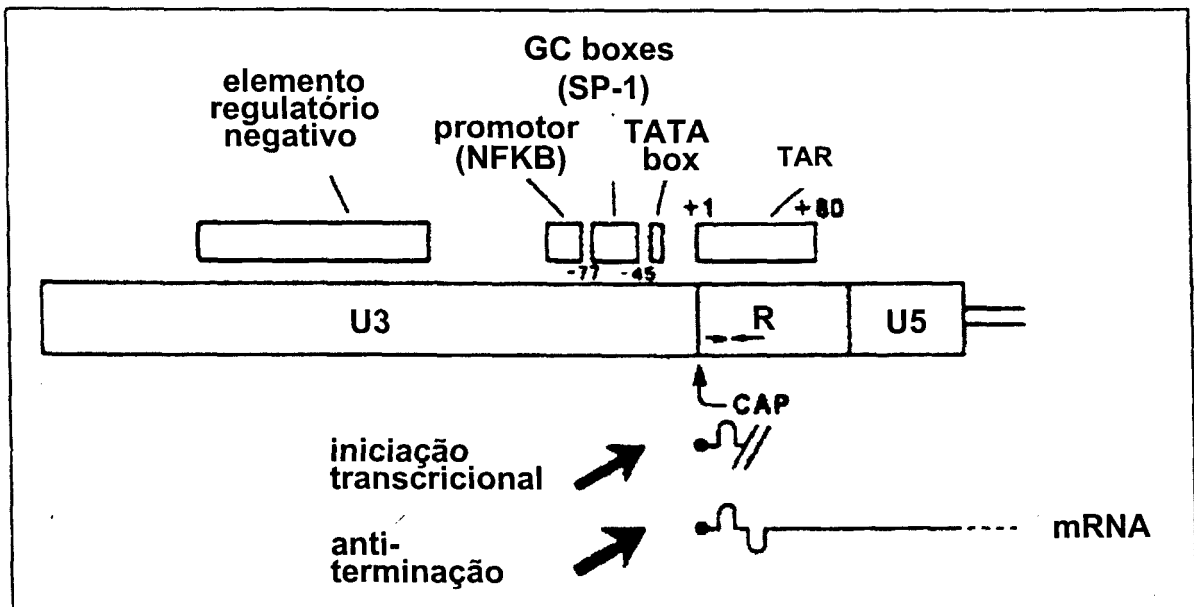


Figura 5b. Representação esquemática da LTR do HIV-1 (adaptado de Fields e cols., 1991).

O gene correspondente ao envelope codifica inicialmente uma proteína de 85Kd, traduzida de mRNAs que sofreram apenas um evento de "splicing". Este precursor sofrerá glicosilações progressivas, indispensáveis à aquisição de sua estrutura funcional tridimensional, originando um precursor da proteína do envelope, de 160Kd (Fenouillet, 1993). Uma clivagem proteolítica pós-transcricional permite a liberação das proteínas do envelope externo, a glicoproteína gp120 e a glicoproteína transmembranar gp41, ligadas não-covalentemente (Kido e cols., 1993). Estas proteínas serão posteriormente expressas na superfície externa da célula hospedeira e incorporadas às novas partículas virais no momento do brotamento viral.

Dados mais recentes demonstraram que as glicoproteínas do envelope do HIV-1 se agrupam sob a forma de um complexo trimérico, cuja conformação é de fundamental importância para a entrada do vírus na célula alvo (Wyatt e cols., 1998). A ligação da gp120 ao receptor de alta afinidade CD4, acarreta mudanças conformacionais da glicoproteína viral (Wyatt e cols., 1995), que irá permitir o subsequente reconhecimento da gp120 pelos co-receptor celulares específicos. Este processo de interações sequenciais da gp120 com os receptores e co-receptores, promove a fusão das membranas celulares e viral, cujo processo é mediado pelo peptídeo de fusão N-terminal da gp41 do HIV-1 (Chan e cols., 1997).

A análise da estrutura primária da proteína gp120 mostrou uma alternância de cinco regiões conservadas (C1 a C5) e cinco regiões variáveis (V1 a V5) [Willey e cols., 1986]. As propriedades funcionais da gp120 resultantes da integração entre as diferentes regiões da sua estrutura primária, necessitam de um correto arranjo tridimensional das moléculas

do envelope (Stamatatos e cols., 1993). As regiões de alto nível de variação de seqüências, ou regiões hipervariáveis, e as regiões mais conservadas, com menor grau de variação, encontram-se distribuídas da seguinte forma, a partir da extremidade 5': C1-V1-V2-C2-V3-C3-V4-C4-V5-C5 (Willey e cols., 1986; Kwong e cols., 1998).

Entre as regiões variáveis, a região V3 é certamente a mais importante e suas funções serão detalhadas mais adiante. As regiões V1 e V2 são importantes na manutenção da estrutura conformacional da proteína do envelope, assim como as regiões V4 e V5 (Wyatt e cols., 1998). A região V2, assim como a V3, intervêm no processo de formação de sincício, participando portanto, dos diferentes fenômenos envolvidos no processo de fusão do envelope viral com a membrana celular (Groenink e cols., 1993). Por outro lado, o enquadramento correto da região V4 é determinante para o processo de clivagem, necessário à maturação do precursor gp160 (Wyatt e cols., 1993).

Entre as regiões conservadas a mais importante é o sítio de ligação à molécula CD4, descontínuo, e intermediado pelas regiões C2, C3, C4 e C5 (Olshevsky e cols., 1990). Estudos de mutagênese dirigida da região C2 sugerem sua importância, depois de sua integração com as demais regiões do envelope, na capacidade de induzir sincício (Stamatatos e cols., 1993). Mais recentemente, foi mostrado que substituições básicas na região C4 estariam relacionados igualmente no processo de indução de sincício (Milich e cols., 1997).

## Genes acessórios

O gene *vif* ("virion infectivity factor") codifica uma proteína de 23Kd essencial ao poder infeccioso do vírus (Strebel e cols., 1987; Fisher e cols., 1987). Esta proteína intervêm precocemente durante a morfogênese viral, facilitando o transporte de proteínas virais do núcleo à rede de microfilamentos celular (Liu e cols., 1995).

O gene *vpu* codifica uma fosfoproteína de 15Kd frequentemente associada a membrana celular (Schubert e cols., 1994). A proteína Vpu intervêm durante o processo de brotamento de vírions (Bour e cols., 1995) e na incorporação da enzima viral integrase ao ribonucleocapsídeo (Gibbs e cols., 1994).

O gene *vpr*, presente unicamente no HIV-1, codifica uma proteína de 16Kd. As funções desta proteína ainda não foram claramente estabelecidas, mas ela parece ter um papel importante durante a evolução da infecção (Levy e cols., 1995). Dois domínios estruturais contendo resíduos de serina fosforilados, estão frequentemente associados as propriedades biológicas desta proteína durante a replicação do HIV-1 (Tiganos e cols., 1997; Iwatani e cols., 1997).

O gene *tat* codifica uma proteína de 14-16Kd que regula de maneira positiva os níveis de transativação dos genes virais e consequentemente os níveis de replicação. Esta proteína possui um domínio relacionado com sua localização a nível nuclear e dois domínios amino terminais relacionados à sua atividade transativadora. (Vaishnav & Wong-Staal, 1992).



A atividade da proteína Tat tem início quando ela se liga à região TAR, recém transcrita dos RNAs virais, estabelecendo interações com fatores celulares envolvidos na transcrição das cadeias de mRNA (Peterlin, 1995). A proteína Tat é capaz também de induzir apoptose de linfócitos CD4+ não infectados (Li e cols., 1995).

O gene *rev* codifica uma proteína de 19Kd que estabiliza a expressão dos complexos perfis de "splicing" dos mRNAs virais, permitindo assim, a tradução das proteínas estruturais Gag, Pol e Env (Emerman e cols., 1989).

O gene *nef* (de "negative factor") codifica uma proteína de regulação de 25-30Kd, mistirilada e fosforilada na sua porção N-terminal, cujo papel ainda é controverso. Inicialmente, descrita como reguladora negativa da replicação viral, (Cheng-Mayer e cols., 1989), estudos mais recentes mostram um efeito positivo da proteína Nef sobre a transcrição de genes virais (Miller e cols., 1994). Entre as funções da proteína Nef reconhecidamente com atividade *in vitro*, destacam-se, a regulação negativa da expressão de CD4 absorvidos por endocitose (Mariani & Sokwronski, 1993) e o aumento da infectividade das partículas virais livres (Spina e cols 1994; Miller e cols., 1994).

### **Ciclo replicativo do HIV**

A replicação do HIV no organismo tem lugar em numerosos tipos celulares: linfócitos CD4+, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans e células da microglia (sistema nervoso central) e, em diversos tecidos (órgãos linfóides, fígado e intestino) [Barker e cols., 1995].

As principais etapas do ciclo replicativo do HIV (figura 6) são comuns a todos os retrovirus (Barré-Sinoussi, 1996; Rothe e cols., 1996). Seu conhecimento e compreensão são atualmente de extrema importância, pois cada uma dessas etapas constitui um alvo potencial para a terapia anti-retroviral.

A primeira destas etapas corresponde ao reconhecimento da gp120 do HIV-1 por moléculas de HLA de classe II expressas na superfície celular, denominadas receptores e co-receptores. O receptor de alta afinidade do HIV-1 é a molécula CD4 (Dalglish e cols., 1984; Klatzman, e cols., 1984), sua ligação à gp120 não somente estabelece a adsorção da partícula viral à superfície celular, mas também resulta em uma reestruturação conformacional da gp120 (Sattentau & Moore, 1991; Trkola e cols., 1996; Kwong e cols., 1998). Estas mudanças estruturais parecem gerar um sitio para integração desta proteína com a molécula do co-receptor, levando à formação do complexo gp120-CD4-co-receptor (Wu e cols., 1996; Kwong e cols., 1998).

Até o momento seis diferentes co-receptores foram identificados (Cocchi e cols., 1995; D'Souza e cols., 1996). Trata-se de moléculas da família das proteínas transmembranares da classe G, cuja função habitual é o reconhecimento de fatores celulares solúveis, conhecidos como quimiocinas (Alkhatib e cols., 1996; Deng e cols., 1996, Feng e cols., 1996). Os níveis de produção destes fatores estão freqüentemente associados à inibição da replicação do HIV-1 *in vitro* (Cocchi et cols., 1996). Além disso, foi demonstrado mais recente, que determinado polimorfismo ao nível do co-receptor, está igualmente associado à inibição da replicação viral e progressão para AIDS (Hill & Littman, 1996; Cocchi e cols., 1996; Clapham & Weiss, 1997).

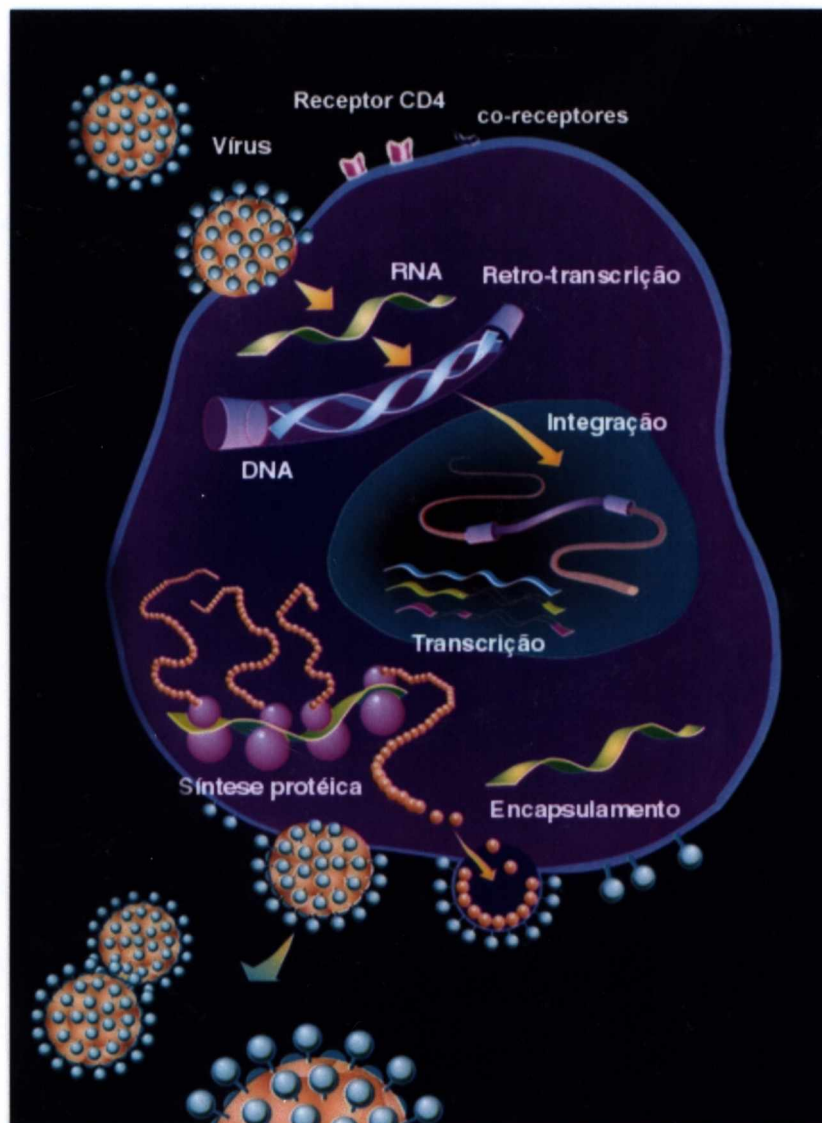
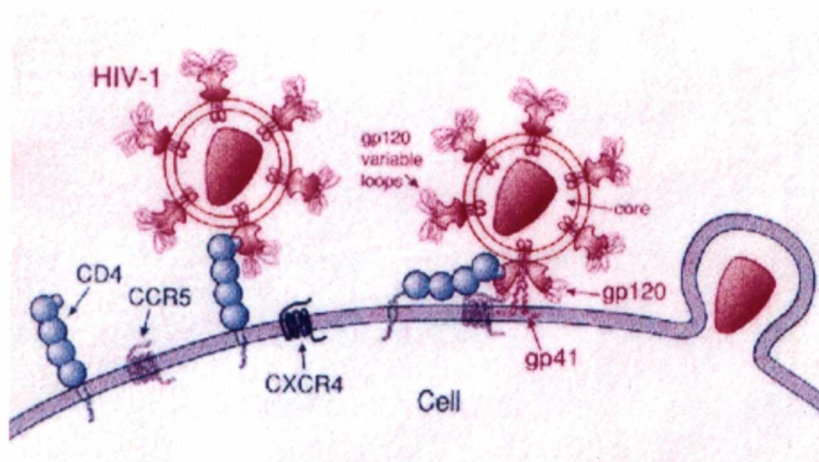


Figura 6. Ciclo de replicação do HIV-1 (adaptado de Science de la vie, 1994). Em detalhe na parte superior, representação esquemática da ligação da gp120 do HIV-1 com seu receptor celular e co-receptores (retirado e adaptado de <http://www.naid.nih.gov/daids.htm>).

Entre os co-receptores do HIV-1, temos a molécula CXCR4 (ou fusina) expressa na superfície de um grande número de células (Loetscher e cols., 1994) e reconhecida por vírus que se replicam em linhagens celulares T (vírus T-linfotrópico) e mostram a capacidade de induzir sincício (“syncytium inducer”- SI) [Doranz e cols., 1996; Feng e cols., 1996] [Figura 7a]. Uma outra molécula denominada CCR5, expressa principalmente por macrófagos, é utilizada como co-receptor pelos vírus monocitotrópicos, não indutores de sincício (“non-syncytium inducer”- NSI) [Figura 7b]. A maioria dos isolados primários SI utilizam ambas as moléculas co-receptoras e são tanto monocitotrópicos como linfotrópicos (Simmonds e cols., 1996). Uma minoria de tipos virais é capaz de utilizar outras moléculas desta classe de co-receptores de quimiocinas, como por exemplo CCR3 e CCR2b, mas com a participação efetiva das moléculas CCR5 ou CXCR4 (Smith e cols., 1997, Clapham, 1997).

A principal região da gp120 do HIV-1 envolvida nos eventos acima descritos, é a alça V3 (Cocchi e cols., 1996), cuja estrutura tem demonstrado ser a responsável pela determinação das principais características biológicas do vírus (Carrillo & Ratner, 1996). As implicações da ligação seletiva que determinados vírus possuem aos diferentes co-receptores, suas interações moleculares com a alça V3 do envelope, bem como, o impacto do “switch” do fenótipo viral na patogenia da infecção, serão discutidos mais detalhadamente a diante no documento nº 6 e, no item “diversidade da alça V3 e relação com o fenótipo viral”, na discussão deste estudo.

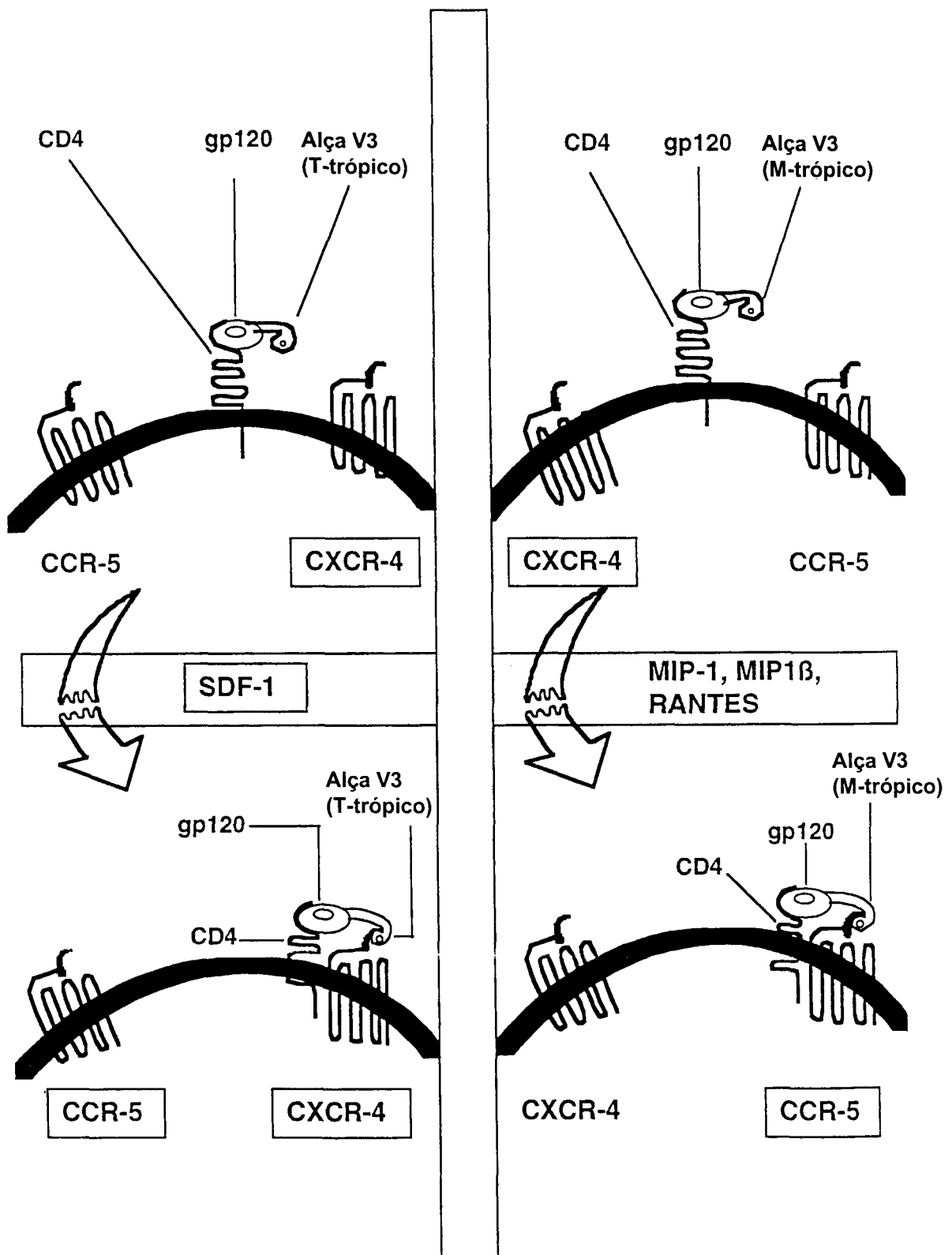


Figura 7. Representação esquemática da interação gp120 do HIV-1 com seu receptor celular CD4 e seus co-receptores. A) vírus T-Trópico, B) vírus M-Trópico (adaptado de SIDA Edition 1998 - doin éditeurs, Paris, França).

Outros mecanismos de entrada do vírus na célula hospedeira foram descritos, como a penetração do vírus por intermédio do receptor Fc das imunoglobulinas ou do receptor para o complemento sob a forma de um complexo vírus-anticorpo, ou ainda, por intermédio de glicolípídeos, notadamente a galactoceramida (Weiss, 1993; Levy, 1993).

Após o estabelecimento das interações CD4-gp120-co-receptor, a glicoproteína transmembranar gp41 sofre mudanças conformacionais que resultam na fusão da membrana viral à da célula hospedeira, promovendo assim a interiorização do capsídeo viral (Chan e cols., 1997). Quando o *core* viral alcança o citoplasma celular, a síntese da fita negativa de DNA já foi iniciada. Ao final deste processo, a fita dupla de DNA, juntamente com as demais enzimas virais, penetram no interior do núcleo, e o genoma viral é então integrado ao genoma da célula hospedeira. A reação de integração mediada pela integrase viral não é sítio específica, entretanto, as regiões da cromatina menos condensadas são os pontos preferenciais para a ocorrência desta reação (Coffin, 1992). Uma vez integrado ao genoma da célula, este DNA passará a ser referido com provírus e será então processado pela maquinaria celular como um gene constitutivo, sendo sua expressão diretamente comandada pelo ciclo celular (Reimann e cols., 1996).

As seqüências genômicas contidas nas regiões genômicas das LTRs contem sítios promotores para o início da atividade transcricional da RNA polimerase III. Os primeiros transcritos virais são formados a partir da transcrição das seqüências contidas nas regiões U3 e R da LTR 5' do HIV-1 (Garcia e cols., 1987). Estes produtos são processados por múltiplos eventos de "splicing" e, no citoplasma da célula hospedeira, estes transcritos serão utilizados para a tradução das primeiras proteínas reguladoras Tat, Nef e Rev

(Levy e cols., 1995). A eficiência do processo de transcrição somente é alcançada com o início da expressão da proteína Tat, que atua como fator transativador da expressão viral através de sua ligação direta à região TAR da extremidade 5' da LTR do HIV-1 (Sanchez-Pescador e cols., 1985) [Figura 5b]. A proteína Rev atua induzindo a expressão de mRNAs das proteínas estruturais do vírus, e a proteína Nef está relacionada com mecanismos ainda desconhecidos, à infectividade viral e produção de novos virions (Miller e cols., 1994). Estas proteínas serão fundamentais à replicação do HIV-1, preparando metabolicamente a célula infectada para as etapas finais de montagem e liberação das novas partículas virais (Coffm, 1992). Nesta etapa, a proteína do envelope (gp120/gp41) e as proteínas constituintes do capsídeo e matriz (GAG e GAG/POL) são sintetizadas e transportadas até a membrana da célula. Os transcritos que sofreram apenas um evento de "splicing", serão posteriormente traduzidos nas glicoproteínas do envelope e nas proteínas acessórias Vif, Vpu e Vpr (Vaishnav & Wong-Staal, 1992; Peterlin e cols., 1995). Todos os constituintes estruturais utilizados para a montagem das novas partículas virais estão relacionados, o vírion é considerado uma estrutura madura quando todas as proteínas virais foram processadas e o capsídeo assume sua estrutura cilíndrica característica (González e cols., 1993; Bugelski e cols., 1995), a partir do brotamento das novas partículas virais.

### **Variabilidade genética do HIV-1**

Uma característica marcante do HIV-1 é o acentuado grau de diversidade genética que existe entre os diferentes isolados virais (Korber e cols., 1998 - Los Alamos Database). O impacto desta diversidade em alguns aspectos da biologia do HIV, incluindo sua especificidade celular e tecidual (tropismo), na imunopatogenia da infecção e na

distribuição geográfica e temporal dos diferentes isolados virais tem sido alvo de ampla discussão.

A primeira descrição da heterogeneidade molecular do HIV foi baseada em hibridizações moleculares utilizando a técnica de "Southern blot" (Benn e cols., 1985; Johnson e cols., 1991). Posteriormente, a análise por microscopia eletrônica dos heteroduplexes formados a partir de dois vírus divergentes do HIV-1 (BH10 e HAT3), revelou substituições que apareciam primeiramente na região do envelope, (Sharp e cols., 1994). Subseqüentemente, a análise detalhada de suas estruturas genômicas confirmou que a diferença nas seqüências de nucleotídeos entre diferentes isolados virais, não eram distribuídas igualmente ao longo dos diferentes genes que compõe o HIV (Myers e cols., 1997).

Em geral, a região do envelope e a região *nef* são mais variáveis que as LTR, *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat* e *rev* do HIV-1. Não somente o grau de diversidade entre estes genes varia, mas também o tipo de substituição de nucleotídeos e mudanças de aminoácidos, são igualmente diferenciados. Enquanto que nos genes *gag* e *pol* a maioria das mudanças de nucleotídeos é decorrente de mutações pontuais, no gene do envelope, existe um conjunto de mudanças que envolvem deleções, inserções e duplicações na cadeia, além das mudanças pontuais (Nowak, 1990; Bobkov e cols., 1996).

Apesar da heterogenidade entre isolados do HIV ter sido bem caracterizada desde o começo da epidemia, a extensão desta variação e suas implicações na patogenia da infecção, tem sido mais apreciadas recentemente.



A terceira região hipervariável V3 da gp120 do envelope do HIV-1 tem sido considerada como de grande relevância imunológica (Ruche e cols., 1988; Javaherian e cols., 1989; Takahashi e cols., 1989, 1990; Clerici e cols., 1991), além de estar implicada em numerosas funções biológicas do vírus, em particular as propriedades citopatogênicas e replicativas (Chesebro e cols., 1991; Grimaila e cols., 1992; Milich e cols., 1993).

Analisando estes dados, podemos observar uma extrema plasticidade do genoma dos HIVs com respeito a suas propriedades genéticas e biológicas. O fato é que isolados de HIV-1 geralmente constituem uma mistura de vírus geneticamente distintos, podendo sua constituição ser afetada pela resposta imune do hospedeiro ou outros fatores celulares, ao longo da infecção, sugerindo que isolados de HIV estão rapidamente envolvidos na formação de quasiespécies (Lukashov e cols., 1995; Lukashov & Goudsmit, 1998).

### **Mecanismos de indução da diversidade**

Os fatores que contribuem para o surgimento da diversidade viral estão intimamente relacionados aos mecanismos de replicação viral e aos mecanismos de controle da infecção por parte do hospedeiro infectado (Ho e cols., 1995; Wei e cols., 1995).

Durante a replicação do HIV-1, duas etapas distintas deste processo são catalisadas por diferentes enzimas que não possuem capacidade de editoração das bases nucleotídicas incorporadas: a transcriptase reversa viral e a RNA polimerase II celular. Estudos *in vitro* estimam uma taxa de erro na incorporação de nucleotídeos para a RT da ordem

de  $1,7 \times 10^{-4}$  pares de base por ciclo replicativo, resultando em aproximadamente, uma mutação no genoma por ciclo (Roberts e cols., 1988; Nowak, 1990). Esta taxa de mutação é de 30 a 100 vezes maior que a da polimerase bacteriana (Drake e cols., 1991). Um outro fator importante, ausente no processo de transcrição pela RT viral, é a ausência de atividade de exonuclease 5'-3' durante o processo de síntese da fita dupla de DNA, pois a atividade de ribonuclease H presente na porção terminal da enzima, hidroliza a fita molde de RNA à medida que a fita de DNA é sintetizada. Esta falta de interação entre as duas cadeias priva a RT do mecanismo de correção ("mismatch"), promovendo a incorporação de erros durante a síntese do DNA viral (Coffin, 1992).

Estudos relacionados à cinética de replicação do HIV-1 mostraram uma produção diária da ordem de  $10^9$  novas partículas virais no indivíduo infectado, sendo a metade delas substituídas a cada dois dias pelo organismo (Ho e cols., 1995; Wei e cols., 1995). Levando-se em consideração os altos níveis de replicação viral e a elevada taxa de erro da RT, podemos estimar que o HIV-1 sofre, diariamente, várias mutações em diversos pontos do seu genoma. Portanto, podemos concluir que a associação destes dois eventos contribui com boa parte para a extensão desta variabilidade genética do HIV-1.

Outros fatores igualmente responsáveis para a produção desta diversidade, e talvez os mais importantes, são representados pela resposta imune do hospedeiro, pelas características biológicas virais e pela ativação aleatória dos diferentes clones celulares infectados pelo HIV-1 (Bonhoeffer e cols., 1995).

De fato, uma das estratégias adotadas pelo HIV-1 para persistir no organismo é o polimorfismo ao nível das proteínas estruturais, sobretudo a do envelope, principal alvo dos anticorpos neutralizantes e alvo importante da resposta T citotóxica. Este "escape" se dá fundamentalmente pela modificação da estrutura primária da proteína do envelope em resposta à pressão seletiva positiva, exercida pela resposta imune do hospedeiro (Sattentau e cols., 1991; Yoshida e cols., 1997). A intensidade desta pressão seletiva varia segundo o gene, sendo determinada pela relação entre a frequência de mutações sinônimas ( $K_s$ ) e mutações não sinônimas ( $K_a$ ) em cada gene (Kimura, 1980; Nei & Gojobori, 1986). A relação  $K_s/K_a$  é um indicador das pressões seletivas exercidas sobre uma seqüência genética codificadoras, sendo este índice elevado entre as proteínas funcionais e próximo de zero em casos de pressão seletiva neutra.

Realmente, a diversidade genética do HIV-1 pode ser observada ao longo de todo o genoma do vírus. Entretanto, algumas regiões experimentam taxas mais altas de variação, o que se reflete em uma evolução mais rápida destas seqüências, impostas provavelmente por pressões seletivas diferenciadas, à qual cada região do genoma está submetida (Zhang e cols., 1993). Assim, quando comparamos as seqüências protéicas de diferentes isolados, as regiões submetidas a contrações estruturais aparecem conservadas, contrariamente a outras regiões mais expostas, que favorecem mudanças estruturais. Esta oposição entre conservação funcional/variabilidade imunológica aparece dentro da sucessão de regiões conservadas e variáveis ao longo da proteína do envelope (Yoshida e cols., 1997).

Estudos prospectivos mostraram que as seqüências da alça V3 possuíam valores de  $K_s/K_a$  baixos nos primeiros 5 anos da infecção, mostrando posteriormente valores bastante

aumentados nos anos subsequentes, coincidindo com a queda do número de linfócitos CD4+. Estes valores mostram uma perfeita correlação com uma forte resposta imunitária nos primeiros anos da infecção (Zwart e cols., 1992; Boenhoeffer e cols., 1995).

O processo de geração da diversidade é contínuo, e está relacionado não somente às características replicativas da população viral mas, principalmente, através da relação desta população com o sistema imune do hospedeiro, até chegar o momento que o sistema imune não é mais capaz de controlar simultaneamente todas as variantes emergentes (Lukashov & Goudsmit, 1998). Este estágio, quando alcançado, acarretará um total colapso do sistema imune do hospedeiro infectado.

### **Epidemiologia molecular do HIV-1**

A caracterização genética de um número cada vez mais importante de isolados virais, permitiu evidenciar uma diversidade importante entre as diferentes amostras de HIV-1 (Korber e cols., 1998-Los Alamos Data Base). Até 1992, estes vírus eram classificados em função da sua origem geográfica em dois grupos: os isolados provenientes dos EUA e Europa e os isolados de origem Africana (Benn e cols., 1985). Posteriormente, as seqüências genômicas do gene *gag* e, principalmente, do envelope viral, passaram a ser utilizadas para a classificação dos diferentes isolados de HIV-1 (Myers e cols., 1992).

Atualmente, baseado na análise filogenética de diferentes isolados virais, foi possível classificar os HIV-1 em três grupos majoritários: o grupo M ("major"), que constitui a grande maioria dos vírus responsáveis pela epidemia de AIDS no mundo, agrupa pelo menos 14 tipos genéticos, subdivididos em 8 diferentes subtipos genéticos, designados A, B, C, D, F, G, H, J e K, além de cinco formas recombinantes (A/E, A/G, A/G/I, A/B e A/G/I/J), recentemente denominadas CRF ("Circulating Recombinant Forms") [Korber e cols., 1998 - Los Alamos Database]. O grupo O ("outlier"), contém um pequeno número de vírus divergentes originários de países do oeste Africano, principalmente na República dos Camarões e Costa do Marfim (Janssens e cols., 1994b; Petters e cols., 1997) e, mais recentemente, o grupo N, que contém dois vírus originários de pacientes Cameroneses e que apresentam uma composição genômica intermediária entre os grupos M e O (Simon e cols., 1998).

A análise filogenética estabelecida a partir das seqüências da região C2V3 do envelope de vírus do grupo M e O gera uma árvore com duplo braço (figura 8), indicando que estes grupos são bastante distintos entre si, mas que são certamente derivados de um ancestral comum. Outros três vírus mostrando seqüências próximas do HIV-1, foram isolados a partir de chimpanzés, sendo estes denominados SIVcpzgGAB (Huet e cols., 1990), SIVcpzANT (Van den Haesevelde e cols., 1996) e, mais recentemente SIVcpzUS (não incluído na figura 8). Entretanto, estes vírus não se agrupam em nenhum dos dois grupos e formam braços separados na árvore filogenética (figura 8).

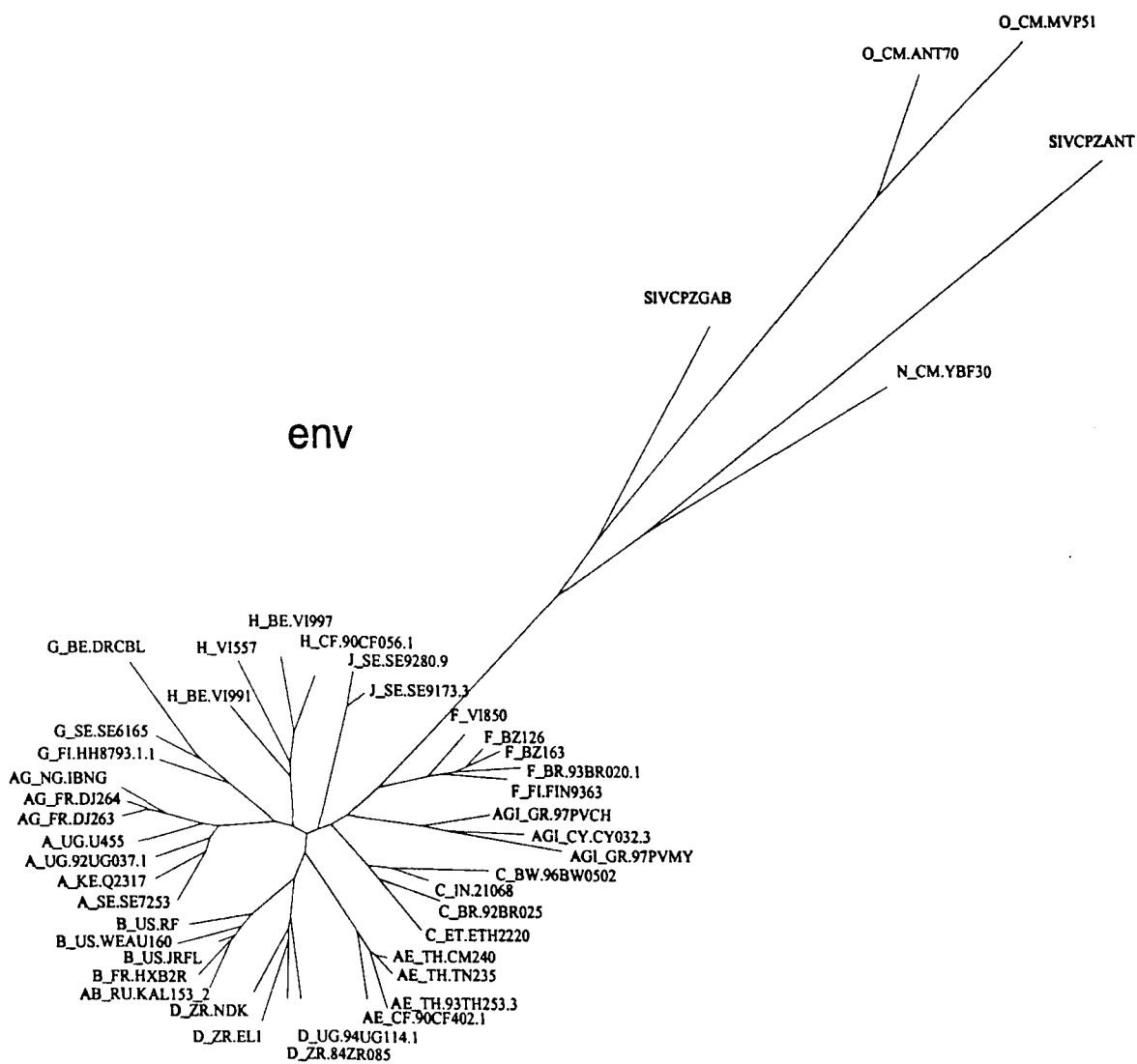


Figura 8. Árvore filogenética dos grupos M, N, O e principais formas recombinantes (CRFs) do HIV-1 e SIV, analisando seqüências do envelope viral (retirado de Korber e cols., 1998 - Los Alamos Database).

Até o momento os vírus do grupo O não possuem classificação em subtipos, já que isolados incluídos neste grupo mostram seqüências genômicas relativamente distantes uma das outras. Mais recentemente, um número considerável de amostras do grupo O foi caracterizada na França (Charneau e cols., 1994; Loussert-Ajaka e cols., 1995a), na Espanha (Soriano e cols., 1996) e EUA (Rayfield e cols., 1996; Sullivan e cols., 1998). A maioria das amostras foi proveniente de indivíduos com resultados negativo ou indeterminado nos testes sorológicos que não continham antígenos virais do grupo O. Estas observações resultaram na inclusão de antígenos deste grupo nos testes sorológicos atuais. O grau de diversidade nestes vírus indicam que este grupo é tão antigo como o grupo M, apesar de intrinsecamente ser mais variável (Loussert-Ajaka e cols., 1995b). Inclusive, o caso mais antigo de AIDS documentado na Europa, em um marinheiro norueguês em 1966, foi decorrente de uma infecção pelo HIV-1 do grupo O (Zhu e cols., 1998).

Diferentes critérios foram propostos para a classificação dos diferentes isolados em novos subtipos virais (Salminen e cols., 1995). Atualmente, para constituir um novo subtipo genético, é necessário existir ao menos dois isolados diferentes, provenientes de pacientes sem ligação epidemiológica, que se agrupem em conjunto e que sejam separados filogeneticamente em pelo menos 35% de genótipos previamente estabelecidos. Uma seqüência do envelope de ao menos 1,5Kb deve estar disponível para cada isolado e nenhuma porção destas seqüências deverá corresponder a algum genótipo conhecido (Carr e cols., 1998-Los Alamos Data Base, cap. III-10).

Estudos filogenéticos colocaram em evidência os diferentes subtipos genéticos que compõem o grupo M. Inicialmente a análise filogenética do gene *env* permitiu definir 6 subtipos (A a F) [Myers, 1995], provenientes de origens geográficas diversas. Posteriormente, a análise subsequente de outros isolados permitiram identificar novos subtipos (G a K) [Myers, 1997]. Os subtipos assim diferenciados são todos equidistantes uns dos outros, a percentagem de divergência das sequências C2V3 da gp120, no contexto do mesmo subtipo é compreendida entre 7% e 20%, e o percentual de divergência entre 2 subtipos entre 20% e 30% (Kuiken & Korber, 1994).

No grupo M do HIV-1, o subtipo B responsável pelos primeiros casos de AIDS nos países industrializados, está distribuído por toda América do Norte e Sul, Europa, Japão, Austrália e Tailândia (Korber e cols., 1998 - Los Alamos Database) [figura 9]. Posteriormente, variantes deste subtipo foram identificados, agrupando vírus da variante B'' encontrados no Brasil (Morgado e cols., 1994; Couto-Fernandez e cols., 1994) e vírus originários da Tailândia (variante B'-Thai B) [Myers, 1997].

O subtipo A é largamente representado em toda África e aparentemente é o vírus mais divergente, podendo alcançar níveis de diversidade de mais de 20% intra-subtipo. O subtipo C, atualmente responsável pela grande maioria dos novos casos de infecção pelo HIV-1 (UNAIDS, 1997), incluem amostras provenientes da África do Sul, Índia, Zâmbia, Djibouti, Kenya e mais recentemente Brasil, Argentina e Chile (Pfützner e cols., 1992; Louwadie e cols., 1993; Dietrich e cols., 1995; WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization, 1994; Caride e cols., 1999, Desgranges e cols., 1998; Korber e cols., 1998-Los Alamos Database).



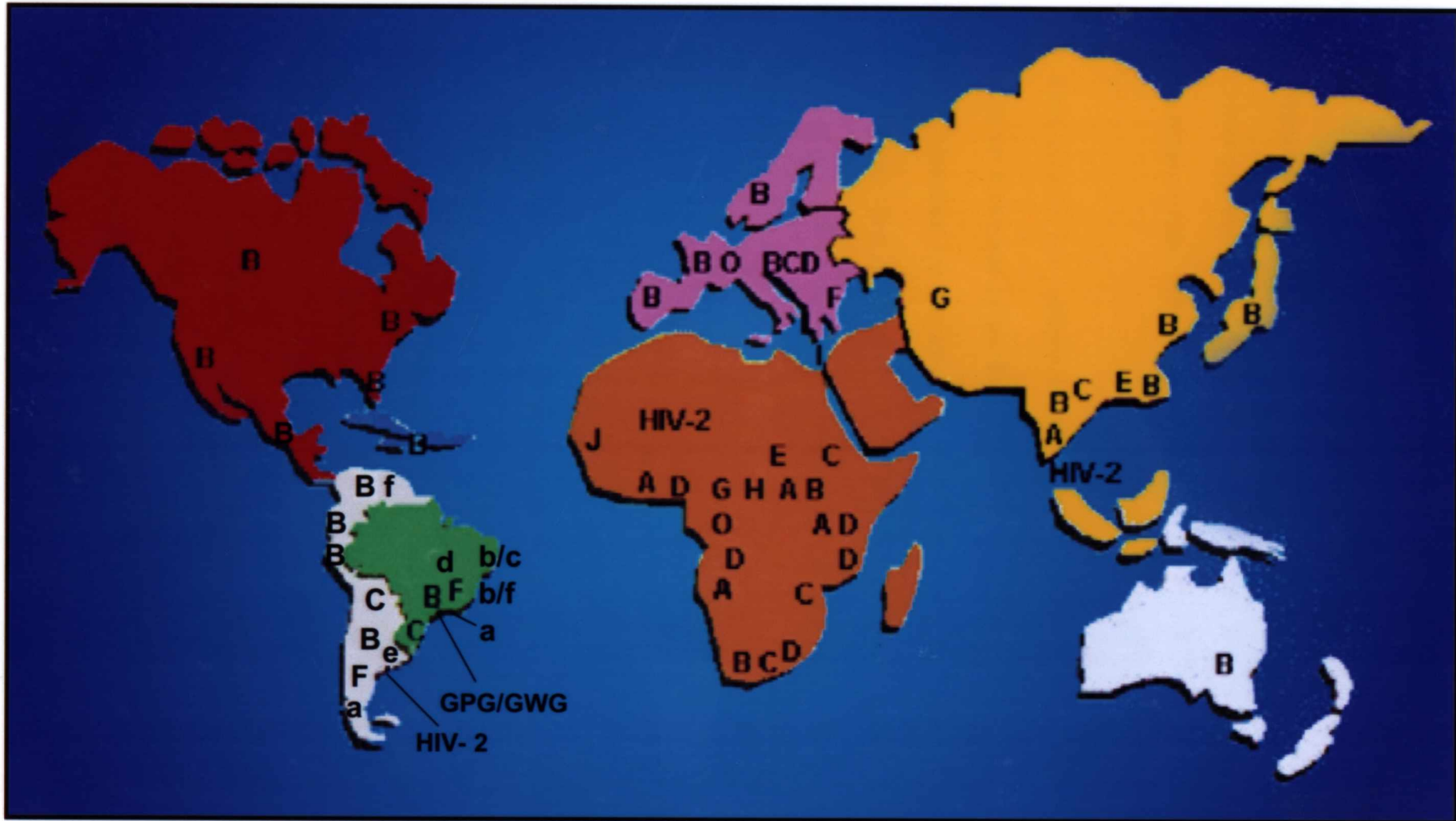


Figura 9. Distribuição mundial dos diferentes subtipos de HIV-1 do grupo M, grupo O e HIV-2. (adaptado a partir de Hu e cols., 1996 - revisado em novembro de 1999).

A maior parte das amostras do subtipo D são provenientes da África Central, sendo igualmente presente nos países do leste africano e Kenia (Janssens e cols., 1994c, 1997) e, recentemente no Brasil (Morgado e cols., 1998). Os subtipos D e B são os filogeneticamente mais próximos, o que sugere que o subtipo B provavelmente derive de isolados virais provenientes da República Central Africana, onde atualmente o subtipo D é prevalente (Sharp e cols., 1994).

Com relação aos subtipos B de origem africana, eles se distribuem em baixa prevalência em diferentes países do centro africano. Duas hipóteses com relação a sua origem são descritas: ou tratam-se de vírus realmente de origem Africana próximos filogeneticamente dos vírus que foram difundidos primeiramente para os países industrializados, ou eles são vírus originários dos EUA/Europa que foram introduzidos na África (Sharp e cols., 1994).

O subtipo E, recentemente reconhecido como recombinante A/E (Gao e cols., 1996a; Carr e cols., 1998), apresenta-se freqüentemente distribuído no sudeste da Ásia (Gao e cols., 1996a), também sendo descrito na República Central Africana, Índia (McCutchan e cols., 1996) e, mais recentemente na América do Sul (Korber e cols., 1998 – Los Alamos Database). Estes vírus apresentam sequência do envelope e LTR correspondentes ao subtipo E e os genes *Gag* e *Pol* do subtipo A (Gao e cols., 1996b).

O subtipo F esta presente no Brasil, Romênia, Zaire e República dos Camarões (Morgado e cols., 1994; Dumitrescu e cols., 1994; Nkengasong e cols., 1994). Mais recentemente, este subtipo foi identificado na Argentina, Bolívia e Venezuela

(Campodonico e cols., 1994; Velvarde e cols., 1999; Castro-de-Betânjer e cols., 1999). Em função da elevada diversidade genética observadas em algumas amostras africanas do subtipo F, uma nova classificação filogenética em três classes foi proposta para amostras deste subtipo (Triques e cols., 1998).

Os subtipos G e H foram descritos no Gabão, Rússia e Uganda (Kaleebu e cols., 1995; Janssens e cols., 1994d, 1997). Formas recombinantes do subtipo G, denominadas como “IbNG-like” (Gao e cols., 1996b, 1998; Carr e cols., 1998), mostram seqüências recombinantes entre os subtipos A e G do HIV-1, possuindo seqüências mosaico no gene *pol*, LTRs, *gag* e envelope (Korber e cols., 1998 – Los Alamos Database).

Em amostras obtidas de dois pacientes originários do Zaire vivendo na Suécia, foi identificado o subtipo J e, mais recentemente, o subtipo K, classificado a partir de amostras divergentes isoladas no Zaire (Korber e cols., 1998 - Los Alamos Data Base).

A análise filogenética utilizando o gene *gag* de setenta isolados virais provenientes de quinze países diferentes, repartidos em quatro continentes (Louwagie e cols., 1993) mostrou um percentual de divergência do gene *gag* entre os diferentes subtipos, pelo menos, 15% menor do que a descrita para o envelope viral (Louwagie e cols., 1993). Mais recentemente, outras regiões genômicas do HIV-1 foram utilizadas para a classificação filogenética dos diferentes isolados, mostrando estreita correlação com as análises filogenéticas realizadas no *gag* e envelope (Janini e cols., 1996; Ramos e cols., 1998, Korber e cols., 1998 - Los Alamos Data Base).

Independente do tipo de classificação utilizada, podemos encontrar todos os tipos, grupos e subtipos virais no continente africano, com uma evidente predominância do subtipo A, e uma crescente aumento da prevalência do subtipo C do HIV-1. Este aumento da prevalência do subtipo C não só ocorre no continente africano, mas também, em outras regiões do mundo (UNAIDS, 1997). Nos demais continentes existe na sua maioria a prevalência de "clusters" virais, correspondendo à existência de um subtipo majoritário e outros com menor prevalência, provavelmente recém-introduzidos em determinada região.

Estas taxas de distribuição do HIV pelo planeta falam a favor da origem africana do vírus, e ressalta a importância de estudos de epidemiologia molecular para um melhor conhecimento da extensão epidemiológica dos diferentes tipos, grupos e subtipos de HIV-1 pelo mundo.

### **Recombinação gênica entre subtipos**

Durante muito tempo acreditava-se que os eventos de recombinação gênica teriam lugar somente entre as "quasiespecies" virais, entretanto, análises mais recentes mostraram que numerosas recombinações podem ocorrer entre os diferentes subtipos de HIV-1 (Sabino cols., 1994; Louwagie e cols., 1995; Cornelissen e cols., 1996; Gao e cols., 1998).

Atualmente, a frequência de vírus recombinantes sequenciados nos bancos genômicos de Los Alamos é de aproximadamente 10% (Korber e cols., 1998). Estes vírus particulares derivam provavelmente de uma recombinação *in vivo* entre diferentes subtipos virais, infectando o mesmo indivíduo. De fato, a equipe coordenada por B. Hahn

analisando 114 isolados virais encontrou 10 amostras recombinantes entre vírus dos subtipos do grupo M (Robertson e cols., 1995 a, 1995b).

Um dos exemplos mais marcantes deste tipo de recombinação é com relação ao subtipo E, atualmente designado como forma recombinante CRF A/E (Carr e cols., 1998). Quando analisamos suas seqüências genômicas do envelope, elas são claramente definidas como subtipo E. Entretanto, quando analisamos as seqüências do gene *gag*, estes vírus passam a ser classificados como do subtipo A, tanto para vírus E de origem tailandesa, como as de origem africana. Uma análise mais detalhada destes vírus mostrou a origem africana dos vírus provenientes da Tailândia (Gao e cols., 1996a).

O mesmo acontece para os vírus do subtipo G, que foram inicialmente classificados como subtipo A, pelas seqüências do *gag*, e, G em outras regiões genômicas (Carr e cols., 1996). Atualmente, tem-se verificado um aumento importante de formas recombinantes com este subtipo, circulando em países africanos (Janssens e cols., 1997; Peeters e cols., 1998). Os primeiros destes vírus, denominados “IbNG”, foi isolado em Abdjan e Nigéria, sendo suas seqüências genômicas completas, já estão disponíveis (Gao e cols., 1996b). Outros vírus com seqüências mosaico A/G, foram posteriormente identificados em Djibouti e Costa do Marfim (Carr e cols., 1998, 1999), e em alguns países do oeste e centro da África (Ellenberger e cols., 1999; McCutchan e cols., 1999), constituindo a segunda forma recombinante CRF A/G (Carr e cols., 1998). A terceira (A/G/I) e quarta (A/G/I/J) formas recombinantes CRF com o subtipo G do HIV-1 foram identificados em pacientes africanos vivendo no Chipre e Grécia (Gao e cols., 1998; Nasioulas e cols., 1999; Montavon e cols., 1999). A quinta forma recombinante CRF descrita, englobando seqüências genéticas do

subtipo A do HIV-1, é a forma A/B (Salminen e cols., 1995) que atualmente vem sendo responsável por um surto epidêmico entre usuários de drogas injetáveis na Rússia (Liitsola e cols., 1998).

Numerosos eventos de recombinação foram igualmente caracterizados em diferentes regiões do mundo, onde mais de um subtipo é prevalente (Louwagie cols., 1995). No Brasil, onde co-circulam os subtipos B/B", F, C, D e, mais recentemente A (Potts e cols., 1993; Morgado e cols., 1994; Couto-Fernandez e cols., 1994, WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization, 1994; Morgado e cols., 1998; Caride e cols., 1999), seqüências recombinantes B/F e B/C, já foram identificadas (Sabino e cols., 1994; Cornellisen e cols., 1996; Gao cols., 1996a, 1998). Posteriormente, infecções heterotípicas foram identificadas, onde a transmissão vertical de dois subtipos de HIV-1 foi demonstrada (Diaz e cols., 1995; Janini e cols., 1996, 1998).

Na África, onde existe a presença de numerosos subtipos, vírus com seqüências recombinantes foram igualmente identificados em pacientes de Ruanda (A/C e A/D), Uganda (A/D) [Robertson e cols., 1995a, 1995b; Cornelissen e cols., 1996; Gao e cols., 1998] e, mais recentemente, Gambia (G/X/C) [Bobkov e cols., 1996] e Senegal (A/G/J) [Korber e cols., 1998 – Los Alamos Database].

Na realidade, estes eventos de recombinação viral não são totalmente recentes, já que o primeiro isolado africano caracterizado na França, o isolado MAL (Alizon e cols., 1986), pertence ao subtipo D pela análise do envelope e ao subtipo A e U pelo gene *gag* (Robertson e cols., 1995a).

Vários casos de dupla infecção pelo HIV-1 e HIV-2 foram documentados em diferentes regiões: na África (George e cols., 1992; Janssens e cols., 1997), no Brasil (Pianiazek e cols., 1991) e na Índia (Grez e cols., 1994). Entretanto, nenhum fenômeno de recombinação *in vivo* foi demonstrado entre estes dois subtipos virais. Recentemente, o grupo de Takehisa e colaboradores (1998) mostrou múltiplos eventos de recombinação gênica intra-subtipos, inter-subtipos e inter-tipos de HIV, em amostras da República dos Camarões. Estes resultados se mostraram bastante contraditórios, principalmente em função do número reduzido de bases nucleotídicas analisadas dos genes *pol* e *env*, utilizados para construção filogenética dos recombinantes. Já em outro estudo, o grupo de Peeters e colaboradores (1999), em recente publicação, documenta através do sequenciamento de todo o genoma viral um caso de recombinação entre vírus do grupo M e do grupo O, sendo esta a primeira evidencia conclusiva de recombinação inter-grupos.

Toda esta diversidade genotípica do HIV-1 e a descoberta de amostras virais híbridas podem corresponder a uma importante variabilidade antigênica. Preparações vacinais, testes de detecção de anticorpos e de antígenos, entre outros, além do desenvolvimento de drogas antiretrovirais baseados em apenas um destes vírus, pode ser ineficiente com relação à detecção viral ou, em conferir proteção contra outros tipos de vírus, dificultando consideravelmente o desenvolvimento de estratégias imunoproláticas globais contra o HIV-1.

## **Diversidade biológica**

Estudos recentes mostraram que a heterogeneidade genética intra-subtipos pode ser biologicamente relevante (revisado por Fauci, 1996). Podemos observar entre os diferentes isolados de HIV, propriedades biológicas diferenciadas como níveis de replicação em culturas primárias, capacidade de indução de sincício e tropismo celular, independente do subtipo viral (Asjö e cols., 1986; Cheng-Mayer e cols., 1988; Fenyö e cols., 1988; Tersmette e cols., 1989a; Albert e cols., 1990a). Igualmente, um espectro variado de células sensíveis à infecção e diferenças na capacidade replicativa e citopatogenicidade de isolados de HIV-1, foram observados em amostras brasileiras, obtidas durante a fase inicial da epidemia de AIDS no Brasil (Couto-Fernandez e cols., 1992).

A capacidade replicativa do HIV-1 mostra correlação com a severidade da imunodeficiência no hospedeiro infectado (Coombs e cols., 1989; Lukashov & Goudsmit, 1998). De fato, uma rápida progressão para AIDS foi observada em indivíduos infectados com vírus mostrando um rápido crescimento em cultura com altos níveis de replicação ("rapid/high"). Em contrapartida, isolados que replicam lentamente em culturas primárias e em níveis reduzidos ("slow/low"), estão associados à sintomatologia moderada ou ausência de sintomatologia clínica. A mudança do fenótipo "slow/low" para "rapid/high" pode ocorrer no mesmo indivíduo durante o curso da infecção, estando a emergência destas variantes com elevada patogenicidade associada a um rápido declínio do número de células CD4+ e progressão para AIDS (Tersmette e cols., 1989b; Koot e cols., 1996).



Os níveis de replicação viral estão relacionados com os níveis de carga viral no paciente infectado (Lu & Andrieu, 1992; Nkengasong e cols., 1994). Altos títulos de carga viral são freqüentemente observados em pacientes sintomáticos, o que explica parcialmente que vírus obtidos de pacientes com AIDS cresçam mais rapidamente *in vitro* (Lukashov & Goudsmit, 1998).

A análise prospectiva da diversidade fenotípica do HIV-1 realizada em diferentes estágios da infecção, contribuiu para a identificação de formas virais com tropismo celular diferenciado. Desta maneira, segundo seu tropismo, os HIVs são classificados biologicamente em vírus monocitotrópico, infectando preferencialmente monócitos-macrófagos e vírus T linfotrópico, infectando linfócitos T ativados. Normalmente, vírus com tropismo para monócitos mostram baixos níveis de replicação e citopatogenicidade, sem a capacidade de indução de sincício em culturas de linhagens celulares. Estes vírus, denominados não indutores de sincício (NSI), são predominantemente detectados durante a fase assintomática da infecção (Schuitemaker e cols., 1992). Já os isolados virais T trópicos, ao contrário, possuem alta capacidade replicativa em linfócitos T ativados, induzindo um efeito citopático pronunciado. Estes vírus indutores de sincício (SI) são freqüentemente isolados entre pacientes com sintomas clínicos da infecção.

Atualmente, a região V3 do envelope do HIV-1 está implicada em numerosas funções biológicas do vírus (Chesebro e cols., 1991; Grimaila e cols., 1992). O domínio GPGR localizado no topo da alça V3 é particularmente importante na medida que as alterações que afetam esta região podem induzir a produção de vírus não infecciosos (Cheng-Mayer e cols., 1991). Inicialmente, o grupo de Takeuchi e colaboradores (1991)

demonstrou que a substituição de um único aminoácido nesta região era capaz de conferir ao HIV-1 um tropismo por linfócitos T CD4+, sendo posteriormente demonstrado, o envolvimento da região C-terminal da gp120 e da gp41 na determinação do tropismo macrofágico ou T-linfotrópico (Groenink e cols., 1992).

Em 1992, os principais resíduos implicados na capacidade de induzir sincício foram identificados, conjuntamente à descrição da importância da presença de aminoácidos básicos nas posições 306 e 320 da região V3 do envelope (Fouchier e cols., 1992). Estudos subsequentes de mutagênese dirigida permitiram identificar o envolvimento dos aminoácidos da posição 324 (De Jong e cols., 1992) e 319 e 327 como preditivos do surgimento de variantes com o fenótipo SI (Milich e cols., 1993). Aparentemente, estes resíduos de aminoácidos básicos parecem manter a estrutura da alça V3 sob uma conformação específica, característica das amostras T-linfotrópicas (Wyatt e cols., 1998) e, que determinadas mutações nesta região do envelope seriam capazes de modificar o fenótipo indutor do vírus (Milich e cols., 1997; Verrier e cols., 1999).

Apesar do acentuado grau de diversidade genética do HIV1, algumas de suas características fenotípicas se apresentam mais conservadas. As diferenças de tropismo celular de certos fenótipos virais suportam a existência de fenômenos de restrição à replicação do vírus em diferentes tipos celulares. Atualmente, se sabe que esse tropismo preferencial está relacionado com expressão diferenciada na superfície das células alvo, dos co-receptores CCR5 e CXCR4 (Weiss e cols., 1993; Deng e cols., 1996; Feng, e cols., 1996; D'Souza e cols., 1996; Cocchi cols., 1996).

A capacidade do HIV-1 em utilizar seletivamente estes co-receptores para sua entrada na célula hospedeira, permitiu estabelecer uma nomenclatura das propriedades biológicas do HIV-1 (Fenyö e cols., 1998). Assim, enquanto vírus monocitotrópicos NSI utilizam como segundo receptor para infecção de macrófagos e linfócitos T primários, a molécula CCR5, as formas linfotrópicas SI são capazes de infectar células T de linhagens através do receptor CXCR4 (fusina). Estes vírus foram denominadas respectivamente R5 e X4, enquanto que as formas virais com duplo tropismo foram denominadas R5X4 (Fenyö e cols., 1998).

Esta utilização seletiva dos co-receptores foi observada através de todos os subtipos genéticos do HIV-1 do grupo M, do grupo O e HIV-2 (Zhang e cols., 1996; Heredia e cols., 1997), sugerindo que alguns epítomos e/ou estruturas conformacionais envolvidos na ligação ao receptor CD4 e ao co-receptor, mostram estruturas conservadas entre os diferentes subtipos do HIV-1 (Cheng-Mayer e cols., 1991; Groenink e cols., 1992). Por outro lado, diferenças de utilização preferencial do segundo receptor foram recentemente evidenciadas em isolados do subtipo D do HIV-1, que tendem a utilizar exclusivamente CXCR-4, enquanto que o uso deste receptor foi raramente verificado entre amostras do subtipo C (Brelot e cols., 1997). As implicações da diversidade fenotípica de diferentes subtipos de HIV-1, bem como a presença de aminoácidos carregados positivamente na alça V3 do envelope viral, sobre imunopatogenia da infecção, tropismo e transmissão são questões a serem elucidadas.

## Variabilidade antigênica

Importantes regiões imunogênicas foram mapeadas na região do envelope viral, utilizando diferentes tipos de anticorpos (Goudsmit e cols., 1992; Zolla-Pazner e cols., 1995). Um acentuado grau de diversidade antigênica pôde ser observada durante resposta induzida por anticorpos neutralizantes do paciente infectado contra vírus homólogo, demonstrando claramente uma variabilidade *in vivo* do HIV-1 (Groopman e cols., 1987; Ho e cols., 1987; Goudsmit e cols., 1988).

A alça V3 do envelope viral foi descrita como o principal determinante de neutralização no final da década de 80 (Rusche e cols., 1988; Goudsmit e cols., 1988; Matsushita e cols., 1988; Javaherian e cols., 1989; La Rosa e cols., 1990; Carrow e cols., 1991). Este domínio é constituído basicamente por um epítopo com estrutura linear de aproximadamente 10 aminoácidos, incluindo as seqüências relativamente conservadas do topo da alça (GPGR ou GPGQ), que foram identificados como epítotos alvo da resposta neutralizante (Laman e cols., 1992). Mais recentemente, estudos utilizando glicoproteínas recombinantes do envelope, peptídeos sintéticos e anticorpos monoclonais (AcMo), permitiram a determinação de seis grupos de epítotos neutralizantes ao nível do envelope viral. Estes seis grupos de AcMo correspondem a anticorpos anti-V3 e anti-V1/V2 (Fung e cols., 1992; Moore e cols., 1994), anticorpos anti-CD4bs induzidos (Thali e cols., 1993; Wyatt e cols., 1995), anticorpos antiglican dependentes (Trkola e cols., 1996) e anticorpos anti-gp41 (Muster e cols., 1993; Conley e cols., 1994).

Foi documentado que certos anticorpos anti-V3 poderiam ser sensíveis a estrutura conformacional do envelope viral (Nara e cols., 1990). Este evento poderia explicar as observações de que isolados virais mantidos em linhagens celulares são mais susceptíveis à neutralização, em comparação aos isolados primários de HIV-1 (Nyamby e cols., 1996). A hipótese mais freqüente invocada para explicar a relativa resistência à neutralização de isolados primários é que, contrariamente as amostras cultivadas, os sítios de neutralização destes isolados seriam menos acessíveis a ação dos anticorpos, devido talvez, a diferenças nos níveis de glicosilação das proteínas do envelope viral, mascarando assim seus sítios de neutralização (Bou-Habib e cols., 1994; Sullivan e cols., 1995; Moore e cols., 1995; Karlsson e cols., 1996).

Para gerar uma resposta neutralizante por anticorpos contra o HIV-1, suficientemente elevada a ponto de ser detectada, epítopos fracamente conservados têm que ser repetidamente expostos ao sistema imune (Binley e cols., 1998; Lee e cols., 1997). Este conceito é respaldado pela observação da capacidade de neutralização contra isolados primários representativos dos subtipos A, D e E se apresentar aumentada em indivíduos progressores lentos é diminuída nos indivíduos progressores rápido, tanto na freqüência como nos títulos de neutralização (Zhang e cols., 1997).

O aumento gradual no espectro de neutralização cruzada inter-subtipos durante o curso da infecção foi bem documentado pelo grupo de Moog e colaboradores (1997) estudando a resposta por anticorpos neutralizantes de indivíduos em diferentes estágios da infecção. Este fenômeno foi igualmente observado em chimpanzés infectados com o HIV-1 (SIVcpz-ANT), onde amostras de soro coletadas 41 meses após o início do estudo, eram

capazes de neutralizar todos os nove isolados seqüenciais SIVcpz-ANT. Entretanto, amostras coletadas no início da infecção não eram capazes de neutralizar, nem o isolado autólogo, nem isolados homólogos de SIVcpz-ANT obtidos em estágios mais avançados da infecção (Nyambi e cols., 1997).

Vários estudos comparando a capacidade de soros policlonais obtidos de indivíduos infectados com vírus representativos dos subtipos genéticos A a I do grupo M, e representativos do grupo O, em neutralizar isolados primários de diferentes subtipos de HIV-1, mostraram que a neutralização tipo-específica não possui correlação com os subtipos genéticos do HIV-1 (Moore e cols., 1995; Kostrikis e cols., 1996; Nyambi e cols., 1996; Weber e cols., 1997; Bongertz e cols., 1997, 1998). Alguns isolados primários do grupo M são altamente sensíveis à neutralização por alguns soros policlonais de indivíduos infectados, enquanto que outros são menos sensíveis ou completamente resistentes. Soros ditos “generalistas” são capazes de neutralizar um largo espectro de isolados primários geneticamente diversos. Ao contrário, soros com capacidade limitada de neutralização, atuam sobre um número restrito de isolados ou uma cepa em particular (Nyambi e cols., 1996; Van der Groen e cols., 1998).

Dados acumulados, obtidos a partir do uso de anticorpos monoclonais humanos, sustentam fortemente a existência de epítomos conservados envolvidos no processo de neutralização cruzada (Zolla-Pazner e cols., 1995). Utilizando um painel de AcMo, com células infectadas com vírus de diferentes subtipos (A-E), permitiram a identificação de epítomos comuns, assim como epítomos subtipo-restrito e subtipo-específico, revelando que algumas regiões do envelope viral (e.g., gp41), que normalmente não estão expostas na

superfície da partícula viral intacta, se apresentam bem expostas na superfície da célula infectada (Zolla-Pazner e cols., 1995). Estes achados falam a favor de que isolados primários de diferentes subtipos de HIV-1 possuam antígenos ou imunógenos comuns, capazes de induzir uma resposta neutralizante cruzada por anticorpos. Entretanto, em termos de desenho de preparações vacinais, o epítopo antigênico que liga estes anticorpos neutralizantes, pode não ser necessariamente imunogênico num contexto mais abrangente .

### **Imunotipagem**

As classificações filogenéticas atuais se baseiam na análise de seqüências genômicas dos diferentes isolados virais (Korber e cols., 1998 – Los Alamos Database). Entretanto, outras técnicas permitem também a classificação dos diferentes grupos e subtipos de HIV, estudando-se a afinidade dos anticorpos induzidos frente à diferentes peptídeos sintéticos representativos de cada subtipo viral.

Numerosas equipes se interessam por esta técnica de subtipagem (Pau e cols., 1993; Cheingsong-Popov e cols., 1994; Bongertz e cols., 1994a, 1994b). O ensaio imunoenzimático utilizando peptídeos da alça V3 representativos dos diferentes subtipos de HIV-1 e suas variantes (PEIA-"peptide enzyme-linked immunosorbent assay") mostrou ser uma alternativa atraente para estudos de epidemiologia molecular, sendo utilizado na determinação de subtipos genéticos em diferentes áreas geográficas (George e cols., 1992; Grez e cols., 1994) e em sítios para futuros testes de vacinas anti-HIV-1, através de estudos organizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) [N'Gbichi e cols., 1994; Cheingsong-Popov e cols., 1994]. Esta técnica de sorotipagem mostrou ser efetiva em

países como a Tailândia, onde somente dois subtipos genéticos do HIV-1 circulam. Entretanto, a técnica de PEIA não mostrou resultados satisfatórios em populações onde vários subtipos do HIV-1 antigenicamente relacionados co-circulam, devido a altos níveis de reatividade cruzada, induzidos provavelmente, pela presença de epítomos comuns, apesar do acentuado grau de diversidade entre estas amostras (Pfützner e cols., 1992).

Mais recentemente, a equipe de F. Barin (1995) desenvolveu uma técnica de subtipagem sorológica (SSEIA -“subtype specific enzyme immunoassay”) utilizando o princípio de inibição da fixação de anticorpos por um excesso de peptídeos na fase líquida. Trata-se de uma ELISA em microplaca onde a fase sólida é sensibilizada por uma mistura equimolar de 5 peptídeos correspondentes a seqüência consenso da alça V3 dos principais subtipos de HIV-1 de A a E. A tipagem sorológica utilizando esta técnica mostra resultados interpretáveis em 90% dos soros, a impossibilidade de sorotipar se observa principalmente em amostras em fase de soroconversão recente. Entretanto, elevados níveis de reatividade cruzada foram novamente observados inclusive frente aos peptídeos consensos V3C, V3E e V3A.

Buscando comparar a sensibilidade das diferentes metodologias imunoenzimáticas na subtipagem do HIV-1, o grupo de Nkengasong e colaboradores (1998) testou a capacidade de discriminação de 4 metodologias enzimáticas, frente à um painel de peptídeos representativos dos diferentes subtipos genéticos. Pudemos verificar uma falta de correlação entre os resultados de reatividade sorológica e o subtipo genético determinado pelo sequenciamento genômico, devido provavelmente, a uma distribuição similar de seqüências subtipo-específicas ao longo do topo da alça V3 do HIV-1.



## **Isolamento e caracterização do HIV no Brasil**

Os primeiros casos de AIDS no Brasil foram identificados no início da década de 80, acometendo principalmente homossexuais/bissexuais masculinos (Rodrigues & Chequer, 1989). O perfil imunológico destes pacientes mostrava uma profunda depressão da resposta proliferativa de populações linfocitárias T e um quadro clínico similar aos primeiros casos de AIDS descritos nos EUA e Europa (Miranda-Silva e cols., 1988). Atualmente, já foram diagnosticados 170.073 casos de AIDS até agosto de 1999, com cerca de dois terços do total concentrados na região sudeste (Boletim Epidemiológico AIDS, Ministério da Saúde, ano XII nº03, agosto, 1999), o que coloca o país em terceiro lugar no mundo em números absolutos de casos (UNAIDS, 1999). Este total de casos de AIDS distribuiu-se em todas as 27 unidades federativas, e em 2.912 municípios, caracterizando um avanço da epidemia para o interior do país nos últimos anos.

O perfil epidemiológico da AIDS no Brasil é muito semelhante àquele observado nos países industrializados, onde a transmissão sexual ainda é a principal via de disseminação da infecção, representando 49% dos casos notificados. A transmissão sangüínea tem tido uma importância crescente na disseminação da epidemia, principalmente entre usuários de drogas injetáveis (UDI). Entretanto, nos últimos anos, tem-se detectado um aumento substancial da transmissão heterossexual, acometendo principalmente mulheres. Hoje, são 41.052 casos de AIDS em indivíduos do sexo feminino, e o seu aumento caracteriza-se como uma das principais tendências atuais da epidemia no Brasil (Boletim Epidemiológico AIDS, Ministério da Saúde, ano XII nº03, agosto, 1999).

O HIV-1 foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1987 pelo grupo de Galvão-Castro e colaboradores (Galvão-Castro e cols., 1987a), a partir de um paciente politransfundido apresentando quadro clínico compatível com AIDS (classificação CDC 4,C1, C2). A análise antigênica deste isolado viral mostrou tratar-se de um isolado de HIV-1, quando comparado com amostras bem caracterizadas de vírus do tipo 1 e tipo 2.

O isolamento do agente etiológico da AIDS e a instalação das culturas celulares infectadas com o primeiro isolado viral (HTLV-IIIB, doação Dr. Robert Gallo) possibilitou a implantação dos primeiros testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HIV-1 no Brasil. Em um primeiro estudo soropidemiológico, realizado na rede pública de coleta de sangue (Hemocentros) utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, foi possível determinar a prevalência da infecção pelo HIV em doadores de sangue de diferentes regiões brasileiras (Galvão-Castro e cols., 1987b).

Estudos soropidemiológicos, realizados na década de 80, indicavam a presença tanto do HIV-1 quanto do HIV-2 no Brasil (Veronesi e cols., 1987; Ivo-dos-Santos e cols., 1995). Apesar de somente o tipo 1 do HIV ter sido isolado e identificado com clareza no país, até o momento, não existem dados suficientes para se determinar a real prevalência destes dois tipos virais no Brasil, enfatizando a necessidade de estudos mais aprofundados de epidemiologia molecular, para um melhor conhecimento da distribuição dos diferentes tipos e subtipos virais.

## **Rede de laboratórios para o isolamento e caracterização do HIV-1**

A diversidade do HIV-1 é um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e universal contra a AIDS. Devido à falta de conhecimento suficiente em relação a esta diversidade viral, o Programa Mundial de Luta contra AIDS (GPA) da Organização Mundial da Saúde (OMS/ WHO), constituiu uma rede internacional de laboratórios sob sua coordenação (“WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization”), com o objetivo unir esforços para conhecer mais rapidamente e de uma maneira mais padronizada o polimorfismo do HIV-1 em locais onde produtos candidatos a vacinas pudessem vir a serem testados. Mais recentemente, o GPA foi transferido para o Programa de AIDS das Nações Unidas (UNAIDS/ONUSIDA) passando a ser denominado Rede de Vírus do Programa da UNAIDS (“UNAIDS Virus Network”, 1999)

Os principais objetivos desta rede são: (1) coletar sistematicamente material clínico de indivíduos infectados pelo HIV em diferentes regiões geográficas, (2) estabelecer um repositório destes espécimes clínicos, (3) isolar cepas representativas, (4) caracterizar estes isolados a nível biológico e molecular, e (5) distribuir informações relevantes e reagentes para a comunidade científica, além de promover testes de vacinas nos sítios selecionados.

Em 1992, o Brasil foi selecionado pela OMS como sítio para possíveis testes de vacinas anti-HIV/AIDS juntamente com Tailândia, Uganda e Ruanda. Esta seleção foi baseada em vários critérios, dentre os quais a gravidade da epidemia, a existência de infraestrutura e capacitação de pessoal local, foram os mais importantes.

O Brasil participando desta rede de laboratórios selecionou numa primeira etapa, 52 indivíduos soropositivos provenientes das cidades de Porto Alegre, Belo Horizonte, São Paulo, Rio de Janeiro e Salvador (WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization, 1994). Inicialmente, a caracterização genética dos subtipos virais foi feita através da avaliação da mobilidade de heteroduplexes (“Heteroduplex Mobility Assay”- HMA), formados com amostras padrões correspondentes aos diferentes subtipos de HIV-1. A técnica de “PCR fingerprint” e o sequenciamento genômico da região C2-V3 e da gp120 em toda a sua extensão, foram igualmente realizados. A avaliação da diversidade biológica dos isolados virais foi feita através da mensuração dos níveis de replicação viral, e pela capacidade de induzir sincício em diferentes culturas celulares. Já a caracterização antigênica, foi realizada através do estudo da reatividade sorológica frente à peptídeos sintéticos, correspondentes à alça V3 do envelope viral dos diferentes subtipos virais. Também foi analisada a presença e a especificidade de anticorpos neutralizantes contidos no soro destes pacientes.

Os resultados obtidos neste projeto, permitiram concluir que a técnica de HMA é um método adequado para a subtipagem do HIV-1 (Bachman e cols., 1994) e que a técnica de ELISA com peptídeos sintéticos HIV-1-específico, teria potencial para utilização em estudos de soropidemiologia (Pau e cols., 1993; Cheingsong-Popov e cols., 1994).

A análise genética das amostras brasileiras, revelou a presença dos subtipos B/B”, F e C (WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization, 1994). Um acentuado polimorfismo biológico *in vitro* (Rübsamen-Waigman e cols., 1994) e, antigênico,

evidenciado pela reatividade diminuída de plasmas brasileiros frente aos diferentes peptídeos sintéticos derivados de isolados Norte Americanos/Europeus (Bongertz e cols., 1994a, 1994b; Cheingsong-Popov e cols., 1994).

Ao mesmo tempo, uma série de trabalhos sobre a diversidade do HIV-1 começaram a ser produzidos no país, os quais permitiram demonstrar uma maior prevalência do subtipo B, seguido do subtipo F (Morgado e cols., 1994; Lowaige e cols., 1994; Couto-Fernandez, e cols., 1994). Foi descrita a variante B” do subtipo B (Morgado e cols., 1994; Couto-Fernandez e cols., 1994), além de formas recombinantes entre os subtipos B/F (Sabino et cols., 1994) e B/C (Cornelissen e cols., 1996), circulando no Brasil.

Diante da estrutura organizacional proposta para a Rede Internacional para o Isolamento Caracterização do HIV-1 (WHO Guideline for HIV-1 Isolation and Characterization, 1994) e, considerando a existência local de competência já estabelecida no Brasil, foi criada em 1993 a Rede Nacional para o Isolamento e Caracterização do HIV-1, a qual buscava analisar de forma sistemática a diversidade genética, biológica e antigênica do HIV nos sítios selecionados para avaliação de vacinas anti HIV/AIDS no Brasil.

Os trabalhos desenvolvidos por este estudo integrado para a análise da diversidade do HIV-1 no Brasil, encontram-se detalhados nos documentos 2 e 3 desta tese.

## **OBJETIVO GERAL**

Isolar e caracterizar genotípicamente e fenotípicamente amostras de HIV-1 obtidas de indivíduos HIV-1 positivo, provenientes de diferentes regiões do Brasil.

### **Objetivos específicos**

- . Isolar amostras de HIV-1 proveniente de diferentes regiões geográficas do Brasil, utilizando os critérios estabelecidos pela Rede Internacional para o isolamento do HIV-1.
- . Analisar o espectro da diversidade biológica destes isolados, utilizando diferentes linhagens celulares.
- . Verificar a distribuição dos subtipos de HIV-1 nas diferentes regiões analisadas utilizando a técnica de mobilidade de heteroduplexes (HMA) e sequenciamento genômico.
- . Analisar o espectro da diversidade genética nos isolados de HIV-1, através da análise filogenética das suas seqüências de nucleotídeos.
- . Verificar a concordância de resultados de HMA na subtipagem genética de amostras brasileiras de HIV-1, através da comparação com os resultados de sequenciamento genômico.
- . Avaliar a utilidade da técnica EIA com peptídeos sintéticos específicos, na tipagem sorológica do HIV-1 e na discriminação das variantes intra-subtipo (subtipo B: GPGR e GWGR) deste grupo de soros.
- . Comparar a sensibilidade da técnica de HMA com o imunoenensaio EIA utilizando peptídeos HIV-1 subtipos-específicos.
- . Avaliar o espectro da diversidade antigênica das amostras brasileiras, analisando os níveis de reatividade de soros de indivíduos infectados frente a peptídeos sintéticos de HIV-1.
- . Participar do esforço nacional para o isolamento e caracterização genética, biológica e antigênica em amostras obtidas nos sítios selecionados para futuros testes de vacinas.
- . Desenvolver um estudo de vigilância da prevalência e dinâmica dos subtipos genéticos de HIV-1, em grupos populacionais com riscos de contrair a infecção, nos sítios selecionados.
- . Verificar a possível associação entre os diferentes subtipos do HIV-1 com via de transmissão, sexo, fator racial.
- . Realizar o sequenciamento genético e análise filogenética de amostras de HIV-1 de subtipos não-B.

## RESULTADOS E APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Reconhecendo a existência de lacunas no atual conhecimento sobre a variabilidade genética, antigênica e biológica do HIV-1, e suas implicações no desenvolvimento de vacinas apropriadas para uso mundial, diferentes grupos científicos analisaram amostras obtidas de indivíduos soropositivos, tornando disponível uma série de informações relativas à diversidade do HIV-1 no Brasil. Os primeiros estudos de caracterização desta diversidade datam do início dos anos 90, quando o polimorfismo genético e as propriedades biológicas de isolados obtidos no início da epidemia no Brasil, foram determinados respectivamente, através da análise do perfil dos fragmentos de restrição gerados por digestão enzimática utilizando a técnica de RFLP ("restriction fragment length pattern"), e do tropismo viral e níveis de replicação em diferentes linhagens celulares (Couto-Fernandez, et cols., 1992). Este estudo realizado em amostras provenientes do Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia, mostrou pela primeira vez, níveis de diversidade em amostras Brasileiras de HIV-1, similares ao já descrito em outras regiões do mundo, apresentando, no entanto, um perfil genético mais próximo dos isolados Norte Americanos/Europeus, que de isolados de origem africana (Couto-Fernandez, e cols., 1992).

Buscando expandir o conhecimento sobre os níveis de diversidade destas amostras de HIV-1, incluindo amostras adicionais obtidas de diferentes regiões do Brasil, foram realizados estudos mais aprofundados de caracterização genética e antigênica em amostras coletadas no Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Bahia. Através do sequenciamento genômico de uma região de aproximadamente 900pb do envelope viral, pudemos analisar as

seqüências de nucleotídeos das regiões V1, V2, V3, V5 e parte da gp 41 destes vírus. O estudo de diversidade antigênica foi realizado através da avaliação dos níveis de reatividade de soros de indivíduos HIV-1 positivo, frente a peptídeos sintéticos representativos dos diferentes subtipos virais. Este trabalho realizado em colaboração com o Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia, Bélgica, Centro de Referência da OMS para SIDA/AIDS, mostrou elevados níveis de diversidade entre as diferentes amostras, tanto a nível genético como antigênico, com um grau de diversidade genética de até 13,5%, e níveis de reatividade entre os diferentes peptídeos subtipos específico, bastante heterogênea. Foram observadas importantes substituições na sequência de aminoácidos no topo da alça V3 de alguns isolados virais, cujas implicações na imunopatogenia, diagnóstico e transmissão, são discutidas em detalhes no documento número 1.



**Documento nº 1**

Couto-Fernandez, J.C.; Janssens, W., Heyndrickx, L., Motte, I., Fransen, K., Peeters, M., Delaporte, E., Galvão-Castro, B., Piot, P. and Van der Groen, G.  
GENETIC AND ANTIGENIC VARIABILITY OF HIV TYPE 1 IN BRAZIL.  
*AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(9):1157-1163, 1994.

# Genetic and Antigenic Variability of HIV Type 1 in Brazil

JOSÉ C. COUTO-FERNANDEZ,<sup>1</sup> WOUTER JANSSENS,<sup>2</sup> LEO HEYNDRICKX,<sup>2</sup> JAN MOTTE,<sup>2</sup>  
PATRIEN FRANSEN,<sup>2</sup> MARTINE PEETERS,<sup>2</sup> ERIC DELAPORTE,<sup>3</sup> BERNARDO GALVÃO-CASTRO,<sup>1</sup>  
PETER PIOT,<sup>2</sup> and GUIDO VAN DER GROEN<sup>2</sup>

## ABSTRACT

Six Brazilian strains of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) were isolated from infected individuals residing in different regions of Brazil between 1987 and 1989. Phylogenetic analysis based on an 860-base pair fragment, including V3, V4, V5, and the beginning of gp41, classified the Brazilian strains significantly in genotype B, with interhost distances between 5.9 and 13.1% (mean value, 10%). Amino acid sequence analysis of the V3 loop revealed that three strains contained the North American/European GPGR motif as the tip of the loop whereas in the other three strains proline (P) was substituted by tryptophan (W), methionine (M), or phenylalanine (F). A consensus peptide, Bra-cons, was designed containing GWGR as the tip of the loop. Serological reactivity to the Bra-cons peptide and other V3 peptides (MN, SF2, HBX2, RF, MAL, ELI, Z6, and a Côte d'Ivoire peptide, CI-cons) was compared for 114 HIV-1-positive sera from Rio de Janeiro. Sixty-nine (60.5%) reacted with peptides belonging to genotype B, of which 10 sera also reacted with peptides belonging to genotype A ( $n = 7$ ) and D ( $n = 3$ ). Eighteen sera (15.8%) had binding antibodies to the Bra-cons peptide. A high number of sera ( $n = 43$ ; 37.7%) had no antibodies to any of the V3 peptides tested. This result suggests that HIV-1 variants with aberrant V3 loops may circulate in Rio de Janeiro.

## INTRODUCTION

THE ENVELOPE (Env) of HIV-1 contains highly variable regions. In the third variable region (V3) of the *env* gene, there are important determinants for virus neutralization,<sup>1,2</sup> cell tropism,<sup>3,4</sup> and viral infectivity.<sup>5</sup> However, the role of distinct HIV variants in the development of AIDS is unclear. On the basis of the induction of neutralizing antibodies in experimental animals, this viral epitope is under investigation as a candidate for potential HIV-1 vaccines and as a target for immunoprophylaxis strategies.<sup>6</sup> However, to protect against HIV infection it is important that vaccines should induce a protective immune response against a wide range of viruses, especially those most common within the community to be protected.

Brazil is one of the countries most affected by HIV-1. In November 1993, a cumulative total of 43,964 AIDS cases had been reported by the Ministry of Health for all 27 states.<sup>7</sup>

Data regarding HIV-1 diversity in Brazil has already established that subtype B viruses (some with unusual V3 sequences) are prevalent, with a smaller apparent proportion of subtype F viruses.<sup>8-13</sup>

The aim of the study was to analyze the genetic variability in the *env* gene of HIV-1 strains isolated from patients from different geographic regions in Brazil. Furthermore, we investigated the seroreactivity of 114 HIV-1 Western blot-confirmed seropositive Brazilian individuals to peptides mimicking the principal neutralizing domain (PND) of the V3 loop of HIV-1 strains belonging to different genotypes as well as to a consensus PND peptide of Brazilian isolates.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

HIV-1 strains of six HIV-1-infected individuals residing in different regions in Brazil and attending public hospitals during the time period between 1987 and 1989 were included in this study. The CD4<sup>+</sup> cell counts ( $\times 10^6$ /liter), the most widely used marker for staging of asymptomatic HIV infection,<sup>14</sup> are indicated: P3 (CD4 < 200), São Paulo; P4 (200 < CD4 < 500), P6 (200 < CD4 < 500), and P7 (CD4 > 500), Bahia; P8 (200 < CD4

<sup>1</sup>Advanced Public Health Laboratory, Centro de Pesquisas Gonçalo, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia CEP 41-945, Brazil.

<sup>2</sup>Division of Microbiology, Department of Infection and Immunity, Institute of Tropical Medicine, 2000 Antwerp, Belgium.

<sup>3</sup>INSERM U13/IMEA-Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

Genotype B:	MN	CNKRKRIHI...GPGRFYTTKM
	SF2	--T-S-Y-...-----H--GR
	HBX2	--T-----R-QR-----V-IGK
	RF	--T-S-TK...-----VI-A-GQ
	BRA-cons	--T-S-----W-----A-GE
Genotype D:	MAL	--T-RG--F...---Q-L---GI
	ELI	--T-Q-TP...-L-QSL---RSRS
	Z6	--T-QSTP...-L-Q-L---RGTK
Genotype A:	CI-cons	--T-S-R...---QT--A-GD

FIG. 1. Alignment of V3 peptides. Genotype classification of the V3 peptides is according to the classification of the respective strains, from which they are derived.<sup>16</sup> Amino acid identity between sequences is represented by dashes; points are introduced to align the sequences.

< 500), Paraná; P9 (CD4 < 200), Rio de Janeiro. From these individuals the corresponding serum was not available. Additionally, HIV-1-positive sera were obtained from 114, mostly asymptomatic, individuals from Rio de Janeiro, Brazil. HIV-1 positivity was confirmed by Western blot (WB-1; Diagnostic Biotechnology, Heverlee, Belgium), using the World Health Organization (WHO) criteria.<sup>15</sup> To analyze the specificity of antibody reaction to a consensus PND peptide of Brazilian isolates, HIV-1-positive sera from individuals (asymptomatic or having AIDS) were included from Belgium ( $n = 139$ ), Rwanda ( $n = 207$ ), Gabon ( $n = 90$ ), and Kenya ( $n = 60$ ).

### Peptides

The V3 synthetic peptides were 20 to 22 amino acids long and contained a cysteine residue at the amino terminus for binding purposes in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The peptides cover the PND and are derived from sequences from genotype A (CI-cons: Côte d'Ivoire), genotype B (MN, SF2, and HBX2, North America; RF, Haiti; Bra-cons, Brazil) and genotype D (ELI, Z6, and MAL, Zaire). Genotype classification was according to Myers *et al.*<sup>16</sup> The alignment of the V3 peptides is shown in Fig. 1. Amino acid numbering is according to the MN strain.<sup>16</sup> The peptides were synthesized at Neosystems (Strasbourg, France). The CI-cons peptide was designed on the most common V3 sequences of Côte d'Ivoire strains as previously described.<sup>17</sup> The Bra-cons peptide was designed on V3 loop sequences of this study and sequences from HIV-1 strains from Bahia and São Paulo<sup>9</sup> and Rio de Janeiro.<sup>10,11</sup> A consensus sequence was derived in which proline (P) in the central GPGR motif was exchanged for tryptophan (W), resulting in the peptide CNTRKSIHIGWGAFYATGE.

### Peptide assay

An ELISA was used to monitor antibody reactivity to the V3 loop peptides. Stock solutions (1 mg/ml) of these peptides were reconstituted in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Peptides, at a concentration of 100 ng/200  $\mu\text{l}$  of carbon-

ate buffer, were coated overnight at room temperature in microtiter plates (Immunoplate; Nunc, Roskilde, Denmark). The plates were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS)-0.01% merthiolate-0.05% Tween 20. Nonspecific binding sites were blocked with blocking buffer (PBS-0.05% Tween 20-2% bovine serum albumin) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 hr. Of serum dilutions, made in blocking buffer, 200  $\mu\text{l}$  was incubated with the immobilized peptides for 1 hr at  $37^{\circ}\text{C}$ . The plates were washed and incubated with blocking buffer containing anti-human IgG-peroxidase conjugate, diluted 1:30,000, for 1 hr at  $37^{\circ}\text{C}$ . The plates were washed and antibody binding was visualized by adding substrate buffer (8.7 mg of tetramethylbenzidine/ml dimethyl sulfoxide [DMSO] diluted 1:100 in 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 4.3, and 0.006%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). After 30 min the reaction was stopped by adding 50  $\mu\text{l}$  of 4 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The optical density was read at 450 nm. Ten HIV-1-negative sera were used to establish the cutoff value of each assay as the mean value plus 3 standard deviations. Antibody reaction to a peptide was scored positive if the optical density (OD) value was above the cutoff value. Cutoff values ranged from 0.1 to 0.5. For uniformity and to eliminate nonspecific reactivity the highest cutoff value (0.5) was used for all the assays.

### Virus isolation and DNA preparation

HIV-1 isolation was carried out according to Barré-Sinoussi *et al.*<sup>18</sup> Briefly,  $2 \times 10^6$  peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-1-seropositive individuals were separated on a Ficoll-Hypaque gradient and cocultivated with  $5 \times 10^6$  phytohemagglutinin (PHA)-stimulated donor PBMCs. The cultures were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum and recombinant interleukin 2 (50 U/ml) (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium). Cultures were expanded to  $2.5 \times 10^7$  cells by adding  $2 \times 10^6$  PHA-stimulated donor PBMCs every 3 to 4 days over a 2- to 3-week period. Viral growth was determined by monitoring viral antigens by an HIV antigen capture enzyme immunoassay (EIA; Innogenetics). HIV-containing supernatants were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. Frozen infected cells were thawed and resuspended in 1 ml of TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]-1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]) and treated with 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and proteinase K (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. Nucleic acids were extracted by phenol-chloroform,<sup>19</sup> precipitated in absolute ethanol, and resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ . The quantity of total DNA was measured by optical density and their concentration adjusted to a final concentration of 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### Polymerase Chain Reaction, cloning, and sequencing

The polymerase chain reaction (PCR) conditions and primers were as described previously.<sup>17</sup> Primer H1E101 was biotinylated for direct sequencing purposes. An approximately 860-base pair (bp) fragment containing V3, V4, V5, and the beginning of gp41 was amplified for the six Brazilian strains. Nested PCR fragments were purified with Dynabeads (Medichim, Heppignies, Belgium) and directly sequenced using the direct solid-phase sequencing approach.<sup>20</sup> For one isolate (P6) it was not possible to obtain a satisfactory nested PCR product. This fragment was cloned in a pUC $\lambda$ 8 cloning vector. Sequence reactions were performed using the AutoRead se-

quencing kit and fluorescein-labeled primers (Pharmacia Biotech, Roosendaal, the Netherlands). Electrophoresis and data collection were done on an ALF automatic sequencer (Pharmacia Biotech).

### Sequence data analysis

The six HIV-1 *env* Brazilian sequences were aligned with 19 previously known sequences of HIV-1 isolates of diverse geographical origin. Starting from the alignment, a distance matrix, corrected for multiple mutations per site according to Jukes and Cantor,<sup>21</sup> was constructed.<sup>22</sup> Tree topologies were inferred by neighbor joining,<sup>23</sup> one of the most effective tree construction methods available at this time.<sup>24,25</sup> Tree construction and bootstrap analysis were realized with the software package TREECON.<sup>26</sup>

The nucleotide sequence data were deposited in the EMBL, GenBank, and DDBJ nucleotide Sequence Database under the following accession numbers: X78512–X78517.

## RESULTS

### Phylogenetic analysis

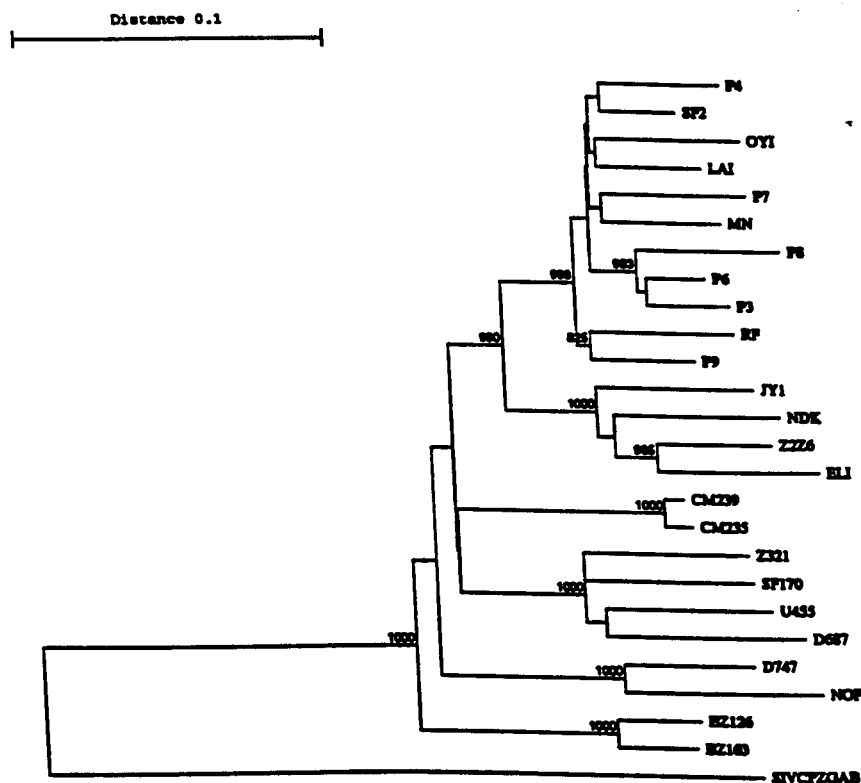
The Brazilian sequences were compared phylogenetically with the 860-bp *env* fragment of 19 previously published sequences representative of 6 different genotypes: 4 strains of

genotype A (Z321 [Zaire], D687 [Ghana], SF170 [Rwanda], and U455 [Uganda]), 5 strains of genotype B (OYI [Gabon], LAI [France], RF [Haiti], and MN and SF2 [United States]), 2 strains of genotype C (NOF [South Africa] and D747 [India]), 4 strains of genotype D (NDK, JY1, ZZZ6, and ELI [Zaire]), 2 strains from genotype E (CM235 and CM239),<sup>27</sup> and 2 strains from genotype F (BZ126 and BZ163).<sup>13</sup> SIV<sub>cpz-gab</sub> was included as outgroup sequence.

In the phylogenetic tree (Fig. 2), six branches representing six different genotypes (A, B, C, D, E, and F) are supported significantly by bootstrap analysis. All Brazilian isolates in this study are situated in genotype B, supported by 100% of the bootstrap trees. The interhost differences at nucleotide level for Brazilian strains were 5.9% (between P3 and P6) to 13.1% (between P8 and P9). The mean value for interhost difference was 10%.

### Genetic analysis of the V3 region

V3 amino acid sequences from Brazilian isolates were compared with the V3 consensus sequence of genotype B (Fig. 3).<sup>16</sup> The amino acid sequences around the V3 loop apices were similar to those of some North American and European isolates. The central GPGR tetrapeptide was found in three of six Brazilian strains. In the other three samples (P3, P6, and P8), proline (P) in the crown of the loop was replaced by tryptophan (W), methionine (M), and phenylalanine (F), respectively.



**FIG. 2.** Phylogenetic tree based on 853 unambiguously aligned positions of HIV-1 sequences from 25 different patients. The sequences determined in this study are indicated in bold. The root of the tree is placed such as to equalize its distance to the outgroup sequence SIV<sub>cpz-gab</sub> and its average to the HIV-1 sequences. The distance between two sequences is obtained by summing the lengths of the connecting horizontal branches, using the scale on top. The number of bootstrap trees out of 1000 replications supporting a particular phylogenetic group in more than 50% is placed alongside the node.

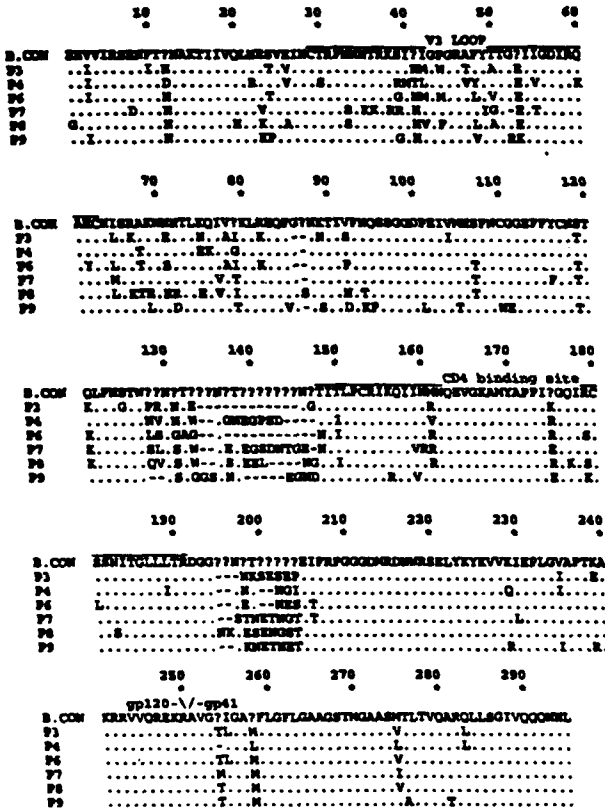


FIG. 3. Amino acid sequence alignment of part of the envelope glycoprotein, including V3, V4, V5, and the beginning of gp41 of six Brazilian strains. The database consensus sequence for genotype B, according to Myers *et al.*,<sup>16</sup> is on top. Amino acid identity between sequences is represented by points; dashes are introduced to align the sequences; the overbars are indicative for the V3 loop region and the CD4 binding site as indicated between them.

Antibody reactivity of sera from HIV-seropositive Brazilian individuals against V3 loop peptides in ELISA

Eighteen different seroreactivity patterns have been observed among the 114 Brazilian HIV-1-positive sera when tested in ELISA on 9 different V3 peptides (Fig. 4A). Of the 114 HIV-1-positive sera from Rio de Janeiro tested, 69 (60.5%) reacted to 1 or more peptides mimicking V3 loop sequences of HIV-1 strains classified in genotype B (Figs. 1 and 4A). Seven of these sera also reacted with the CI-cons peptide (genotype A); two sera also reacted with the Z6 peptide and one serum also reacted with the ELI and MAL peptides (genotype D). The number of sera having antibody reactivity to the RF and HBX2 peptides was 14 (12.3%) and 8 (7%), respectively. All sera reacting to the RF and/or the HBX2 peptide also reacted to the SF2 and MN peptides. All but one of the sera having antibodies to the SF2 peptide ( $n = 39$ ) also reacted to the MN peptide ( $n = 38$ ). Of 18 sera (15.8%) that reacted with the Bra-cons peptide, 2 did not cross-react with other V3 peptides. Three sera had serological reactivity to V3 peptides based on Zairean HIV-1 strains, classified in genotype D: two sera reacted with the Z6 peptide and one serum reacted with the ELI and MAL peptides.

Nine sera (7.9%) had antibodies directed to the CI-cons peptide. Two of these sera did not react with other peptides. Forty-three sera (37.7%) had no binding antibodies directed to epitopes on the V3 peptides used in this study (Fig. 4A). An increase in the cutoff value from OD = 0.5 to OD = 1.0 resulted in a decrease in the number of sera reacting with a certain V3 peptide in ELISA (Fig. 4B). The number of different seroreactivity patterns was now reduced to 12. The percentage of sera having antibody reactivity to one or more V3 peptides decreased by 28% (from  $n = 71$  to  $n = 51$ ). All of them had antibodies to subtype B peptides. The decrease in reactivity toward the different V3 peptides was as follows: 29% for the MN peptide (from  $n = 66$  to  $n = 47$ ), 36% for the SF2 peptide (from  $n = 39$  to  $n = 25$ ), 43% for the RF peptide (from  $n = 14$  to  $n = 8$ ),

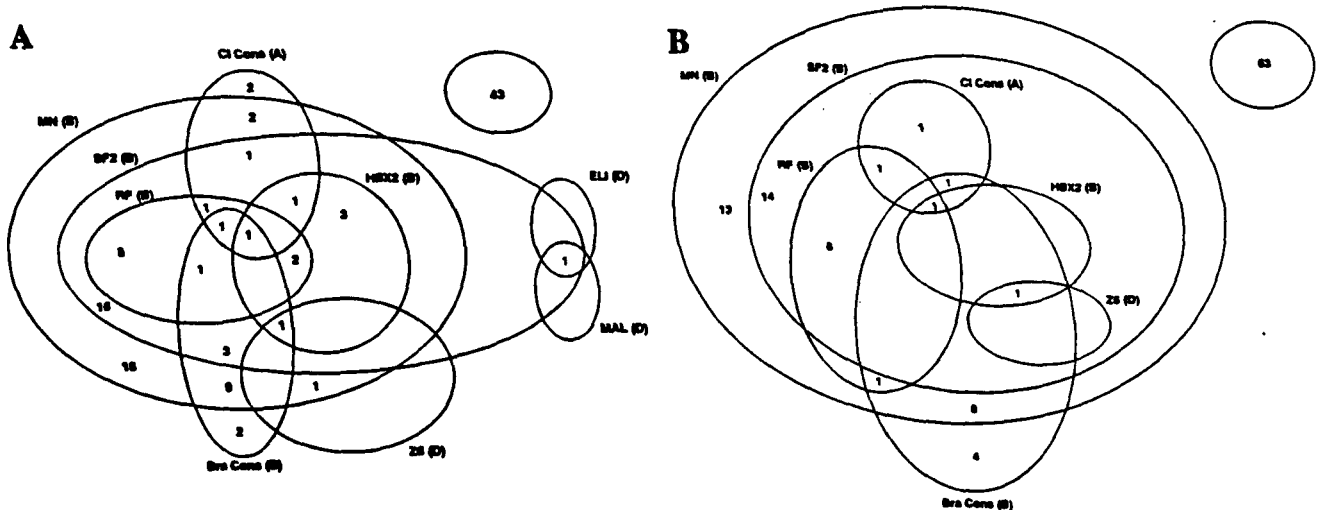


FIG. 4. Antibody reactivity of Brazilian sera to V3 loop peptides of HIV-1 isolates of different genotypes. The inside of each ellipse, indicated by a reference peptide, contains the number of sera reactive with this peptide. The genotypes of the strains from which the V3 loop peptides are derived are indicated in parentheses. A separate ellipse contains the number of sera having no binding antibodies to the V3 peptides tested. (A) Cutoff OD = 0.5; (B) cutoff OD = 1.0.

75% for the HBX2 peptide (from  $n = 8$  to  $n = 2$ ), 11% for the Bra-cons peptide (from  $n = 18$  to  $n = 16$ ), 55% for the CI-cons peptide (from  $n = 9$  to  $n = 4$ ), 50% for the Z6 peptide (from  $n = 2$  to  $n = 1$ ), and 100% for the ELI and MAL peptides (from  $n = 1$  to  $n = 0$ ).

#### Antibody reactivity to the Bra-cons peptide

Antibody reaction to the Bra-cons peptide was studied for sera from Belgium ( $n = 139$ ), Rwanda ( $n = 207$ ), Gabon ( $n = 90$ ), and Kenya ( $n = 60$ ), and compared to antibody reaction for sera from Brazil ( $n = 114$ ). The percentage of sera from the different countries, scoring positive (OD > 0.5) in the peptide assay, was 15.8% ( $n = 18$ ) for Brazil, 7.2% ( $n = 10$ ) for Belgium, 6.8% ( $n = 14$ ) for Rwanda, 4.4% ( $n = 4$ ) for Gabon, and 6.7% ( $n = 4$ ) for Kenya. To determine the specificity of antibody reaction to the Bra-cons peptide, the OD values of the sera from the different countries reacting with this peptide were compared (Fig. 5). An increase in the cutoff value from OD = 0.5 to OD = 1.0 resulted in a decrease in the number of sera scoring positive in ELISA: in Brazil, 11% (from  $n = 18$  to  $n = 16$ ); in Belgium, 60% (from  $n = 10$  to  $n = 4$ ); in Rwanda, 64% (from  $n = 14$  to  $n = 5$ ); in Gabon, 100% (from  $n = 4$  to  $n = 0$ ); and in Kenya, 100% (from  $n = 4$  to  $n = 0$ ).

### DISCUSSION

Using the *env* fragment encoding V3, V4, V5, and the beginning of gp41, it is possible to generate phylogenetic trees that are statistically confident and that group HIV-1 strains into the same genotypes as documented by Myers *et al.*,<sup>16</sup> based on larger fragments or total genomes.<sup>17</sup> All Brazilian strains in this study clustered in genotype B. The GPGR motif was present in 50% of the Brazilian strains (P4, P7, and P9). The Brazilian

strains lacking GPGR had GWGR (P3, São Paulo), GMGR (P6, Bahia), and GFGR (P8, Paraná) instead. Globally, GPGR is found in B subtypes only 63% of the time.<sup>16</sup> In the Centers for Disease Control (CDC, Atlanta, GA) study of a Florida dentist, out of 39 Florida control strains 12 did not have GPGR as the tip of the V3 loop.<sup>20</sup> In a seroconverter study from the Netherlands, 11 of 75 strains were variable in GPGR.<sup>20</sup> Finally, it is not uncommon to find inpatient variation in this motif, which has implications for serological reactivity.<sup>30</sup> V3 sequence data from HIV-1 strains circulating in Bahia and São Paulo, Brazil, were reported.<sup>11</sup> Thirty-six percent ( $n = 8$ ) of the strains had the GWGR tetrapeptide motif and were from individuals from Bahia. Also, V3 sequence data from HIV-1 strains circulating in Rio de Janeiro and São Paulo were reported.<sup>10</sup> Forty-three percent ( $n = 12$ ) of the strains had the GWGR tetrapeptide motif, GPGR was observed in only eight strains (28.5%), and eight strains (28.5%) presented a novel sequence. The GWGR tip of the loop has been found only in Brazil to date. It is a common form in Brazil, and its presence accounts for much of the decrease in frequency of GPGR forms in Brazil. Therefore the relative decrease in GPGR could be due to a founder effect with the GWGR form, and not to the excessive variation in this motif in Brazil. A study on 30 samples from patients of Argentina revealed only GPG as the tip of the V3 loop.<sup>31</sup> This may be due to a recent introduction or to clustering of the samples in that study. The prevalence of HIV-1 strains having GWG, GMG, or GFG as the tip of the V3 loop, for other regions of Brazil and for other South American countries, remains unclear. Although the majority of Brazilian isolates belong to genotype B, the presence of genotype F isolates has been demonstrated.<sup>11-13</sup>

The prevalence of antibodies binding with the Bra-cons peptide, having GWG as its central motif, was studied for 114 HIV-1-positive Western blot-confirmed sera from Rio de Janeiro and compared with the seroreactivity to other peptides of HIV-1 strains from different geographic regions. Seventy-one sera

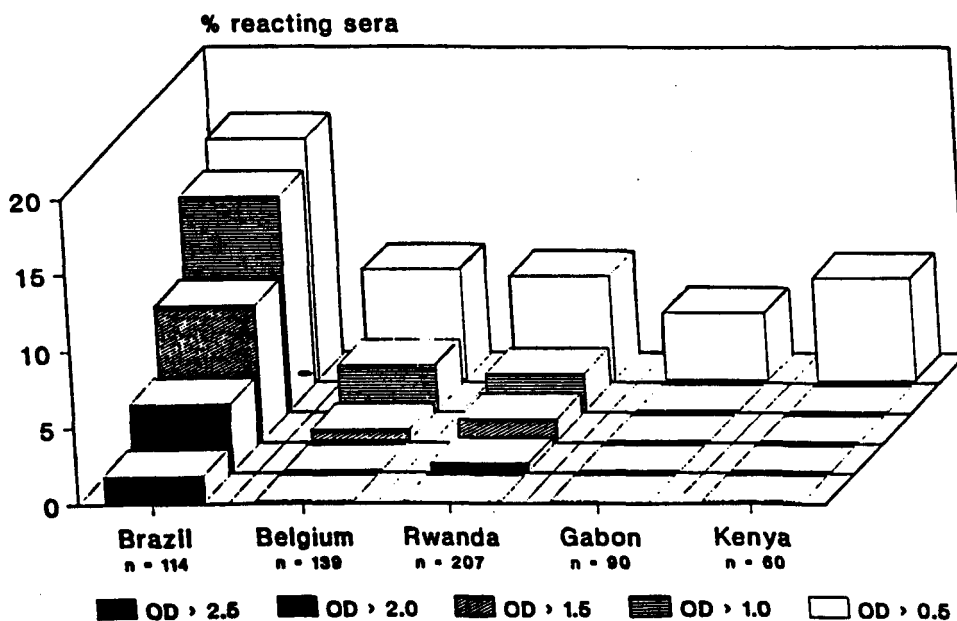


FIG. 5. Specificity of antibody reaction to the Bra-cons peptide. The percentage of sera of the different countries reacting with the Bra-cons peptide is indicated in order of increasing OD values.

(62.3%) had serological activity to one or more V3 peptides in this study. All except two had binding antibodies to V3 peptide(s) based on genotype B sequences. This finding corresponds with the phylogenetic classification in genotype B of the HIV-1 strains from Brazil in this and previous studies.<sup>9-12</sup> However, a prevalence of 60% of MN V3 peptide-reactive Brazilian sera was low compared with the prevalence of MN V3 peptide-reactive sera observed in eight other countries, of which one was European and seven were African. This observation, together with the low number of sera reacting with peptides of genotype D strains, made Brazilian seropositive sera different in their V3 loop reactivity pattern (data not shown). Antibody reaction of Brazilian sera to the Bra-cons peptide was 15.8%. Brazilian sera reacted with higher specificity to the Bra-cons peptide in comparison with sera from Belgium, Rwanda, Gabon, and Kenya (Fig. 5). Raising the cutoff value from OD = 0.5 up to OD = 1.0 resulted in an increased specificity and eliminated some of the cross-reactivity against the Bra-cons peptide. This is reflected by an 11% (Brazil) versus a 60% (Belgium), 64% (Rwanda), and 100% (Gabon and Kenya) reduction in the number of sera reactive with the Bra-cons peptide, in solid-phase ELISA. Antibody reaction of Brazilian sera to the CI-cons peptide (genotype A) was low (7.9%), compared to sera from seven African countries ranging from 70.7% (Gabon) to 94.7% (Côte d'Ivoire) (data not shown). This may indicate a different evolution of HIV-1 strains in Africa and Brazil. Raising the cutoff value from OD = 0.5 to OD = 1.0 resulted in a decrease in Brazilian sera having antibodies to certain V3 peptides. The decrease was different for each V3 peptide analyzed. The lowest decrease was observed for reaction with the Bra-cons peptide (11%). The decrease in reactivity to other genotype B-derived peptides was more profound: MN, 29%; SF2, 36%; RF, 43%; and HBX2, 75%.

The high number of sera ( $n = 43$ ; 37.7%) having no binding antibodies to any of the V3 peptides tested may indicate the presence of V3 loop-aberrant HIV-1 strains in Brazil, as is partially confirmed by our results. Although the six Brazilian isolates all belong to clade B, 50% of them had a remarkable difference at the tip of the loop (P3 [GWGR], P6 [GMGR], and P8 [GFGR]). Perhaps some of the nonreacting sera could react with a subtype F V3 peptide containing a relatively distinctive LGPG(Q/R). Also, the lack of reactivity of many of the sera could be due to positions proximal to the tip of the V3 loop. Serotyping using peptides corresponding to new variants may be important to trace the prevalence of these variants in the population. The PND present on the synthetic peptides contains a core tetrapeptide in a  $\beta$ -turn array<sup>32</sup> that is as highly conserved as GPGR for North American/European strains and as GPGQ for African strains.<sup>33</sup> However, the PND of Brazilian strains often shows substitution of proline (P) in the GPG motif to tryptophan (W), methionine (M), and phenylalanine (F). This kind of substitution may result in an altered epitope eliciting antibodies with low or no binding affinity for V3 peptides having GPGR or GPGQ as the tip of the V3 loop. These data are indirect evidence for the circulation in Brazil of HIV strains with aberrant V3 loop amino acid sequences. Further work is necessary to characterize in further detail these unusual HIV-1 strains as well as to determine their prevalence among Brazilian HIV-infected individuals. The outcome of these studies may contribute to a more efficient design of an HIV vaccine in Brazil.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Betty Willems and Annemie Leonaers for technical assistance. They gratefully acknowledge the following people for providing sera for this study: Dr. B. Colebunders, Dr. M. Vandenbruaene, and Dr. J. Goeman (Belgium), Dr. J. Bogaerts (Rwanda), Dr. L. Perret (Gabon), and Dr. M. Temmerman (Kenya). This work was supported by grants (Nos. 3-3025-91 and F5/5/25-RN-N24) from the National Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek (Brussels) and was partially supported by the Brazilian National Research Council (CNPq-RHAE).

## REFERENCES

- Looney DJ, Fisher AG, Putney SD, Rusche JR, Redfield RR, Burke DS, Gallo RC, and Wong-Staal F: Type-restricted neutralization of molecular clones of human immunodeficiency virus. *Science* 1988;241:357-359.
- Meloan RH, Liskamp RM, and Goudsmit J: Specificity and function of the individual amino acids of an important determinant of human immunodeficiency virus type 1 that induces neutralizing activity. *J Gen Virol* 1989;70:1505-1512.
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, and Cullen BR: Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991;253:71-74.
- Westervelt P, Trowbridge DB, Epstein LG, Blumberg BM, Li Y, Hahn BH, Shaw GM, Price RW, and Ratner L: Macrophage tropism determinants of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J Virol* 1992;66:2571-2582.
- Ivanoff LA, Dubay JW, Morris JF, Roberts SJ, Gutshall L, Sternberg EJ, Hunter E, Matthews TJ, and Petteway SR Jr: V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *Virology* 1992;187:423-432.
- Baltimore D and Feinberg MB: HIV revealed: Toward a natural history of the infection. *N Engl J Med* 1989;321:1673-1675.
- Ministério de Saúde: AIDS Boletim Epidemiológico (Brasil). 1993;VI-10.
- Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Ivo-dos-Santos J, and Galvão-Castro B: Molecular and biological diversity of HIV-1 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993;87:249-255.
- Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo C-C, Bernard MA, Brites Alves C, Badaro R, Suleiman J, Ferreira Q, Schochetman G, Johnson WD Jr, Ou C-Y, Ho JL, and the Brazilian AIDS Research Group: Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 1993;7:1191-1197.
- Morgado MG, Sabino E, Bongertz V, Brigido L, Galvão-Castro B, Hendry RM, and Mayer A: V3 sequence diversity among Brazilian HIV-1 samples. Abstracts IXth International Conference on AIDS, Berlin 1993; p. 4469. [Po-A 10-01698]
- Morgado MG, Sabino E, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimarães MDC, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JL, Hendry RM, and Mayer A: V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:569-576.
- Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy AG, van der Groen G, Fransen K, Gershy-Damet G-M, Deleys R, and Burke DS: Phylogenetic analysis of gag genes from seventy international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993;7:769-780.
- Louwagie J, Delwart EL, Mullins JL, McCutchan FE, Eddy G, and Burke DS: Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals

- the presence of two distinct genotypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:561-567.
14. Chaisson RE, Stanton DL, Gallant JE, Rucker S, Bartlett JG, and Moore RD: Impact of the 1993 revision of the AIDS case definition on the prevalence of AIDS in a clinical setting. *AIDS* 1993;7:857-862.
  15. World Health Organization: Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-I/HTLV-II. *Wkly Epidemiol Rec* 1990;65:281-283.
  16. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, and Pavlakis GN: *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1993.
  17. Janssens W, Heyndrickx L, Van de Peer Y, Bouckaert A, Franssen K, Motte J, Gershy-Damet G-M, Peeters M, Piot P, and van der Groen G: Molecular phylogeny of part of the *env*-gene of human immunodeficiency virus type 1 strains isolated in Côte d'Ivoire. *AIDS* 1994;8:21-26.
  18. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, and Montagnier L: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk group for acquired immunodeficiency (AIDS). *Science* 1983;220:868-871.
  19. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
  20. Hultman T, Stahl S, Hornes E, and Uhlen M: Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Res* 1989;17:4937-4946.
  21. Jukes TH and Cantor CR: Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*. Munro HN (ed.). Academic Press, New York, 1969, pp. 21-132.
  22. Van de Peer Y, Neefs J, and De Wachter R: Small ribosomal subunit RNA sequences, evolutionary relationships among different life forms, and mitochondrial origins. *J Mol Evol* 1990;30:463-476.
  23. Saitou N and Nei M: The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
  24. Sourdys J and Nei M: Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Mol Biol Evol* 1988;5:298-311.
  25. Saitou N and Imanishi T: Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol* 1989;6:514-525.
  26. Van de Peer Y and De Wachter R: TREECON: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput Applic Biosci* 1993;9:177-182.
  27. McCutchan FE, Hegerich PA, Brennan TP, Phanuphac P, Singharaj P, Jugsudee A, Berman PW, Gray AM, Fowler AK, and Burke DS: Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994 (in press).
  28. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, Luo CC, Korber BT, Mullins JI, Schochteman G, Berkleiman RL, Economou AN, et al.: Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science* 1992;256:1165-1171.
  29. Kuiken CL, Zwart G, Baan E, Coutinho RA, van den Hoek JA, and Goudsmit J: Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9061-9065.
  30. Korber B, Wolinsky S, Haynes B, Kunstman K, Levy R, Furtado M, Otto P, and Myers G: HIV-1 intrapatient sequence diversity in the immunogenic V3 region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8:1461-1465.
  31. Gomez Carrillo MG, Piccardo C, and Libonatti O: Analisis molecular del principal epitope de neutralizacion ("V3 lopp") del virus de la inmunodeficiencia humano tipo 1 de la Argentina. *Rev Arg Microbiol* 1992;24:91-101.
  32. Wilmot CM and Thornton JM: Analysis and prediction of the different types of B-turn in proteins. *J Mol Biol* 1988;203:221-232.
  33. Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, Profy AT, Rusche JR, Bolognesi DP, Putney SD, et al.: Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6768-6772.

Address reprint requests to:

Wouter Janssens  
 Division of Microbiology  
 Department of Infection and Immunity  
 Institute of Tropical Medicine  
 Nationalestraat 155  
 2000 Antwerp, Belgium



**Documento nº2**

Galvão-Castro, B.; Couto-Fernandez, J.C.; Mello, M.A.; Linhares-de-Carvalho, M.I.; Castello-Branco, L.R.; Bongertz, V.; Ferreira, P.C.P.; Morgado, M.G.; Sabino, E.; Tanuri, A. & the Brazilian Network for the HIV-1 isolation and characterization. A NATIONWIDE EFFORT TO SISTEMATICALLY MONITOR HIV-1 DIVERSITY IN BRAZIL: PRELIMINARY RESULTS. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(3):335-338, 1996.

**Documento nº 3**

Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization: Bongertz, V.; Bou-Habib, D.C.; Brigido, L.F.M.; Caseiro, M.; Chequer, P.J.N., Couto-Fernandez, J.C.; Ferreira, P.C.; Galvão-Castro, B.; Greco, D.; Guimarães, M.L.; Linhares-de-Carvalho, M.I.; 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, BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HIV-1 STRAINS IN THREE POTENTIAL HIV VACCINE EVALUATION SITES. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome and Human Retrovirology*, 1999 (no prelo).

Buscando melhor conhecer o espectro da diversidade do HIV-1 no Brasil, principalmente nos sítios selecionados para futuros testes de vacinas, foi estabelecida a Rede Brasileira para o Isolamento e Caracterização do HIV-1, com estrutura organizacional similar à rede de laboratórios da OMS. Esta rede de laboratórios é constituída basicamente por um laboratório primário central (LASP-CPqGM, FIOCRUZ, Bahia), e diversos laboratórios secundários com tradição científica no estudo dos diferentes aspectos da diversidade viral no Brasil (FIOCRUZ - Rio de Janeiro; Adolfo Lutz - São Paulo; Emílio Ribas - São Paulo, UFMG - Minas Gerais). A Rede Brasileira para Isolamento e Caracterização do HIV-1 no Brasil, além de oferecer uma análise em larga escala de amostras, permite também, uma melhor padronização da tecnologia empregada no estudo da diversidade viral. Os objetivos principais da rede nacional são: (1) Desenvolver um sistema de monitoramento contínuo da variabilidade genética e antigênica do HIV-1 em diferentes regiões geográficas do Brasil. (2) Gerar informações básicas sobre as propriedades genéticas e antigênicas de novas linhagens do HIV epidemiologicamente importantes, que permitam a seleção de futuros candidatos a vacinas antigenicamente apropriados para serem avaliados e potencialmente utilizados no Brasil. (3) Participar de outros esforços internacionais para caracterização do HIV, como parte da Rede Internacional da OMS para Isolamento e Caracterização do HIV ou em bases bilaterais de colaboração com programas internacionais individuais de pesquisa.

Este trabalho foi realizado em amostras provenientes de três grandes cidades brasileiras (São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte) responsáveis por aproximadamente 70% do número totais de casos de AIDS (Boletim Epidemiológico AIDS, Ministério da Saúde, agosto 1999), o que proporcionou uma avaliação abrangente sobre o espectro da

diversidade viral da maioria das amostras circulantes nas capitais selecionadas para futuros testes anti-HIV-1. Os dados obtidos deste estudo global sobre a diversidade do HIV-1 no Brasil permitiu avaliar a distribuição dos diferentes subtipos no país, além dos níveis de diversidade genética, biológica e antigênica.

Foram realizados estudos de caracterização fenotípica, como a avaliação da cinética de crescimento e citopatogenicidade viral frente à diferentes linhagens celulares e células mononucleares de doador normal estimuladas pela PHA. Estudos de caracterização antigênica avaliando a reatividade de anticorpos anti-HIV-1, utilizando ensaios sorológicos de ligação com peptídeos representativos da alça V3 nos indivíduos infectados, e de susceptibilidade à neutralização destes isolados frente a soros autólogos e heterólogos de indivíduos soropositivos, foram igualmente realizados. A determinação do subtipo genético nestas amostras, foi realizada através da técnica de HMA e do sequenciamento de nucleotídeos. Detalhes clínicos e laboratoriais deste estudo, além dos níveis de diversidade genética e biológica nas amostras do Rio de Janeiro, encontram-se no documento 2, enquanto que o estudo completo incluindo amostras do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, encontram-se sumarizados no documento 3.

RESEARCH NOTE

## A Nationwide Effort to Systematically Monitor HIV-1 Diversity in Brazil: Preliminary Results

B Galvão-Castro<sup>+/+</sup>, JC Couto-Fernandez, MA Mello, MI Linhares-de-Carvalho\*, LR Castello-Branco\*\*  
 \*\*, V Bongertz\*\*, PCP Ferreira\*\*\*,  
 M Morgado\*\*, E Sabino\*\*\*\*,  
 A Tanuri\*\*\*\*\*, the Brazilian  
 Network for the HIV-1 Isolation  
 and Characterization<sup>++</sup>

Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil

\*Ambulatório da Providência da Arquidiocese do Rio de Janeiro, RJ \*\*Departamento de Imunologia,

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

\*\*\*Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

\*\*\*\*Laboratório de Retrovirologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP \*\*\*\*\*Laboratório de Virologia

Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Key words: HIV-1 - genetic - antigenic - diversity - Brazil

Partially supported by World Health Organization, Global Programme on AIDS UNDP/World Bank/Brazilian Ministry of Health STD/AIDS Program; Programa Institucional de AIDS/FIOCRUZ, Bank of Brazil Foundation and National Research Council, (CNPq).

<sup>+</sup>Corresponding author. Fax: 55-71-359.2255

<sup>++</sup>Dirceu Greco, Paulo Cesar Peregrino Ferreira (UFMG), José Carneiro (Ministério da Saúde), Bernardo Galvão-Castro, José Carlos Couto-Fernandez (FIOCRUZ - BA), Frits Suttmoller, Vera Bongertz, Mariza Morgado, José P Simonetti (FIOCRUZ - RJ), Mauro Schechter, Amílcar Tanuri (UFRJ), Luiz Fernando Brigido de Macedo, Ester Sabino, Mirthes Ueda (Inst. Adolfo Lutz, SP).

Received 7 December 1995

Accepted 10 January 1996

The Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) presents a high level of genetic variation leading to isolates with divergent nucleotide and amino acid sequences and distinct biological properties. This viral diversity is one of the main obstacles for the development of a universal effective vaccine. Based on HIV-1 *env* and *gag* gene sequence data, at least nine nearly equidistant genetic subtypes belonging to the M (major) group could be identified. They are designated from A through I and occurring in different geographic regions of the world (G Meyers 1994 *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1317-1324, G Kostrikis et al. 1995 *J Virol* 69: 6122-6130). In addition, divergent HIV-1 viruses have been identified, and as could not be classified in any of these subtypes, were recently designated as group O (outlier) (M Van den Haesevelde et al. 1994 *J Virol* 68: 1586-1596, LG Gurtler et al. 1994 *J Virol* 68: 1581-1585, W Janssens et al. 1994 *AIDS* 10: 877-879).

Thus, to establish a surveillance program to monitor HIV-1 diversity in sites where HIV-1 candidate vaccine will be evaluated is of paramount importance for the selection of appropriate vaccine efficacy trials. In this context, the World Health Organization Global Programme on AIDS (WHO-GPA) organized a WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization, providing the basis of global mechanisms for monitoring HIV-1 variability (WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization 1994 *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1327-1343).

Brazil is one of the vaccine trial sites selected by the WHO-GPA, together with Rwanda, Thailand and Uganda. So far, at least three different subtypes have been found in Brazil: B, F, and C. In fact, through an evaluation of 235 Brazilian isolates it was observed that subtype B was predominant (88.5%) and that only 8.9% and 1.7% of the samples were subtypes F and C, respectively (K Potts et al. 1993 *AIDS* 7: 1191-1197, J Louwagie et al. 1993 *AIDS* 7: 769-780, MG Morgado et al. 1994 *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 569-576, JC Couto-Fernandez et al. 1994 *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1157-1163, WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization, 1994 *AIDS Res Hum Retrov* 10: 1327-1343, B Galvão-Castro et al. 1995 *Actualizaciones en SIDA* 3: 173-178, E Sabino et al. 1995 2nd National Conference on Human Retroviruses and Related Infections, Washington, DC- USA, M Guimarães et al. 1995 12 Simpósio Brasileiro de Pesquisa Básica em HIV/AIDS abstract no. 17, RJ, Brazil). Interestingly, two samples (0.9%) showed to be variants resulting from a recombination between subtypes B and F (E Sabino et al. 1994 *J Virol* 68: 3640-6346, B Hahn et al. 1996 *J Virol* in press).

Low levels of amino acid sequence conservation in the V3 loop were also seen between the Brazilian sequences and the HIV-1 prototypes currently in use for vaccine development. Indeed, the comparison with sequences of prevalent North American/European HIV-1 strains showed that the Brazilian subtype B sequences present amino acid replacements in some positions giving distinctive tetrameres at the tip of the V3 loop. In fact, the GWGR motif at the crown of the V3 loop was detected in 28 out of 71 (39.4%) isolates analyzed, while the highly conserved North American/European GPGR motif was observed in 25 samples (35.2%). Also, novel sequences were detected in 18 samples (25.4%) (MG Morgado 1994 in *Processo de desenvolvimento de vacinas anti HIV/AIDS. Problemas e benefícios PN-DST/AIDS*, Brazilian Ministry of Health). Moreover, the sequencing of the whole gp120 DNA of one Brazilian isolate with GWGR motif at the tip of the V3 loop showed an 89.1% homology of nucleic acid sequence with the prototype HIV-1 B subtype. The highest divergence was found in the V1-V3 regions (SM Costa et al. 1995 *Aids Res Hum Retroviruses* 11: 1243-1245).

In addition, Brazilians infected with HIV-1 presented a lower specific antibody response against V3 loop peptides of predominant prototypes of HIV-1 circulating in North America and Western Europe (EW Carrow et al. 1991 *AIDS Res Hum Retroviruses* 7: 831-838, V Bongertz et al. 1994 *Braz J Med Biol Res* 27: 1225-1236).

These results suggest that Brazilian HIV-1 strains have genetic and antigenic differences in comparison with North American/European prototype strains, which may hamper the success of immunoprophylactic programmes based on HIV-1 vaccine candidates currently proposed to be tested in Brazil.

Therefore a Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization (BNHIC) was established in March 1993, as part of the National Programme of HIV/AIDS Vaccine Development and Evaluation, nested with Sexual Transmitted Disease/AIDS Programme of the Brazilian Ministry of Health. This network has similar organizational structure to the WHO (*loc. cit.*). Briefly, BNHIC was organized on a three-tier basis including primary site, central reference laboratory and secondary laboratories.

Initially the primary cities comprised three previously selected ones for HIV-1/AIDS vaccine evaluation located in the cities of Belo Horizonte, MG; Rio de Janeiro, RJ, and São Paulo, SP. These sites are responsible for the selection of volunteers, collection of blood specimens and the shipment of the blood samples to the Central Reference Laboratory.

The Central Reference Laboratory is the Advanced Laboratory of Public Health (LASP), Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, in Salvador, BA. This laboratory is responsible for HIV-1 isolation, expansion and distribution of biological samples and reagents to the secondary laboratories. The Central Laboratory is also the HIV isolates national repository and is also responsible for transferring of technology and training.

The biological, immunological and genetic characterization of the specimens is undertaken at the secondary laboratories: (1) AIDS and Molecular Immunology Laboratory, Department of Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ; (2) Infectious Disease Service, Department of Preventive Medicine, Federal University of Rio de Janeiro; (3) Microbiology and Immunology Laboratory, Adolfo Lutz Institute; (4) Molecular Virology Laboratory, Dept. of Genetics, Federal University of Rio de Janeiro; (5) Retrovirology Laboratory, Adolfo Lutz Institute; (6) Retrovirology Laboratory, Department of Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ; (7) Virus Laboratory, Basic Science Institute, Federal University of Minas Gerais.

The main objectives of the Brazilian National Network are (1) to develop a system for continuous monitoring the genetic and antigenic variability of HIV-1 isolates from different geographic regions of Brazil; (2) to generate basic information of genetic and antigenic properties of epidemiologically relevant HIV-1 strains that will enable the selection of antigenically appropriate candidate vaccines to be evaluated and potentially used in Brazil; (3) to participate in other international HIV-1 characterization efforts as part of the WHO Network for HIV Isolation and Characterization, or on a bilateral basis of collaboration with individual international research programs. This approach, using rigorous standardized research protocols, will enable a wider ranging analysis of HIV-1 samples from different regions of Brazil.

In order to achieve these goals, we have been carrying out a pilot study in one of three previously selected sites, (Rio de Janeiro, RJ) for future HIV vaccine evaluation.

Initially, 16 seropositive individuals were selected for this study. HIV-1 isolation and expansion were performed according to the standard procedures described elsewhere (WHO Guidelines for Standard HIV Isolation Procedures, Geneva, 1994). Briefly, PBMC of seropositive and seronegative individuals were separated in gradient of Ficoll Hypaque, from whole blood collected using EDTA.  $8 \times 10^6$  PBMC from seronegative donors, previously stimulated with phytohemagglutinin, were cocultured with  $2 \times 10^6$  patient cells in RPMI medium containing glutamine, penicillin, streptomycin,

cin and 10% fetal calf serum in the presence of 5U/ml Interleukin-2. The co-cultures were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, up to 24 days. Culture medium was changed each three to four days and fresh donor cells were added on the 7th and on the 14th days. Co-cultures were monitored for the presence of the p24 antigen each three to four days and the positive supernatants were saved as virus stock.

HIV-1 isolates were biologically characterized using the methodology described elsewhere (WHO *loc. cit.*). Briefly, positive supernatants from primary cultures were used as the virus source to infect MT-2 cell lines. These cultures were monitored twice a week for p24 antigen and daily for syncytium formation. The isolates were also analyzed by heteroduplex mobility assay (HMA) in order to determine the subtypes of HIV-1 (E Delwart et al. 1993 *Science* 262: 1257-1261). The HIV-1 neutralization assay was performed following the techniques described previously (J Albert et al. 1993 *AIDS Res Hum Retroviruses* 9: 501-506).

The age, sex, presumed mode of transmission, clinical status of the patients, as well as results of HIV-1 isolation are shown in Tables I and II. The majority of the patients were males (75%). The age ranged from 15 to 61 years. Concerning the possible transmission route, 50% were male homosexual and/or bisexual, 43% were heterosexual, and in 6.25% the mode of transmission was undetermined. We isolated HIV-1 in 12 out of 16 (75%) samples. The p24 antigen was always detected within 12 days of co-culture. Preliminary results of biologic characterization show that seven isolates induced syncytium formation in primary co-culture (PBMC) but only three of them induced syncytium in MT-2 cell line (Table II). Only one isolate induced syncytium in MT-2 cell line alone. The rate of virus isolation and the frequency of syncytium inducing (SI) isolates were higher than that observed in a previous study (WHO *loc. cit.*), which could be due to the variation of the clinical status of our patients. The genetic analyses of 11 samples using HMA revealed that 10 were B and 1 was F subtypes confirming previous studies.

Neutralization assays, carried out according to standard techniques in pre-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Albert et al. *loc. cit.*) indicate that two of seven isolates tested were neutralized to at least 75% by their autologous plasma (28.6%) and a third isolate was neutralized to 50%. Six of the seven isolates (85.7%) were neutralized by at least one heterologous plasma from Brazilian HIV-1 infected individuals. Of 11 plasma evaluated as to their potency in neutralizing heterologous primary Brazilian HIV-1 isolates,

TABLE I  
Epidemiological and clinical data and CD<sub>4</sub><sup>+</sup> cell counts from individuals from Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Patients	Sex	Age	PTR <sup>a</sup>	Clinical status	CD4/mm <sup>3</sup>
RJ001-95	M	35	homo	asympt	670
RJ002-95	M	28	bi	AIDS	519
RJ003-95	M	15	homo	asympt	379
RJ004-95	M	61	?	AIDS	<50
RJ005-95	M	58	homo	AIDS	191
RJ006-95	M	26	hetero	asympt	ND
RJ007-95	F	30	hetero	asympt	673
RJ008-95	F	42	hetero	asympt	473
RJ009-95	F	43	hetero	asympt	ND
RJ010-95	M	37	hetero	asympt	612
RJ011-95	M	49	bi	asympt	1098
RJ012-95	M	28	homo	asympt	330
RJ013-95	M	45	hetero	asympt	1191
RJ014-95	M	53	bi	asympt	115
RJ015-95	M	32	bi	asympt	549
RJ016-95	F	48	hetero	asympt	689

a: presumed transmission route (homo= male homosexual; bi= male bisexual; hetero= heterosexual)

nine (82%) were able to neutralize 75% of at least one isolate. All isolates tested (7/7 = 100%) were susceptible to > 75% neutralization by a pool of plasma from the patients involved in this study. Of 12 plasma tested, nine (75%) were able to neutralize the reference isolate HIV-1 MN. These preliminary results indicate that one of the isolates (RJ95006) appears to be quite resistant to neutralization (autologous and heterologous), while another isolate (RJ95005) appears to be highly susceptible to neutralization, with all other isolates showing intermediate susceptibility. In summary, neutralization of Brazilian primary HIV-1 isolates appears to be similar to neutralization of other primary HIV-1 isolates described in the United States (PD Souza et al. 1995 *AIDS* 9: 867-874, JP Moore et al. 1995 *J Virol* 69: 122-130) and Europe (Eva-Maria Fenyo 1994 personal communication and 9ème col Cent gardes 103-107).

Some of the individuals enrolled in this pilot study did not fulfill the inclusion criteria required to participate in this research project. Most of them were infected for more than two years, including two cases of AIDS with CD4 cell counts below 200 cells/mm<sup>3</sup>. In addition, some of them were under antiviral treatment. Thus, it is important to point out that the recruitment of individuals not strictly meeting the inclusion criteria in this study, such as: (a) be a recent seroconverted or to have less than two years of infection; (b) have CD4 cell counts above 200 cells/mm<sup>3</sup> and (c) not be under

TABLE II

Genetic and phenotypic characterization of HIV-1 isolates from individuals from Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Patients	HIV isolation	CPE <sup>a</sup>		TCID <sup>b</sup> 50%	Neutralization			Subtypes HMA <sup>e</sup>
		PBMC	MT-2		Susceptibility <sup>c</sup>		Potency <sup>d</sup>	
					aut	het	het	
RJ001-95	Y	+	+	<2	NA	NA	+	B
RJ002-95	Y	+	-	50	+	+	+	B
RJ003-95	Y	+	-	<2	NA	NA	+	F
RJ004-95	Y	+	-	750	-	+	+	B
RJ005-95	Y	-	-	750	+	+	+	B
RJ006-95	Y	-	+	250	-	-	+	B
RJ007-95	N	-	-	NA	NA	NA	ND	B
RJ008-95	N	-	-	NA	NA	NA	ND	B
RJ009-95	Y	+	-	30	-	+	-	B
RJ010-95	Y	+	+	50	-	+	-	B
RJ011-95	Y	-	-	10	NA	NA	+	B
RJ012-95	Y	+	+	ND <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND
RJ013-95	N	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
RJ014-95	Y	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
RJ015-95	Y	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
RJ016-95	N	-	-	ND	ND	ND	ND	ND

a: cytopathic effect (in PHA activated peripheral blood mononuclear cells and in MT-2 cells), as measured by the presence or not of multinucleated giant cells (syncytia)

b: TCID = tissue culture infectious dose 50%

c: susceptibility of primary HIV-1 isolates to neutralization by autologous (aut) and heterologous (het) sera from Brazilian HIV-1 infected individuals.

d: potency of the sera from these individuals in neutralizing heterologous (het) primary Brazilian isolates.

e: heteroduplex mobility assay

f: not available

g: not done

antiviral treatment, could jeopardize the information required for future vaccine efficacy trials.

Nevertheless, this pilot study has demonstrated the feasibility of the BNHIC, as well as the possibility of the HMA usage for large scale molecular epidemiological studies in Brazil. This will enable us to establish a sentinel surveillance on the prevalence and the dynamic of different HIV-1 genetic

subtypes in various population groups in Brazil.

Finally, we should emphasize that a well organized and integrated national effort is of paramount importance for establishing a successful surveillance system to monitor HIV-1 diversity on a nationwide scale.

*Acknowledgements:* to the technical assistance of Mrs Jurema Carrilho.

# HIV-1 Diversity in Brazil: genetic, biological and immunological characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites

## Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization\*

### \*Participants of the Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization:

Bongertz V<sup>1</sup>, Bou-Habib DC<sup>2</sup>, Brígido LFM<sup>3</sup>, Caseiro M<sup>4</sup>, Chequer PJN<sup>5</sup>, Couto-Fernandez JC<sup>2</sup>, Ferreira PC<sup>6</sup>, Galvão-Castro B<sup>2</sup> \*\*, Greco D<sup>7</sup>, Guimarães ML<sup>1</sup>, Linhares de Carvalho MI<sup>8</sup>, Morgado MG<sup>1</sup>, Oliveira CAF<sup>9</sup>, Osmanov S<sup>10</sup>, Ramos CA<sup>11</sup>, Rossini M<sup>3</sup>, Sabino E<sup>12</sup>, Tanuri A<sup>11</sup>, Ueda M<sup>9</sup>

- <sup>1</sup> Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular, Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, (IOC), Fundação Oswaldo Cruz, (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ.
- <sup>2</sup> Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, (CPqGM), FIOCRUZ, Salvador, Bahia, BA.
- <sup>3</sup> Laboratório de Retrovirus, Instituto Adolfo Lutz, (IAL), São Paulo, SP.
- <sup>4</sup> Centro de Referência de AIDS, Secretaria Municipal de Saúde, Santos, São Paulo, SP.
- <sup>5</sup> Coordenação Nacional de DST/AID, Ministério da Saúde, Brasília DF.
- <sup>6</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, (UFMG), Belo Horizonte, (BH), MG.
- <sup>7</sup> Serviço de Imunodeficiências, DIP, Faculdade de Medicina, UFMG, BH, MG.
- <sup>8</sup> Ambulatório do Banco da Providência, Arquidiocese do Rio de Janeiro, RJ.
- <sup>9</sup> Seção de Sorologia, IAL, São Paulo, SP
- <sup>10</sup> Joint United Nations' Programme on HIV/AIDS, Geneva, Switzerland, UNAIDS
- <sup>11</sup> Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, RJ.
- <sup>12</sup> Fundação Pro-Sangue/Hemocentro de São Paulo, SP. Serviço de Microbiologia, IAL, São Paulo, SP.

### Running title: HIV-1 diversity in Brazil

\*\* Corresponding author: Bernardo Galvão-Castro, Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, CEP 40.295-001, Salvador, BA, Brazil. Fax: 5571/356-2255; Tel: 55-71/356-8822, ext. 213, 242. e-mail: bgalvao@cpqgm.fiocruz.br



**ABSTRACT**

The Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization was established for the surveillance of HIV variability in Brazil. Here we report characterization of HIV strains and virus-specific immune responses from thirty-five clinical samples collected from three potential HIV vaccine sites. Three genetic subtypes of HIV-1 were identified by HMA: B (in 82.9% of the samples), F (14.3%) and C (2.9%). Phylogenetic analysis based on the C2V3/*env* DNA sequence from all of 25 specimens examined was 100% concordant with the HMA results. Four variants of subtype B with different tetrapeptides at the tip of the V3 loop were found: the GPGR motif (North American), GWGR motif (Brazilian B<sup>tr</sup>), and two minor variants, GFGR and GPGS, as previously detected. No significant association was found between HIV-1 subtypes and the mode of transmission or biological properties of HIV-1 isolates (derived from 88.6% of the specimens). Only 5 out of 16 isolates studied were neutralized by the autologous sera. Consistent with previous results, no relationship between viral subtype and peptide ELISA seroreactivity or neutralization was evident. This study also demonstrated the effectiveness of the collaborative approach by Brazilian scientists when addressing a complex subject such as HIV variability.

**Key words:** HIV-1; polymorphism- molecular epidemiology - Brazil

## INTRODUCTION

As of December, 1998 more than 47 million people have become infected with HIV.<sup>1</sup> Brazil represents one of the most affected Latin American countries with more than 0.5 million people living with HIV/AIDS.<sup>1,2</sup> In this country, only the HIV-type 1 (HIV-1) has been clearly detected so far<sup>3</sup> and the evolution of the HIV epidemic reflects global trends. Initially, HIV transmission occurred primarily among men who have sex with men (MSM); during the second phase, drug injection played an important role and, at present, an increasing heterosexual spread of HIV-1 is observed.<sup>4</sup>

The HIV pandemic is heterogeneous and one of the factors that may have an impact on the epidemic evolution is related to the extensive variability of HIV.<sup>5-8</sup> Genetic analyses of HIV-1 has resulted in classification into at least 8 genetic subtypes, designated from A to J and 4 circulating recombinant forms (A/E, A/G, A/I/G and A/B) which constitute a major group (M-group)<sup>9,10</sup> Two additional groups, highly divergent from HIV-1 M group were later identified and termed the O (outliers)<sup>11,12</sup> and N (non-M and non-O) groups.<sup>13</sup> In addition, genetic recombination between different M subtypes has been recognized as an important factor for the emergence of mosaic viral forms with unpredictable antigenic and biological properties.<sup>14-18</sup> Recent reports provide evidence that recombinant HIV-1 strains also play a visible role in regional sub-epidemics.<sup>19,20</sup>

The HIV-1 subtype B has predominated in the spread of HIV-1 in most Latin American and Caribbean countries, including Brazil,<sup>21</sup> but an increasing number of non-B infections (e.g., subtypes F, C, D, E<sup>22-29</sup> B/F recombinant<sup>14,16</sup> and mixed HIV-1 infections<sup>30</sup>) are being reported in these regions. In Brazil, subtype B is the most prevalent, but many Brazilian subtype B samples present a GWGR motif at the top of the V3 loop (B''),<sup>22-24, 29, 31,32</sup> whereas the GPGR motif is

found in most North American and European strains. With the objective of establishing an effective system to monitor the HIV-1 variability, a Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization was created, and this paper presents results of this national collaborative effort.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization (BNHIC)***

The BNHIC is organized on a three-tier basis, including primary sites, a central reference laboratory, and secondary laboratories, paralleling the organization of the comparable UNAIDS program<sup>24</sup>. The primary sites comprised the states of Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), and São Paulo (SP), which were responsible for the selection of volunteers, collection and shipment of samples to the central laboratory at the Advanced Laboratory of Public Health (LASP), CPqGM, FIOCRUZ in Salvador, Bahia. The central laboratory was responsible for HIV-1 isolation, expansion of viral stocks and distribution of samples to secondary laboratories. Biological, immunological and genetic characterization of HIV-1 strains was carried out by the secondary laboratories at: (1) AIDS and Molecular Immunology Laboratory, IOC, FIOCRUZ, RJ; (2) LASP, CPqGM, FIOCRUZ, Salvador, BA (3) Laboratory of Molecular Virology, UFRJ, RJ; (4) Laboratory of Retrovirology and Microbiology Services, Adolfo Lutz Institute SP (5) Virus Laboratory, UFMG, MG

### ***Patient selection and blood collection***

Blood samples were randomly collected from 35 HIV seropositive patients at: (i) AIDS Reference Center, Santos, SP (n = 8); (ii) Providence Bank Outpatient Clinic, RJ (n = 22); and (iii) University of Minas Gerais Outpatient Clinic, MG (n = 5). From each patient, after a signed informed consent, 40ml of EDTA-anticoagulated blood and 10ml of blood without anticoagulant

were collected in Safety Monovette syringes (Sarstedt, Germany), and shipped at ambient temperature to the central laboratory within 24 hours of blood donation. Samples were labeled using the WHO/UNAIDS nomenclature system.<sup>33</sup>

HIV serology was carried out by ELISA and Western Blot. CD4<sup>+</sup> T cells were counted by flow cytometry (Epics XL, Coulter Co, FL, USA, at the RJ and MG sites, and Facscount, Becton-Dickinson, CA, USA, in SP). Viral load was measured by NASBA (Organon, Holland) in plasma samples frozen at -70°C within 24 hours of blood collection.

#### ***Preparation of complete sets: sample processing, virus isolation and expansion***

HIV-1 isolation and expansion were performed according to WHO/UNAIDS Guidelines.<sup>34</sup> Viral growth was monitored by p24 antigen production (DuPont, DE, USA) every 3-4 days, and positive supernatants were saved and further expanded by infecting new batches of PHA-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from normal donors.

#### ***Biological Characterization***

Syncytium inducing (SI) and non-syncytium inducing (NSI) phenotypes were determined by infecting the T CD4<sup>+</sup> tumor cell line MT-2, as previously described.<sup>24, 34</sup> In brief, primary culture supernatants containing 5 ng/ml of p24 were incubated with 5x10<sup>4</sup> MT-2 cells in flat-bottom microtiter plates, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and monitored for cytopathic effects every 2-3 days, under microscopic observation

#### ***Genetic characterization: HIV-1 genetic subtyping, nucleotide sequence and phylogenetic analyses***

DNA was extracted from uncultured PBMC using the proteinase-K sodium dodecyl sulphate method, followed by phenol/chloroform extraction, and amplified by nested PCR using primers:

as described elsewhere.<sup>35,36</sup> HIV-1 *env* genetic subtypes were also determined by Heteroduplex mobility assay (HMA), using a HMA/HIV-1 Subtyping Kit.<sup>36</sup> Brazilian subtype B variant (B<sup>''</sup>) was identified based on the restriction fragment length polymorphism (RFLP) upon digestion with Fok I restriction enzyme.<sup>29,31,32</sup> PCR products were directly sequenced, using ED31, ED33 and ES7 oligonucleotides as sequencing primers, and the dideoxy chain termination method (Sequenase<sup>TM</sup> Version 2.0, Amersham Life Science, USA). Sequence data were analyzed using Sequencher 3.0 (Gene Codes Corp., MI, USA). For subtype determination, nucleic acid *env* C2-V3 sequences were trimmed to 345nt and aligned with sequences representative of the HIV-1 group M subtypes available in the Los Alamos database.<sup>10</sup> Alignments were generated using DNASIS version 2.1 software (Hitachi) and manually edited in order to introduce gaps to maintain alignments. Phylogenetic analysis was performed using the Phylip software package (University of Washington, WA, USA).<sup>37</sup> Evolutionary distances were estimated using Dnadist (Kimura two-parameter method), and phylogenetic relationships were determined using Neighbor (neighbor-joining method).<sup>38</sup> Reproducibility of branching patterns was assessed using Seqboot (bootstrap method; 100 replicates), and a consensus tree generated using Consense. The sequence of CPZgab was used as the outgroup.

### *V3-peptide seroreactivity*

V3-peptide seroreactivity was tested in an indirect enzyme-binding immuno assay (EIA),<sup>39,40</sup> using a panel of 14/15-meric biotinylated peptides, each based on consensus V3 sequences for the following HIV-1 subtypes: A (KSVHIGPGQAFYAT), B (NTRKSIHIGPGRAFY), B<sup>''</sup>(NTRKSIHMGWGRAFY), C (KSIRIGPGQTFYAT), D (RQRTHIGPGQALYTT), F (RKSIHLGPQAFYTT), and F<sub>Br</sub> (NTRKSIPLGPGRAFY). These peptides (with 70% purity) were purchased from Chiron Mimotopes, CA, USA. Briefly, the EIA protocol was based on

binding the biotinylated V3 peptides onto streptavidin-coated microtiter plates (Nunc, Denmark), followed by the addition of 100 $\mu$ l of serially diluted plasma samples. The plates were incubated for 1 hour at 37°C, and overnight at 4°C. Bound antibodies were detected with peroxidase-labeled goat anti-human IgG conjugate, and TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate. A pool of normal human plasma was used as a negative control to determine cut off values.

### *Neutralization assay*

Neutralization assays were run simultaneously with TCID<sub>50</sub> titration, using the same donor PBMC and supernatants from expanded cultures as described before.<sup>41,42</sup> Neutralization was evaluated by the reduction of HIV-1 p24 production (DuPont, DE, USA) in the culture supernatants on day 7. Neutralization was considered positive when p24 production was reduced by more than 75% compared to the quadruplicate TCID<sub>50</sub> titration control wells of the same viral dilution. The inhibitory potency of the sera was determined through neutralization assay using the laboratory adapted-isolate MN.

### *Statistical analysis*

Fisher's exact test for two-sided tail value was used. ( GraphPad [In Stat tm] Software), 1994. Statistical significance was defined as p<0.05 values.

## RESULTS

### *Patients: demographic, epidemiological, clinical and laboratory data*

Table 1 summarizes the demographic, epidemiological, clinical and laboratory data of the patients. The age distribution of patients ranged from 15 to 61 years old (average 37.4). Infection with HIV-1 occurred through homosexual (n=14; 40%), bisexual (n=7; 20%) and heterosexual (n=14; 40%) activities. Most of the samples (n=30) were obtained from asymptomatic individuals with CD4<sup>+</sup> T-cell counts ranging from 115 to 1191 cells/mm<sup>3</sup>, and viral loads varying from <0.4 to 980 x 10<sup>3</sup> mRNA copies/ml. Five samples were obtained from AIDS patients. Patients 95BRRJ005, 95BRRJ009, 95BRRJ012, 95BRRJ022 and 95BRSP003 were receiving antiretroviral therapy at the time of blood donation.

### *HIV-1 genetic characterization: HIV-1 genetic subtyping and nucleotide sequence analysis*

The HIV-1 C2V3/*env* region was amplified from the PBMC of all 35 samples and used for HMA subtyping. Three different subtypes were found (Table 2): subtype B was predominant (29/35; 82.9%), followed by subtype F (5/35; 14.3%) and one case of subtype C infection (2.8%). No evidence for geographic or sexual bias for representation of subtypes was apparent, subtype B strains were found in 20 men and in 9 women, subtype F infections were detected in 4 men and 1 woman, while the only subtype C infection was found in a woman from SP.

Nineteen subtype B samples and all non-B isolates were chosen for the C2V3/*env* sequence. Phylogenetic analysis (Fig. 1) was performed for a subset of 13 B and 5 non-B subtype sequences. The subtype assignments based on the C2V3/*env* sequences were in 100% agreement with HMA-subtyping results (Table 2). The highest sequence heterogeneity in the C2V3 region

was observed among subtype B isolates with an average divergence of 21% (range: 4 – 33%), two times higher than for subtype F isolates (average 10.5%, range: 3.8 - 13.5%).

The crown of the V3 loop of the subtype B sequences (Fig. 2) revealed at least 4 distinct variants. The most prevalent variant had a GWGR tetrapeptide at the tip of the loop (B<sup>1</sup>), found in 8 out of 19 analyzed, (42%), followed by the GPGR motif (7; 37%), common among North American and European subtype B strains. GPGS (10.5%) and GFGR (10.5%) motifs were also documented in 2 cases each. All four subtype F samples had the GPGR motif, which distinguishes the Brazilian subtype F strains (F<sub>Br</sub>) from those of the same subtype described in other geographic regions.<sup>43</sup> The only subtype C isolate has a GPGQ tetrapeptide at the tip of the V<sub>3</sub> loop, which is conserved throughout subtype C<sup>9,10</sup>

#### ***HIV-1 isolation and biological characterization***

The results of HIV-1 isolation and biological characterization are shown in Table 2. Virus isolation efficiency was 88.6% (31/35). Three of the four HIV-1 culture negative samples were from patients with very low viral load levels (<0.4; 0.47 and -0.56 x 10<sup>3</sup> mRNA copies/ml) (Table 1). Samples from antiretroviral treated patients had viral load varying from < 0.4 to 160 x 10<sup>3</sup> mRNA copies/ ml and all of them were positive in HIV-1 co-culture. Most co-cultures (29/31) became positive in less than 9 days and reached peaks of p24 production by day 14, although replication patterns varied widely. Some isolates had a suggestive “rapid/high” replication phenotype, replicating quickly and to high titers in primary and secondary expansion cultures, reaching high levels of p24 production (range: 76-209 ng/ml). 35% of the isolates did not produce high levels of virus in primary or secondary expansion cultures, showing a suggestive “slow/low” replication pattern<sup>24</sup>. No differences were evident between subtype B and non-B isolates in isolation efficiency and replication patterns. 84% of the isolates (26/31) had the



NSI biological phenotype on MT-2 cells, including 4 of the 5 from AIDS patients. Five isolates had the SI phenotype, 1 from an AIDS patient, and 4 from asymptomatic patients. Three of the latter had relatively high CD4<sup>+</sup> T cells counts (258, 498 and 612 CD4<sup>+</sup> T cells/mm<sup>3</sup>). However, a parallel was found between the SI phenotype and virus replication patterns *in vivo* and *in vitro*, as indicated by high plasma viral load in three of them (61, 140 and 280 x 10<sup>3</sup> mRNA copies/ml) and high levels of HIV-1 p24 antigen production in culture (range: 120- 209 ng/ml). All non-B isolates had the NSI phenotype and, in general, grew poorly in culture, releasing low levels of P24 antigens, during the isolation procedure (data not shown). The SI phenotype of the cultured viruses were not associated with the presence of basic amino acids at positions 11, 24 or 25 of the V3 loop<sup>24,44</sup> (Fig. 2).

### ***V3 peptide seroreactivity***

The presence and specificity of antibodies to consensus V3-peptides representing 5 subtypes of HIV-1 (B/B", C, F/F<sub>Br</sub> as shown in table 2, and peptides A and D, data not shown) were determined using plasma from all 35 subjects. Antibodies specific for the A peptide were detected in plasma samples from 95BRRJ015 and 96BRMG001, while antibodies with specificity for peptide D were not detected. Relative to the genotypic characterization results, recognition of homologous peptides was detected in plasma from 85% (17/20) of B, 9/9 of B" 5/5 of F (3/5 with peptide F and 2/5 with peptide F<sub>Br</sub>), and the C plasma recognized the C peptide. However, 15/20 B plasma also recognized the F peptide and 5/5 F plasma reacted with the B peptide. Only 3 plasma had monospecific reactivity, all B" plasma, recognizing only the B" peptide, and a further 5 B" plasma had relatively higher anti- B" than F peptide reactivity. All other plasma had at least dual reactivity and could not be serotyped.

### *Neutralization analysis*

Eighteen of the 31 primary isolates were grown to sufficiently high titers ( $>20$  TCID<sub>50%</sub>/ml) to have their susceptibility to neutralization determined (Table 2). Autologous neutralization was observed in seven out of 18 assays (7/18, 39%) virus/plasma pairs, with lowest autologous neutralization for isolates from São Paulo (0/3, versus 4/12 from Rio de Janeiro and 3/3 from Minas Gerais). The Minas Gerais plasmas showed lowest potency in neutralizing the reference HIV-1 isolate MN (0/5 versus 15/22 for Rio de Janeiro ( $p=0.0098$ ) or versus 7/8 for São Paulo ( $p=0.0047$ ). The results obtained in the heterologous neutralization assays indicate a high cross-neutralization for B and F primary isolates, agreeing with the seroreactivity data (Table 3). In contrast, the results show a very low susceptibility of the B<sup>''</sup> variant isolates to B and F plasma. Some plasma were unable to neutralize any of the primary isolates tested, neutralizing only the reference T-cell line adapted MN isolate. The subtype C isolate did not grow to sufficient infectious titers to be evaluated by neutralization. However, the subtype C plasma was able to neutralize the only one B isolate tested and the reference HIV-1 MN isolate.

Comparison of heterologous neutralization results (Table 3) with V3 peptide serotyping (Table 2) indicated no consistent correlation. For example, while plasma 95BRRJ005 neutralized 2 B clade HIV-1 isolates, and bound to the B synthetic peptide, plasma 95BRRJ012, while able to bind to the synthetic peptide, was unable to neutralize any of 2 B isolates tested. A similar lack of correlation was observed for the B<sup>''</sup> and F peptides.

### **DISCUSSION**

The HIV-1 subtype B is the most prevalent in Brazil and, along with subtype F, is widely spread in this country<sup>21,23,24,29,45</sup>. Up to now, cases of subtype C have been detected only in the South and Southeast of the country.<sup>24,46</sup> Geographical spreading of non-B subtypes is also being reported in

other Latin American countries, such as Argentina<sup>26-27</sup> and Bolivia,<sup>28</sup> indicating the intermixing between sexual networks in various Latin American countries. In the present study, two HIV-1 subtypes, B and F, were detected in three vaccine evaluation sites, while the C subtype was detected only in São Paulo. Also, HMA results were 100% concordant with subtype assignment based on proviral C2V3/env sequences, confirming reliability of HMA for molecular epidemiology studies.<sup>24</sup> It should be taken into account that the HMA/sequence strategy based on the C2/V3 env region prevents the detection of recombinants virus. Thus, to accurately search for recombination other regions of the viral genome should be analyzed. The highest sequence heterogeneity in the C2V3/env region was observed among subtype B viruses with an average dispersion of 21%. An increase of intra-subtype B heterogeneity over the past 5 years, could be seen when compared to data (13.5%) from previous study conducted in Brazil<sup>10,23</sup>. Although the Brazilian B" variant sequences could be segregated in a separate branch in the phylogenetic analysis, the intra-subtype heterogeneity of subtype B strains did not show any significant difference in the diversity among B" and B isolates, suggesting that both variants emerged in Brazil at approximately the same time period. The overall genetic diversity of subtype F isolates was nearly 2 times lower (10.5%), than the overall diversity of subtype B strains (21%), indicating a later introduction of the F subtype in Brazil. The amino acid sequence analysis of HIV-1 isolates in this study showed a large prevalence (42%) of variant subtype B (B") strain with the GWGR tetrapeptide. The GPGR sequence, characteristic of the North American subtype B, was also frequently found, in 37% of cases. Similar proportion between the two subtype B variants was reported in previous studies,<sup>22-24,29,31-32</sup> suggesting that the frequency and proportion between the two subtype B variants has been maintained over time. These data are in contrast with the situation described in Thailand, where a rapid shift between the original B strains and newly emerging local variants with a different V3 loop (GPGQ-motif) was observed.<sup>10, 47-48</sup>

Indeed, the origin of the GWGR variant in Brazil is not yet clear. This variant was first reported in 3 out of 29 isolates from Japan,<sup>49</sup> one of which was obtained from a woman who had emigrated from South America. However, based on the average dispersion (20%) of the B” isolates documented in the present study, this variant seems to have been present in Brazil since the beginning of the AIDS epidemic in this country.

All subtype F sequences described in our study contained the GPGR motif. The GPGQ signature sequence, occasionally observed in Brazilian F viruses and in all Romanian F viruses<sup>43</sup>, was not found in the subtypes we studied, with the exception of subtype C, in agreement with previous descriptions of this subtype in Brazil<sup>24</sup>

The V3-peptide seroreactivity studies have shown a very close antigenic relationship and an extensive cross-reactivity between subtypes B and F, similar to the previously reported cross-reactivity between subtypes A and C.<sup>24,39,50</sup> These observations confirm that there is no strict correlation between genetic subtypes and V3 serotypes, at least using the current V3 peptides and assay format.

The biological characterization results demonstrated that primary isolates of HIV-1 exhibit a broad range of biological variability. Even though it was not possible to correlate genetic subtypes with biological phenotypes, several interesting observations could be made. First, all cases of non-B infections described here were associated with the NSI phenotype. The subtype B isolates included the majority of NSI strains, and all SI viruses were found within subtype B group. These results corroborate that HIV-1 isolates with an NSI biological phenotype are the most frequently transmitted viruses, independent of their genetic subtype. Second, HIV-1 isolates with the NSI phenotype can vary broadly with regard to their replication capacity, since all NSI isolates were characterized by unique replication patterns both *in vivo* and *in vitro*. In addition,

regarding to the coreceptor usage, preliminary results demonstrated that the great majority of them use CCR5 as the co-factor for infecting the target cells<sup>510</sup>. Other studies, including recently developed technologies to analyze the role of host genetics and sensitivity to chemokines, will be helpful to better characterize these isolates.<sup>7</sup> An association between NSI biological phenotype and the absence of basic amino acids at positions 11 and 25 was verified. However, positive amino acids at those positions were not seen in either of the two SI isolates sequenced.

The HIV-1 neutralization experiments confirm the previously reported data about the lack of correlation between genetic subtypes and neutralization serotypes.<sup>52,53</sup> Subtypes B and F appear to be very closely related immunologically. However, our present data indicated very low susceptibility of the variant B” isolates against the B and F plasma. These data do not corroborate previous results. Indeed, we, recently, demonstrated similar levels of susceptibility of B isolates against B and B” plasma<sup>42</sup>. The discrepancy in results could be due to a few numbers of samples analysed in our present study. These findings suggest that intrasubtype B variability, specifically in the V3 region, is not a major obstacle for HIV neutralization, since cross-neutralization patterns could be observed between HIV-1 isolates belonging to different genetic variants of subtype B strains in Brazil<sup>42</sup>. In order to confirm that the HIV-1 intrasubtype and intersubtype genetic variability should not represent an insurmountable problem for HIV vaccine protection, more extensive cross neutralization studies are in progress using stored biological material from individuals participating in the present study

Finally, this study has demonstrated the feasibility of BNHIC. Future directions for further development of the Brazilian Network should include an epidemiology surveillance to encompass the totality of Brazilian territory, studies of association of HIV-1 subtypes with modes of transmission and risk factors, and the establishment of a surveillance system to monitor the

emergence of drug resistant strains. This strategy would allow the most beneficial progress in the extremely complex area of HIV/AIDS-related research.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was partially supported by WHO/GPA Global Programme on AIDS, UNAIDS, Brazilian Ministry of Health STD/AIDS Program, AIDS Integrated Program/FIOCRUZ, National Research Council (CNPq) and Rio de Janeiro State Foundation for Research Support (FAPERJ). The HIV-1 MN gp 120 antiserum (T1-SP-10MN[A]) # 1506 obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program from B. Haynes was used as neutralization reference control.

We thank Prof. James Mullins (University of Washington, USA) for reviewing this paper; Stevenson Craig for editing; Ms Jurema Carrilho for technical support and Elisabeth Deliège-Vasconcelos for secretarial assistance.

## REFERENCES

1. UNAIDS/WHO: AIDS epidemic update: December 1998. Geneva, December 1998.
2. Caceres CF, Hearst N: HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: an update. *AIDS* 1996 (suppl A);10:S43-S49.
3. Hendry RM, Parks DE, Mello DL, Quinnan GV and Galvão-Castro, B. Lack of evidence for HIV-2 infection among at risk individuals in Brazil, *J Acquir Immune Defic Syndr* 4(6): 623-7, 1991.
4. Aids Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS Ministério da Saúde. Ano XI nº 04. Semana Epidemiológica 35 à 47, Setembro a Novembro de 1998
5. Mann JM, Tarantola D (Eds): AIDS in the World II/The AIDS Policy Coalition. Oxford University Press. New York, 1996.
3. 6. Expert Group of the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS: Implications of HIV variability for transmission: scientific and policy issues. *AIDS* 1997;11:UNAIDS1-UNAIDS15.
- 7 Workshop Report from the European Commission (DG XII, INCO-DC) and Joint United Nations Programme on HIV/AIDS: HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics. *AIDS* 1997; 11:UNAIDS17-UNAIDS36.
8. Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA et al. The emerging genetic diversity of HIV: the importance of global surveillance for diagnostic, research and prevention. *JAMA* 1996;275:210-16.

9. Carr JK, Foley BT, Leitner T, Salminen m, Kober B & McCutchan F. Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV-1 In the Pandemic. In Kober B, Kuiken C, Foley B, Hahn B, Mellors J & Sodroski J. *Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics*. Group T-10, Mail Stop K710. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico 87545, USA, pp III-9,1998.
10. Myers G. *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, 1996.
11. Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP 5180) from Cameroon. *J Virol* 1994; 68:1581-85
12. Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Korber B et al. Variability of Human Immunodeficiency type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol* 1995;69:5640-49.
13. Simon F, Maucière P, Roques P et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Med* 1998; 4:1032-1036.
14. Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 1994;68:6340-46.
15. Robertson DL, Hahn BH and Sharp PM: Recombination in AIDS viruses. *J Mol Evol* 1995; 40:249-59.
16. Gao F, Morrison SG, Robertson DL et al. and the WHO and NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization: Molecular cloning and analysis of functional genes from



- human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *J Virol* 1996; 70:1651-1657.
17. Mc Cutchan FE, Salminen MO, Carr JK, Burke DS: HIV-1 genetic diversity. *AIDS* 1996;10 (suppl 3):S13-S20.
  18. Salminen MO, Carr JK, Robertson DL et al. Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. *J Virol* 1997; 71:2647-55.
  19. Gao F, Robertson DL, Morrison SG et al. The Heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996;70:7013-29.
  20. Bobkov AF, Pokrovskii W, Selimova LM et al. Genotyping and phylogenetic analysis of HIV-1 isolates circulating in Russia. *Vopr Virusol* 1997, 42:13-16.
  21. MAP MONITORING THE AIDS PANDEMIC. The Status and Trends of the HIV/AIDS/STD Epidemics in Latin America and the Caribbean Nov 4-5, 1997.
  22. Potts KE, Kalish ML, Lott T et al. and the Brazilian Collaborative AIDS Research group: Genetic Heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 1993,7:1191-1197
  23. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG et al. V3 region polymorphism in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtypes F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:569-575.
  24. WHO Network for HIV Isolation and Characterization: HIV-1 type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence

- analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1327-1343.
25. Artenstein AW, Coppola J, Brown AE et al. Multiple introductions of HIV-1 subtype E into western hemisphere. *Lancet* 1995;346:1197-98.
26. Campodonico ME, Fay F, Taborda M, Janssens W, Heyndrickx L, Fay O: Evidence of the presence of HIV-1 subtype "C" strains in Argentina. XI International Conference on AIDS. Vancouver, July 1996 [abstract Tua 2052].
27. Marquina S., Leitner T., Rabinovich RD, Benetucci J, Libonatti, Albert J: Coexistence of subtype B, F and B/F env Recombinant of HIV Type 1 in Buenos Aires, Argentina. *AIDS Res Human Retroviruses* 1996;12:1651-1654.
28. Velarde KG, Guimarães ML, Arevalo R, Morgado MG: Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 infected individuals from Bolivia reveals presence of two distinct genetic subtypes. 12<sup>th</sup> World AIDS Conference abs 12178, Geneve, 1998
29. Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBG et al. 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.
30. Janini LM, Pierniazek D, Peralta JM et al. Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. *Virus Genes* 1996;13: 69-81.
31. Morgado MG, Guimarães ML, Neves Jr et al. Polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998, 93: 383-386 1998.
32. Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, Duarte G and Machado AA. High frequency of the GWG

- (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1998, 19:74-79.
33. Korber BTM, Osmanov S, Esparza J, Myers G and the WHO Network for HIV Isolation and characterization: The World Health Organization Global Programme on AIDS proposal for standardization of HIV sequence nomenclature. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1355-1358.
34. Rübsamen-Waigmann H, Von Briesen H, Holmes H et al. Standard conditions of virus isolation reveal biological variability of HIV type 1 in different regions of the world. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1401-8
35. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Ruebsamen-Waigmann H, Mullins J: Genetic relationships determined by a DNA Heteroduplex motility assay: Analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257-1261.
36. Delwart EL, Herring B, Learn Jr GH, Rodrigo AG and Mullins JI: Heteroduplex Mobility analysis HIV-1 *env* Subtyping Kit. Protocol Version 3 1995, NIH AIDS Research and Reference Program.
37. Felsenstein J.: PHYLIP - Phylogeny Inference Package. *Cladistics* 1989; 5: 164-166
38. Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425
39. Bongertz V, Guimarães ML, Soares-da-Costa MFG et al. Anti-HIV-1 seroreactivity in distinct transmission risk groups *J Clin Virol* 1999, 12:37-42

40. Moore JP, Mc Cutchan FE, Poon SW, Mascola J, Liu J, Cao Y, Ho D: Exploration of antigenic variation in gp120 from clades A through F of human immunodeficiency virus type 1 by using monoclonal antibodies. *J Virol* 1994;68:8350-8364.
41. Albert J, Abrahamson B, Nagy K, Aurelius E, Gaines H, Nystrom G and Fenyö EM: Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies, after primary HIV infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 1990; 4: 107-12.
42. Bongertz V, Costa CI, Guimarães ML, Grinsztejn, The Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group, João FEC, Galvão-Castro B, Morgado MG, Neutralization susceptibility of B subtype variant B” primary isolates. *Scand J Immunol* 47:603-608,1998.
43. Bandea CL, Ramos A, Pieniazek D, Pascu R, Tanuri A, Schochetman G and Rayfield MA: Epidemiological and evolutionary relationship between Romanian and Brazilian HIV-1 subtypes F strains. *Emerging Inf Dis* 1995, 1: 91-3
44. De Wolf F, Hogervost E, Goudsmit J et al. Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1387-1400
45. Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C and Galvão-Castro B HIV-1 Subtyping in Salvador-Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1999 (in press)
46. AIDS in Brazil: a joint government and society endeavor, Geneva, June 28 – July 03, 1998  
National Program of STD/AIDS, Brasilia: ministry of Health, 1998

47. Weniger BG, Takebe Y, Ou CY and Yamasaki S: The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS* 1994; 8(suppl 2):S13-S28
48. Wasi C, Herring B, Raktham S et al. Determination of HIV-1 subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand, using peptide-binding enzyme immunoassay and Heteroduplex mobility assay: evidence of increasing infection with HIV-1 subtype E. *AIDS* 1995;9:943-49.
49. Hattori T, Shiozaki K, Eda Y et al. Characteristics of the principal neutralizing determinant of HIV-1 prevalent in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991;7:825-830.
50. Cheingsong-Popov R, Osmanov S, Pau CP et al. Serotyping of HIV infections: definition, relationship of viral genetic subtypes and assay evaluation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998, 14:311-8
51. Ferraro GA, Mello MA, Galvão-Castro B, Bou-Habib DC and The Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization. Cell tropism and chemokine receptor usage of HIV-1 Isolates prevalent in Brazil. Abstracts of the 1999 International Meeting of the Institute of Human Virology. *J Human Virology* 2:208 abs.204, 1999
52. Kostrikis LG, Cao Y, Ngai H, Moore JP, Ho DD. Quantitative analysis of serum neutralization from subtypes A, B,C,D,E,F and I: Lack of direct correlation between serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement *J Virol* 1996; 70:445-58
53. Moore JP, Cao Y, Leu J, Qin L, Korber B, Ho DD. Inter-and intracade neutralization of human immunodeficiency virus type 1: genetic clades do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp120 antigenic serotypes. *J Virol* 1996, 70 (1): 427-444

Table 1: Epidemiological, clinical and laboratorial data from Brazilian individuals selected in the three evaluation sites.

Patients	Sex	Age	PTR <sup>a</sup>	Clinical Status	TCD <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup>	Viral Load (x 10 <sup>3</sup> mRNA <sup>-</sup> copies/ml)
95BRRJ001	M	35	Homo	Asympt	670	24
95BRRJ002	M	28	Bi	AIDS	519	85
95BRRJ003	M	15	Homo	Asympt	ND <sup>b</sup>	190
95BRRJ004	M	61	Homo	AIDS	<50	980
95BRRJ005	M	58	Homo	AIDS	191	160
95BRRJ006	M	26	Hetero	Asympt	ND	260
95BRRJ007	F	30	Hetero	Asympt	673	<0.4
95BRRJ008	F	42	Hetero	Asympt	473	0.56
95BRRJ009	F	43	Hetero	Asympt	ND	<0.4
95BRRJ010	M	37	Hetero	Asympt	612	61
95BRRJ011	M	49	Bi	Asympt	1098	4.8
95BRRJ012	M	28	Homo	Asympt	330	77
95BRRJ013	M	45	Hetero	Asympt	1191	190
95BRRJ014	M	53	Bi	Asympt	115	370
95BRRJ015	M	32	Bi	Asympt	549	27
95BRRJ016	F	48	Hetero	Asympt	689	0.47
95BRRJ017	M	39	Homo	Asympt	275	800
95BRRJ018	F	42	Hetero	Asympt	1115	8.7
95BRRJ019	F	31	Hetero	Asympt	657	24
95BRRJ020	M	30	Homo	Asympt	553	42
95BRRJ021	M	38	Bi	Asympt	ND	860
95BRRJ022	M	41	Bi	AIDS	ND	8.2
95BRSP001	F	24	Hetero	Asympt	ND	280
95BRSP002	F	46	Hetero	Asympt	409	55
95BRSP003	F	56	Hetero	Asympt	258	<0.4
95BRSP004	F	21	Hetero	Asympt	303	20
95BRSP005	M	41	Bi	Asympt	328	22
95BRSP006	F	46	Hetero	Asympt	198	180
95BRSP007	M	41	Homo	Asympt	498	140
95BRSP008	M	35	Homo	AIDS	348	ND
96BRMG001	M	51	Homo	Asympt	599	250
96BRMG002	M	22	Homo	Asympt	344	130
96BRMG003	M	29	Homo	Asympt	351	55
96BRMG004	M	30	Homo	Asympt	1071	ND
96BRMG005	M	18	Homo	Asympt	708	43

<sup>a</sup>: Presumed transmission mode (Homo= male Homosexual; Bi= male bisexual; Hetero= Heterosexual) <sup>b</sup>: not done

Table 2: HIV-1 Isolation, genotype, phenotype, seroreactivity and neutralization from Brazilian individuals

Patients	HIV isolation <sup>1</sup>	Genotype <sup>2</sup>	Phenotype <sup>3</sup>	SEROREACTIVITY <sup>4</sup>					NEUTRALIZATION <sup>5</sup>	
				B	BRW	F	FBR	C	Aut %	MN %
95BRRJ001	Y	B <sup>n</sup>	NSI	-	++	+	+	+	NA	98
95BRRJ002	Y	B	NSI	+	+	+	++	+	48	34
95BRRJ003	Y	F	NSI	+	+	+	ns <sup>4</sup>	-	NA	92
95BRRJ004	Y	B	NSI	+	+	+	+	-	0	8
95BRRJ005	Y	B	NSI	+	++	-	+	-	94	0
95BRRJ006	Y	B <sup>n</sup>	NSI	ns	++	-	-	-	0	84
95BRRJ007	N	B	NA	ns	+	+	-	-	NA	100
95BRRJ008	N	B <sup>n</sup>	NA	-	++	+	-	-	NA	100
95BRRJ009	Y	B <sup>n</sup>	NSI	+	+	+	+	-	0	99
95BRRJ010	Y	B <sup>n</sup>	SI	-	++	+	-	-	0	54
95BRRJ011	Y	B	NSI	++	+	-	+	+	NA	100
95BRRJ012	Y	B	NSI	+	-	+	-	-	NA	47
95BRRJ013	N	B <sup>n</sup>	NA	+	++	++	-	-	NA	83
95BRRJ014	Y	F	NSI	++	-	+	ns	-	NA	100
95BRRJ015	Y	B	NSI	++	-	+	+	+	NA	29
95BRRJ016	N	B <sup>n</sup>	NA	+	++	-	-	-	NA	100
95BRRJ017	Y	B <sup>n</sup>	NSI	-	++	-	-	-	52	100
95BRRJ018	Y	B	NSI	+	-	+	-	-	85	100
95BRRJ019	Y	B	NSI	++	-	+	-	-	81	100
95BRRJ020	Y	B	NSI	++	+	+	-	-	0	0
95BRRJ021	Y	F	NSI	+	-	+	-	+	92	100
95BRRJ022	Y	B	NSI	++	+	+	+	-	0	100
95BRSP001	Y	B <sup>n</sup>	SI	-	+	-	-	-	0	100
95BRSP002	Y	B	NSI	++	-	+	+	-	NA	100
95BRSP003	Y	B	SI	-	-	-	-	-	0	89
95BRSP004	Y	F	NSI	+	-	-	+	-	ND	0
95BRSP005	Y	B	NSI	+	+	+	ns	-	NA	83
95BRSP006	Y	C	NSI	-	-	+	-	++	NA	76
95BRSP007	Y	B	SI	+	-	+	-	-	50	100
95BRSP008	Y	B	SI	+	-	+	+	-	NA	100
96BRMG001	Y	B	NSI	+	+	+	+	+	95	23
96BRMG002	Y	B	NSI	+	+	+	+	-	NA	21
96BRMG003	Y	B	NSI	+	-	-	ns	+	90	11
96BRMG004	Y	B	NSI	ns	-	-	+	+	NA	23
96BRMG005	Y	F	NSI	+	-	-	++	+	100	73

1: Y=yes; N=no; 2: evaluated by HMA, Fok I RFLP and C<sub>2</sub>V<sub>3</sub> sequence; 3: evaluated by syncytium formation in MT2 cells (NSI = non syncytium inducing; SI = syncytium inducing); 4: seroreactivity ( See Material and Methods for peptide sequence; - = seroreactivity below 1:100; + = seroreactivity titer 1:100 to 1:400; ++ seroreactivity titer above 1:400 plasma) ns = non-specific binding, removable by 8M urea washing; aut = autologous; 5: percentage of neutralization of viral replication mediated by autologous patients plasmas on primary virus or reference isolate MN NA= not available; ND= not done;

Table 3. Comparison of heterologous neutralization activities of some of the plasma against HIV-1 Isolates belonging to subtypes B or F including the B" variant.

PLASMA*	HIV-1 Isolates/Subtype or variants				HIV-1MN
	B	B"	F		
<b>B</b>					
95 BRRJ005	89%95BRRJ002**, 100%96BRMG001	0%95BRRJ006	6%95BRRJ021, 23%96BRMG005		0%
95BRRJ012	46%95BRRJ018, 12%95BRRJ019	38%95BRRJ017	97%95BRRJ021		47%
95BRRJ019	79%95BRRJ018, 53%95BRRJ020	85%95BRRJ017	93%95BRRJ021		100%
95BRSP002	16%95BRSP003	3%95BRSP001			100%
95BRSP005	0%95BRSP003, 21%95BRSP007	38%95BRSP001			83%
96BRMG002	93%96BRMG001, 19%96BRMG003		100%95BRRJ021		21%
<b>B"</b>					
95BRRJ006	100%95BRRJ004, 100%96BRMG001		35%95BRRJ021		84%
95BRRJ009		0%95BRRJ010	81%96BRMG005		99%
95BRRJ010		0%95BRRJ009	23%95BRRJ021		54%
95BRRJ017	50%95BRRJ018	56% 95BRRJ017	16%95BRRJ021		100%
95BRSP001	5%95BRSP003, 17%95BRSP007				100%
<b>F</b>					
95BRRJ003	98%95BRRJ02, 100%95BRRJ04		87%95BRRJ21		92%
95BRRJ014	84%95BRMG01, 100%96BRMG03		100%96BRMG05		100%
95BRRJ021	75%95BRRJ19, 40%95BRRJ20	0%95BRSP001	100%96BRMG005		100%
96MGMG005	100%96BRMG001, 80%96BRMG003				73%
<b>C</b>					
95BRSP006	75%95BRSP007				76%

\* Plasma of patients harboring HIV-1 subtypes B or F or C;

\*\* Percentage of viral neutralization mediated by the heterologous plasmas.



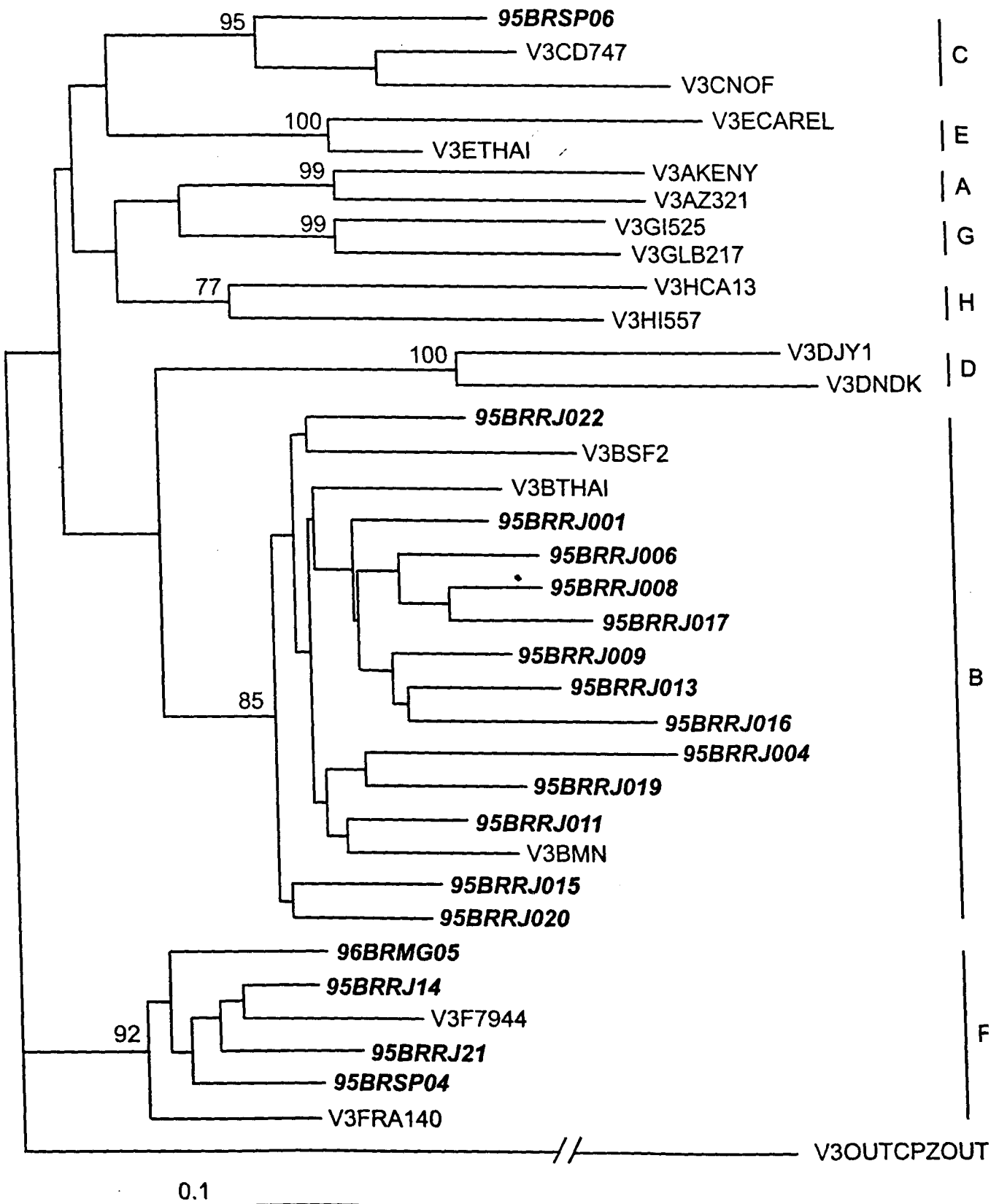
### ***LEGENDS OF THE FIGURES.***

Figure 1. Phylogenetic analysis of 18 representative Brazilian HIV isolates compared to 17 reference HIV-1 group M subtype available in the Los Alamos database. Sequence CPZgab was used as outgroup. Aligned fragments were analyzed as described in material and methods, and bootstrap values for 100 replicates are listed at the major subtype branches. Brazilian isolates sequenced in this study are highlighted and italicized. The hash mark on CPZgab indicates a truncation of actual distances. Accession numbers of the Brazilian sequences are specified in figure 2. The scale bar represent 10% divergence.

Figure 2. V3 loop amino acid sequences alignment of the new samples described in this work representing the three Brazilian vaccine sites. MN sequences was placed at the top as leading sequence of the alignment. Dashes represent amino acid identities and dots represent gaps in the sequence. Sequences belonging to subtype B (n=19), subtype F (n=4) and subtype C (n=1) are indicated. Amino acid positions 11 and 25 are boxed. GenBank accession numbers for HIV-1 sequences from Rio de Janeiro are assigned from AF060952 to AF060968; sequences 95BRSP003 and 95BRSP006 from São Paulo are assigned AF060969 and AF060970; 95BRMG003 sequence from Minas Gerais is assigned AF060971. Subtype F sequences 95BRMG005, 95BRSP004, 95BRRJ014 and 95BRJ021 are respectively assigned as AF062422, AF062423, AF062424 and AF062425.

	1	11		25	35
V3 MN	CTRPYNKRK	R	IHIGPGRFYTTK	N	IIGTIRQAHC
95BRRJ001	----N-T--	G	--L-W----A-G	E	---D---D-
95BRRJ006	----SN-T--	S	-Q--W---L-A-G	E	---D---H-
95BRRJ008	----SN-T--	S	-Q--W---L-A-G	E	---D-----
95BRRJ009	----N-T--	S	--M-W-----NG	E	---N-----
95BRRJ010	----N-T--	S	--M-W-----NG	E	---N-----
95BRRJ013	----N-T-R	S	-PM-W--TL-A-G	E	---D-----
95BRRJ016	----TN-T--	G	--M-W-T---G	E	---D-----
95BRRJ017	----N-T--	G	--M-W----A-G	E	---D---Y-
95BRRJ002	----N-T--	S	--L---T--A-G	D	---N--L-Y-
B 95BRRJ005	----N-T--	S	--L-----A-G	E	---NP-----
95BRRJ015	----N-T--	S	-P-----A-G	D	---D-----
95BRRJ019	----N-T--	S	-----A-	D	---D-----
95BRRJ020	----N-T--	S	-T-----G	E	---N-----
95BRRJ022	----N-T--	S	-QL-----A-G	E	---D--K---
96BRMG003	----N-T--	S	-T-----S.	D	---D---Y-
96BRRJ004	----N-T--	S	--F--S-M-A-G	Q	---K-----
96BRRJ011	----SN-T--	S	-----S--A-G	N	V--D-----
96BRRJ012	----N-T--	S	--M-F--L-ATG	D	---D-----
96BRSP003	----N-T--	S	-SM-F--L-A-G	E	---D-----
96BRRJ003	----N-T--	S	--L---T--A-G	D	---N--L-Y-
F 96BRRJ014	----N-T--	S	-QL-----A-G	E	---D--K---
96BRRJ021	----N-T--	S	--L-----G	E	---D--K---
96BRSP004	----N-T--	S	-HI-----A-G	E	---D--K---
96BRMG005	----N-T--	S	-P-----G	D	---D--K---
C 96BRSP006	----N-T--	S	-RI---QT--A-G	-	---D-----

4/11/00



**Documento nº 4**

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. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome and Human Retroviruses* 1999; 22(3):388-393.

Diante da necessidade de ampliação do conhecimento para outras regiões geográficas, e principalmente, em função de um aumento significativo do número de casos de AIDS em estados do nordeste brasileiro, principalmente entre indivíduos heterossexuais e usuários de drogas injetáveis (UDIs), surgiu a necessidade de se realizar estudos mais aprofundados de caracterização da variabilidade do HIV-1, em amostras provenientes desta região.

Entre os estados nordestinos, a Bahia é atualmente o estado com o segundo maior número de casos de AIDS (3.872) [Boletim Epidemiológico AIDS, Ministério da Saúde, ano XII nº3, agosto 1999], sendo a capital Salvador a cidade com maior concentração de casos. Salvador é uma cidade costeira e portuária, com elevada afluência turística de diversos países. Com uma população de aproximadamente 3 milhões de habitantes, esta cidade mostra fortes características socio-demográficas africanas, onde 90% dos indivíduos desta população mostram forte influência racial africana (Dourado e cols., 1998).

Diante desta realidade, foram coletadas amostras de HIV-1 de indivíduos mostrando diferentes formas de aquisição da infecção, com o objetivo de se determinar, primeiramente, a real prevalência dos subtipos de HIV-1 nesta região em diferentes momentos da epidemia de AIDS, além da possibilidade de elucidar a possível associação entre subtipos genéticos e via de transmissão, sexo, evolução clínica e padrão racial.

Este estudo proporcionou uma visão mais ampla da distribuição dos subtipos de HIV-1 na Bahia, além de se melhor conhecer o espectro da diversidade antigênica e genética do HIV no país. Os dados sociodemográficos desta população, além dos resultados da subtipagem genética, caracterização antigênica e sequenciamento molecular se encontram descritos no documento 4.

## HIV-1 Subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: A City With African Sociodemographic Characteristics

†J. C. Couto-Fernandez, †M. G. Morgado, †V. Bongertz, ‡A. Tanuri, §T. Andrade, ¶C. Brites, and \*B. Galvão-Castro

*Advanced Laboratory of Public Health-LASP, Gonçalo Moniz Research Center-CPqGM, Oswaldo Cruz Foundation, UNAIDS Collaborating Center, Salvador, Bahia; †Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Department of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, UNAIDS Collaborating Center, Rio de Janeiro; ‡Laboratory of Molecular Virology, Department of Genetics, UFRJ, Rio de Janeiro; §Center of Treatment of Drug Abuser-CETAD, UFBA, Bahia; ¶Laboratory of Retrovirology, Prof. Edgar Santos Hospital, UFBA, Bahia, Brazil*

---

**Summary:** To investigate the prevalence of the HIV-1 subtypes in different populations from Salvador, Bahia, Brazil, blood samples from 72 HIV-1-seropositive injecting drug users (IDUs) and 62 individuals infected sexually were analyzed using the heteroduplex mobility assay (HMA). In the IDU group, 89.5% were classified as subtype B, 3% as subtype F, and 7.5% showed a B/F HMA profile. In the sexual transmission (ST) group, 95% were identified as B subtype, 3.4% showed a B/F profile, and 1.6% a B/C/E HMA profile. All Brazilian samples that showed multiple reactivities in the HMA analysis clustered on sequencing with B North American/European HIV-1 isolates in the phylogenetic analysis, whereas the F subtypes clustered with F Brazilian HIV-1 isolates. Serologic reactivities of IDU's sera were examined using a panel of synthetic V3 loop peptides representative of the different HIV-1 subtypes. No difference in serologic reactivity between F and B subtype plasma could be observed. Predominance of HIV-1 subtype B was identified in both study groups, whereas subtype F was detected only among IDUs in a frequency lower than described for other Brazilian regions. **Key Words:** HIV-1 subtypes—Diversity—Brazil.

---

HIV-1 isolates are phylogenetically classified in three groups (M, O, and N) (1–3). The prevalent M group (major group) is classified into at least 10 genetically subtypes designed A through J, with distinct distribution in the world. The existence of these HIV-1 groups and subtypes has many important implications for the global evolution of HIV-1 and future immunoprophylaxis programs.

In Brazil, four different clades (B/B'', F, C, and D) and additional recombinant samples between subtypes B and F were identified in different geographic areas, most

obtained in the southeast region (4–10). Moreover, Brazilian subtype B samples show low levels of amino acid sequence conservation in the V3 loop, with 40% of them typically showing the GWGR motif at the crown of the V3 loop, instead of the conserved GPGR observed in the North American/European isolates and the HIV-1 prototypes currently in use for vaccine development (5). In addition, sera from Brazilian HIV-1 patients display a lower specific antibody response against V3 loop peptides of predominant HIV-1 prototypes circulating in developed countries (11). These genetic diversities could have implications for vaccine development, as well as in pathogenesis, disease progression, and virus transmission.

Bahia State is has most of the AIDS cases in the Brazilian northeastern region with 3458 cases reported through February 1999 (12). Most were detected in men

---

Address correspondence and reprint requests to J. C. Couto-Fernandez, Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Department of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil 21045-900; email: coutofer@gene.dbbm.fiocruz.br.

Manuscript received March 15, 1999; accepted July 29, 1999.

who have sex with men (MSM), followed by injecting drug users (IDUs), however, an increase in the number of cases in heterosexual individuals has been observed in the later years (12). Most AIDS cases are concentrated in Salvador City, which is a seaside city with 2,500,000 habitants, most of African descent, with a high frequency of tourists coming from different continents. Moreover, this city displays several sociodemographic characteristics of large African or Haitian cities. Recent data from a cross-sectional study from this region showed a seroprevalence of 44.1% of HIV infection in IDUs, as well as, a high frequency of HTLV-1/II infection (13,14).

To better understand the spectrum of HIV-1 diversity in this region and the potential association with transmission route, we analyzed the prevalence of the HIV-1 subtypes and the spectrum of antigenic diversity in different exposure groups of HIV-1 infection, using the heteroduplex mobility assay (HMA) and a panel of synthetic peptides representative of the different HIV-1 subtypes.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient Population

Blood samples were obtained from 72 HIV-1-seropositive IDUs from Salvador, Bahia, Brazil (Projeto Brasil-Salvador). The study population, demographic data, and diagnosis of HIV infection were described elsewhere (13,14). Another 62 HIV-1-infected individuals, belonging to the sexual transmission (ST) group, were seen at the Federal University of Bahia Hospital and included in this study. Most study subjects were asymptomatic and the serostatus was previously established by commercial immunoassay and confirmed by Western blot (Cambridge Biotech, Worcester, MA, U.S.A.). All individuals donated blood voluntarily after informed consent.

### DNA Isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and  $2 \times 10^6$  cells were resuspended in lysis buffer containing proteinase K (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.). After proteinase K digestion, 5  $\mu$ l of this solution was used directly for polymerase chain reaction (PCR). Nonamplifiable samples were further submitted to genomic DNA extraction using the Isoquick Nucleic Acid Extraction Kit (Microprobe, Garden Grove, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. Samples that were not amplifiable by PCR using this condition were reextracted using the phenol/chloroform method (15).

### Nested Polymerase Chain Reaction

PCR amplification was carried out as described previously, with minor modifications (16). Briefly, 1 to 2  $\mu$ g of genomic DNA was added to a first-round reaction of 50  $\mu$ l containing 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 1.5 to 1.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol of each primer, and 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP). Standard reaction conditions were 3 cycles of 97°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and

72°C for 2 minutes, followed by 32 cycles of 95°C for 45 seconds, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes, and a final extension at 72°C for 10 minutes. Second-round reactions (100  $\mu$ l) were formulated and performed in similar conditions

First-round PCR primers ED3 and ED14 amplified a 2.0 Kb fragment spanning from the first exon of *rev* to the region of the envelope gene coding for the N-terminal half of the transmembrane protein gp41. Subsequently, three sets of primers (ED5/ED12, ED31/ED33, ES7/ES8) were used in the second-round PCR to amplify different regions of the viral envelope, resulting respectively in the expected 1.3 kb, 500 bp, and 700 bp products, respectively. Subtype reference plasmids were amplified using second-round primers and 10 ng of plasmids as templates (17).

### Heteroduplex Mobility Assay

HIV-1 subtype was determined by HMA as described elsewhere (16). Incubating in annealing conditions 5  $\mu$ l (100–250 ng of DNA) of second-round PCR with 5  $\mu$ l of homologous product from a subtype reference (A–H).

Each unknown sample was amplified with at least two sets of primers, and subtyped on the basis of the higher mobility of the heteroduplexes formed with three reference strains of HIV-1 subtypes A to E and two of F to H (17)

### Peptides and Peptide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

The amino acid sequence of the different specific HIV-1 subtypes was based on that in the Los Alamos Database (1). Non-biotin-treated HIV-1 peptides HXB2, MN, SF2, RF (subtype B); V3BRcon-CNTRKSIHIGWGAFYATGE (variant B''); ELI, MAL, Z6 (subtype D); and the biotin-treated peptides bV3FBR-NTRKSIPLGPGAFY (Brazilian subtype F); bV3C-GKSIRIGPGQTFYAT-OH (subtype C), bV3BRW-NTRKSIHMGWGAFY, bV3BR5-NTRKSIHLGWGAFY, bV3Bcons-NTRKSIHIGPGAFY), were synthesized respectively by Chiron (San Diego, CA, U.S.A.) and Neosystem Laboratory (Strasbourg, France).

The HIV-1 peptide enzyme immunoassay was carried out as described previously (18). A pool of HIV-1-negative sera was used to establish the cutoff value for each plate, at 4 degrees of standard error plus mean of the negative samples.

### DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis

PCR products corresponding to the *env* C2-V3 region of gp120 of nine samples were purified using a QIAamp PCR purification kit (Qiagen, Norway) according to manufacturer's instructions. Double-stranded PCR fragments were sequenced in both directions using an ABI PRISM fluorescent dye-labeled terminator sequencing kit (ABI-Prism Dye Terminator Cyclor Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, U.S.A.). The primers ED31 (sense) and ED33 (antisense) were employed for molecular sequencing. DNA sequences were generated using an automated sequencer (ABI Model 370, Perkin Elmer Cetus).

Nucleotide sequences corresponding to the fragment of 345 pb in the C2V3 *env* region were aligned using CLUSTAL W (19) with minor manual adjustments. The phylogenetic trees using the neighbor-joining method and reliability of the branching orders using bootstrap approach were implemented by using CLUSTAL W. Evolutionary distances



were calculated with Kimura's two-parameter method (20). Various previously determined HIV-1 sequences were included in this analysis for comparative purposes, and the sequence of SIVcpz-gab was used as outgroup. The HIV-1 envelope sequences from Salvador, Bahia described in this study have been deposited in EMBL and the accession numbers are assigned from Y18752 to Y18760.

## RESULTS

### Study Subjects

Most of the 72 IDUs who participated in the study were male (70.8%), the mean age was 30 years (range, 13–57 years). Most are of African descent and estimated duration of HIV infection ranged from 6 months to 2 years at the sample collection. Data on the percentage of syringe sharing and length of drug consumption among this group was not available.

In the 62 individuals from the ST group, 41 samples were collected during the early HIV-1 infection in Salvador (1988–1990) and 21 samples during the years of 1995 to 1997. Most of these cases (77.4%) occurred among men having sex with men (MSM), the mean age was 35.5 years (range, 24–48 years), and 14 cases (22.6%) reported heterosexual transmission. Individuals from the first group (1988–1990) had been infected for >1 year at the time of blood collection and the CD4<sup>+</sup> cell count was not available. Most individuals from the second group (1995–1997) showed a CD4<sup>+</sup> count >500 cells/mm<sup>3</sup>. In both groups, most HIV-1-infected individuals (83.6%) were not provided any antiretroviral therapy. The racial origin in this group was not available.

### Polymerase Chain Reaction and Heteroduplex Mobility Assay Subtyping

About 50% of the samples were directly amplified by nested PCR, using the product of PBMC digestion. The rest of the samples, purified using the commercial DNA extraction IsoQuick kit or the phenol/chloroform procedure, generated PCR products to perform HMA subtyping. However, six specimens from the IDUs and two from HIV-1 ST group, were still PCR-negative and thus not typable by HMA.

Table 1 summarizes the demographic data and the genetic subtypes of HIV-1 characterized in the study population. The genetic HIV-1 subtyping by HMA performed among the IDU group showed that 66 samples (91.6%) could be genetically typed by HMA, 59 (89.5%) were identified as subtype B, 2 (3%) as subtype F and 5 (7.5%) showed a B/F profile (Fig. 1A).

In the ST group, 60 HIV-1 samples (96.8%) could be subtyped by HMA. Most (95%) were classified as B

TABLE 1. Demographic data and genetic heteroduplex mobility assay subtypes of injecting drug users from Salvador, Bahia, Brazil

Variable	Tested (n)	Subtype		
		B n (%)	F n (%)	B/F n (%)
Total	66	59 (89.5)	2 (3) <sup>a</sup>	5 (7.5) <sup>a</sup>
Gender				
Male	46	42 (91.3)	—	4 (8.7)
Female	20	17 (85)	2 (10)	1 (5)
Age (y)				
<20	11	11 (100)	—	—
20–29	21	18 (85.7)	—	3 (14.3)
30–39	21	17 (80.9)	2 (9.55)	2 (9.55)
>40	10	10 (100)	—	—
Unknown	3	3 (100)	—	—

<sup>a</sup> Samples selected for C2-V3 env sequencing.

subtype, 2 patients (3.4%) showed a B/F, and 1 patient (1.6%) a B/C/E profile (Fig. 1B). No F subtype was observed in the HIV-1 ST group in Salvador, Bahia. These results and sociodemographic information of this group are summarized in Table 2.

### Phylogenetic Analysis

Five samples from the IDU group (BA95, BA103, BA104, BA118, BA122) and one from the ST group (BA75), showing rapidly migrating heteroduplexes with subtypes B and F, one ST sample that had a B/C/E profile (BA23) in the HMA, in addition to the two subtype F samples (BA73 and BA94), were chosen for sequencing of the env C2V3 region. Three samples (BA95, BA118, and BA122) clustered with the MN strain in phylogenetic analysis, whereas two others (BA103 and BA104) clustered with GWGR Brazilian subtype B samples, although none presented the GWGR motif at the crown of the V3 loop. Two samples from the ST group, showing, respectively, B/F (BA75) and B/C/E (BA23) HMA profiles, clustered separately in the subtype B group (Fig. 2). The only two samples identified as subtype F in HMA analysis clustered with typical Brazilian F subtype HIV-1 isolates (Fig. 2).

### HIV-1 Peptide Reactivity

Sera from 72 IDUs were tested for reactivity with biotin-treated peptides corresponding to the V3 loop sequences of subtype B, subtype F, and subtype C; 45 of these sera were tested against non-biotin-treated HIV-1 peptides from subtype B and subtype D.

The biotin-treated V3B peptide (65 of 70 B sera) and the non-biotin-treated MN peptide (39 of 43 B sera) were the most frequently recognized. Three sera recog-

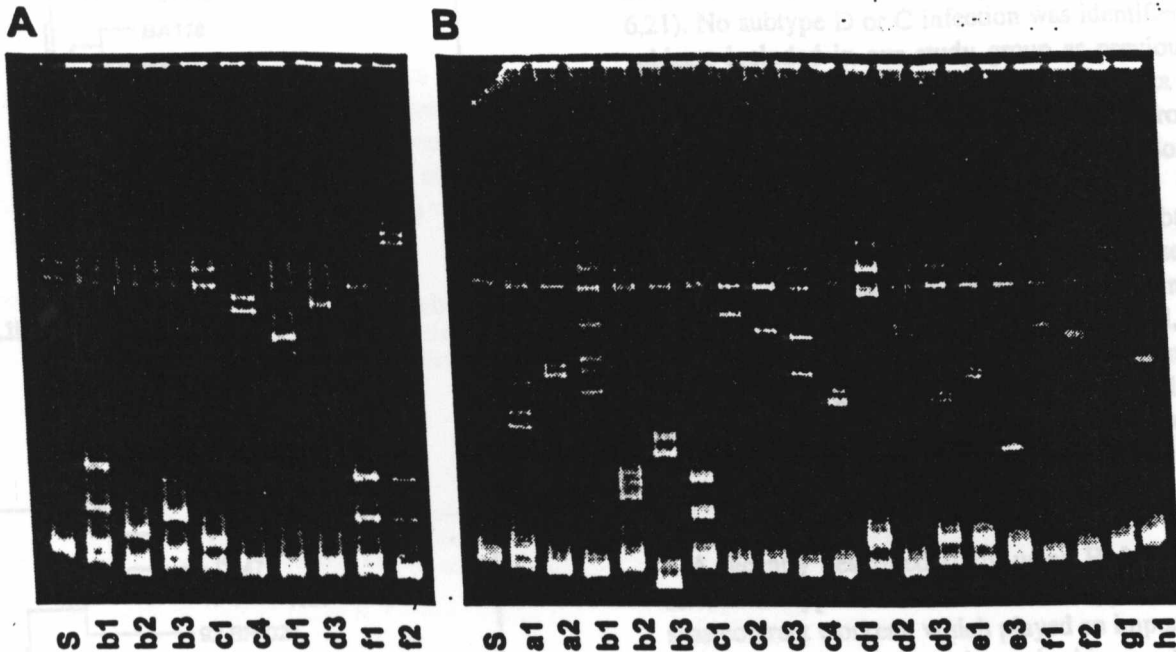


FIG. 1. Molecular characterization of HIV-1 Brazilian subtypes using heteroduplex mobility assay (HMA). (A) HIV-1 sample with B/F HMA profile. (B) Sample with a B/C/E profile in HMA analysis.

nized specifically only one B peptide, two reacted with bV3B, and one with BRcon. No IDU serum was negative with all B peptides, however, only two sera were able to react with all B peptides employed in this study.

TABLE 2. Demographic data and genetic heteroduplex mobility assay subtypes of the sexual transmission group from Salvador, Bahia, Brazil

Variable	Tested (n)	Subtype			
		B n (%)	F n (%)	B/F n (%)	B/C/E n (%)
Total	60	57 (95)	—	2 (3.4)	1 (1.6) <sup>a</sup>
Gender					
Male	47	45 (95.8)	—	1 (2.1) <sup>a</sup>	1 (2.1)
Female	13	12 (92.3)	—	1 (7.7)	—
Age (y)					
<20	—	—	—	—	—
20–29	11	10 (90.9)	—	1 (9.1)	—
30–39	21	19 (90.5)	—	1 (4.75)	1 (4.75)
>40	11	11 (100)	—	—	—
Unknown	17	17 (100)	—	—	—
CD4 <sup>+</sup> counts (cells/mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>					
<200	3	3 (100)	—	—	—
200–500	5	5 (100)	—	—	—
>500	12	9 (75)	—	2 (16.7)	1 (8.3)
Unknown	40	—	—	—	—
Antiretroviral therapy					
Yes	8	7 (87.5)	—	1 (12.5)	—
No	50	48 (96)	—	1 (2.0)	1 (2.0)
Unknown	2	2 (100)	—	—	—

<sup>a</sup> Samples selected for C2-V3 env sequencing.

<sup>b</sup> Only available for 1995/1997 sexual transmission subgroup.

In contrast, most sera (70 of 72) were negative with peptides derived from African subtype D strains. Extensive cross-reactivity was observed with the F peptide (100%) and the C peptide (60%). The two subtype F sera recognized the bV3FBR peptide as well most B peptides tested.

## DISCUSSION

In this paper, the genetic analysis in the main exposure categories of the HIV-1 epidemic in Bahia in northeastern Brazil, demonstrates the presence of two HIV-1 subtypes circulating in this region, with a clear predominance of subtype B among IDUs and individuals infected by ST. No difference was observed between the two ST groups, as only subtype B was observed in the samples collected both in 1988 to 1990 and 1995 to 1997. Conversely, subtype F was detected only in the IDU group. Similarly, in a previous study conducted with a few samples collected in Salvador, Bahia in the beginning of the 1990s (4), one sample obtained from an IDU was initially described as "A-like," and further characterized as subtype F. The phylogenetic analysis of the B samples from IDU group showed a near relation of their genetic structure, probably due to the extensive needle sharing occurring in this group. However, the two ST samples (BA23 and BA75) clustered together in a separate branch from those including the IDU samples.

Recently, a high prevalence of HIV-1 subtype F was

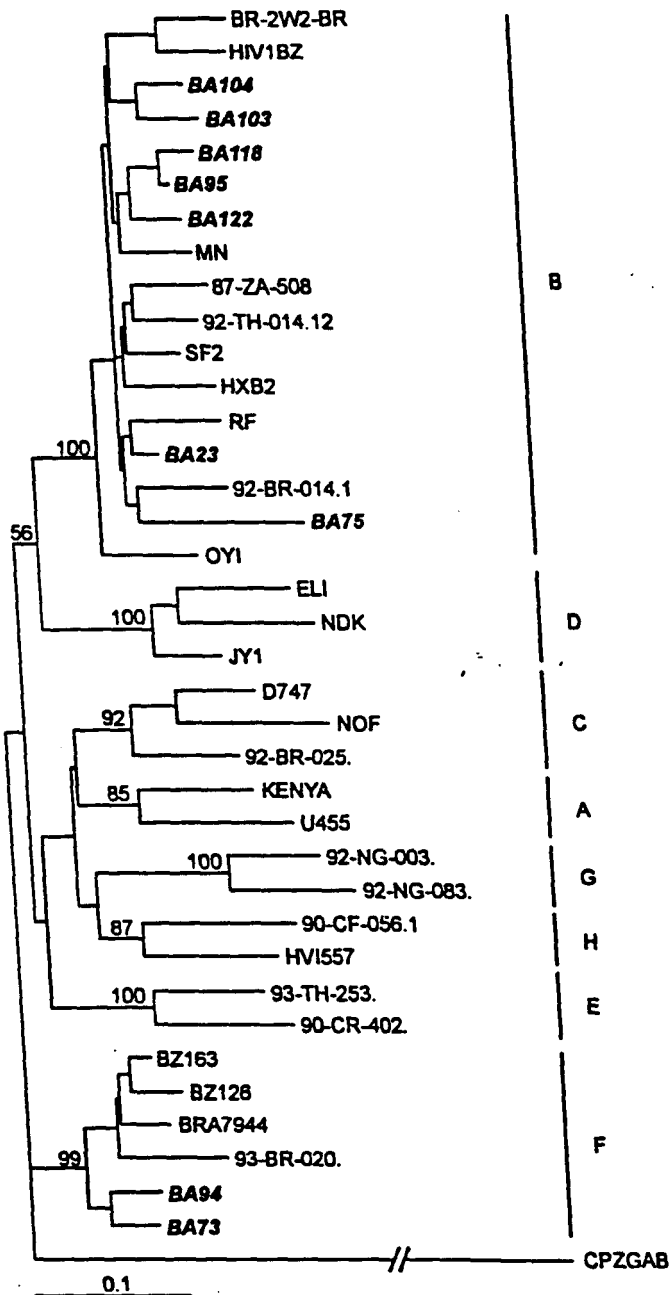


FIG. 2. Phylogenetic tree of HIV-1 C2-V3 env sequences from nine Brazilian HIV-1 subtypes. Nucleotide sequences and phylogenetic tree were implemented using CLUSTAL W (19). All Brazilian samples are *bold italicized* and the scale bars represent 10% divergence. The Afro-Brazilian HIV-1 envelope sequences from Salvador, Bahia, have been deposited in EMBL under accession numbers Y18752 through Y18760.

observed in São Paulo (in southeastern Brazil) in IDUs and their female sexual partners, suggesting a higher level of transmissibility of this subtype among this risk group (21). Although in the present study conducted in Bahia, the subtype F was detected only among IDUs, the percentage was very low and no significant statistical

basis to support correlation between this HIV-1 subtype and exposure category or gender.

In general, the frequency of subtype F in Bahia seems to be lower than described for other cities in Brazil (5, 6,21). No subtype D or C infection was identified in the subjects included in our study group as previously detected in Brazil (7,8). However, more recent data showed the presence of subtype C in 8 of 177 samples from other states in northeastern Brazil, including Salvador, Bahia (22).

Comparing our present results with those obtained in the AIDS epidemic in Africa, we have not observed the presence of multiple HIV-1 subtypes circulating in this African related community in Northeast Brazil, suggesting an original introduction into this area of strains derived from North American/European HIV-1 isolates. However, the permanent contact of Brazilian travelers with African communities represents an important epidemiologic factor for the introduction of new HIV-1 subtypes in Brazil.

A recently described study using HMA analysis described subtype F viruses in the Philippines from overseas contract workers, which played an important role in the introduction of this subtype in this area (23). Salvador, Bahia is a seaside city with several ports. Although the prevalence of non-B subtype is lower in comparison with other regions, such a route for the introduction of new HIV-1 variants should be considered.

The reactivity of sera from HIV-1-infected IDUs were highest with bV3B and MN peptides. All sera were reactive with the peptide derived from a Brazilian HIV-1 F isolate, possibly due to the highly conserved GPGR sequence situated at the top of the V3 loop, common to both F and B peptides, described as being the immunodominant part of the V3 loop.

The reliability of V3 loop serotyping is highly dependent on the viral diversity within the analyzed population. In contradistinction to results reported in Thailand (24), where the enzyme immunoassay with synthetic peptides is highly effective in HIV-1 subtyping, in Bahia, Brazil, the seroreactivity assay used in this study did not allow distinction between the subtype B and subtype F HIV-1 infections. However, this high serologic cross-reactivity observed among the different peptides indicates the occurrence of common epitopes among and within the HIV-1 subtypes prevalent in Brazil and, taken together with data concerning cross-neutralizing antibodies among these subtypes (25), could represent promising data for vaccine development.

In conclusion, the genetic variability of HIV-1 could have some implications on transmission, disease progression, and emphasis on the need of continued epidemio-

logic and molecular surveys in Brazil, mainly in areas that were not previously investigated.

Several epidemiologic studies reported the occurrence of different HIV-1 subtypes and recombinant viruses composed of genetic material derived from two genotypes (9,10). Although in our study we have not found combinations between the nine strains sequenced within the C2-V3 region of the envelope, further complementary studies analyzing other genomic regions will be necessary to assess this issue.

**Acknowledgments:** This research was partially supported by FIOCRUZ AIDS Integrated Program, the National Coordination of STD/AIDS Brazilian Ministry of Health, and the Brazilian Research Council (CNPq).

## REFERENCES

1. Myers G, Korber B, Foley B, et al. *Human retrovirus and AIDS 1997: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos, NM: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, 1997.
2. Van den Haesevelde M, Decourt J-L, et al. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* 1994;68:1586-96.
3. Simon F, Maucière P, Roques P, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type I distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998;4:1032-7.
4. Potts KE, Kalish ML, Lott T, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 1993;7:1191-7.
5. Morgado MG, Sabino EC, Sphaer EG, et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototypes and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:569-76.
6. Couto-Fernandez JC, Janssens W, Heyndrickx L, et al. Genetic and antigenic variability of HIV type 1 in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1157-63.
7. WHO Network for HIV isolation and characterization: HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of representative viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1927-43.
8. Morgado MG, Guimar es ML, Gripp CBG, et al. High prevalence of B subtype and recent introduction of HIV-1 subtype D infection in Rio de Janeiro city, Brazil: no evidence of association between HIV-1 subtypes and exposure categories. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:488-94.
9. Sabino EC, Sphaer EG, Morgado MG, et al. Identification of HIV-1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically-linked individuals from Brazil. *J Virol* 1994;68:6340-6.
10. Gao F, Robertson DL, Carruthers D, et al. A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998;72:5680-98.
11. Bongertz V, Jansson M, Flodby P, et al. Analysis of antibody specificity against the third variable region of the envelope gp 120 of HIV-1 in plasma from HIV-1 positive individuals resident in Brazil. *Braz J Med Res* 1994;27:1225-36.
12. Brazilian Ministry of Health. *AIDS epidemiological bulletin* [in Portuguese]. PNDST/AIDS, year XII, no. 01. Brasília: Ministério da Saúde, 1999.
13. Andrade TM, Dourado I, Galvão-Castro B. Association among HTLV-I, HTLV-II and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:186-87.
14. Dourado I, Andrade T, Carpenter CL, et al. Risk factor for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in Northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:13-18.
15. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
16. Delwart EL, Sphaer EG, Louwagie J, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257-61.
17. Delwart EL, Herring B, Learn Jr, GH, et al. *Heteroduplex mobility analysis HIV-1 env subtyping kit*, protocol version 3. Rockville, MD: NIH AIDS Research and Reference Program, 1995.
18. Bongertz V, Costa CI, Guimarães ML, et al. HIV specific humoral immune response in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:391-8.
19. Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. *Nucleic Acid Res* 1994;22:4673-80.
20. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotides sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-20.
21. Sabino EC, Diaz RS, Brigido LF, et al. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. *AIDS* 1996;10:1579-84.
22. Shindo N, Dube I, Souza IOM, et al. Prevalence of HIV-1 subtype C in northeast and central east states in Brazil [abstract 343]. I Bienal de Pesquisa, Bahia, Fundação Oswaldo Cruz, 1998.
23. Santiago ML, Santiago EG, Hafalla JCR, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in the Philippines, 1985 to 1997: transmission of subtypes B and E and potential emergence of subtypes C and F. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:260-9.
24. Pau CP, Lee-Thomas S, Auwanit W, et al. Highly specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS* 1993;7:337-40.
25. Bongertz V, Costa CI, Guimar es ML, et al. Neutralization susceptibility of B subtype variant B primary HIV-1 isolates. *Scand J Immunol* 1998;47:603-8.

**Documento nº 5**

Couto-Fernandez, J.C.; Montavon, C.; Guimarães, M.L.; Grinsztejn, B.; Delaporte, E., Peeters, M. and Morgado, M.G.: HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 SUBTYPE D IDENTIFIED IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL: SEQUENCE ANALYSIS OF A 5,500 BP FRAGMENT FROM *VIF* TO *NEF* GENES. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1999 (SUBMETIDO).

O número de seqüências genômicas de HIV-1 depositadas no GenBank de Los Alamos, tem crescido rapidamente nos últimos anos (Korber e cols., 1998). Em aproximadamente 15% destas seqüências, trata-se comprovadamente de genomas recombinantes. A identificação precisa do subtipo genético e de formas recombinantes com importância epidemiológica em determinada região, é de fundamental importância para futuros testes imunoprofiláticos.

Diante desta realidade, recentemente foram estabelecidos critérios para classificação filogenética de novos subtipos genéticos e formas recombinantes (Carr e cols., 1998), o que tem levado a um aumento substancial do número de amostras virais que tiveram seus genomas sequenciados na sua totalidade (Korber e cols., 1998 - Los Alamos Database).

Como dito anteriormente, existem pelo menos 5 subtipos genéticos circulando no Brasil (B/B", F, C, D e A), além de formas recombinantes. A grande maioria destas amostras foram identificadas utilizando a técnica de HMA e o sequenciamento da região C2V3 do envelope viral. Atualmente, a maioria das amostras brasileiras que tiveram seus genomas sequenciados, foram principalmente isolados do subtipo B, alguns do subtipo F e poucos do subtipo C (Korber e cols., 1998 - Los Alamos Database).

O programa de AIDS das Nações Unidas estimam que nos próximos anos, vírus pertencentes aos subtipos não-B serão os principais responsáveis pelo surgimento de novos de casos de AIDS, principalmente nos países em desenvolvimento. O subtipo C será o mais prevalente seguido do subtipo A, E e D (UNAIDS 1997, 1999). Estes resultados enfatizam a necessidade de um melhor conhecimento da estrutura genômica de isolados virais não-B, presentes no Brasil.

Recentemente, nosso grupo isolou um HIV-1 do subtipo D obtido de um paciente com quadro clínico característico de rápido progressor residente na cidade do Rio de Janeiro (Morgado e cols., 1998). Buscando obter informações detalhadas sobre a estrutura genética deste vírus, conseguimos realizar o sequenciamento molecular de um fragmento genômico que compreende todo o gene do envelope e os genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* e *nef*). A análise detalhada da estrutura genética deste vírus, bem como da sua sequência deduzida de aminoácidos encontram-se detalhadas no documento 5.

## **Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype D, Identified in Rio de Janeiro, Brazil: sequence analysis of a 5500bp fragment from *vif* to *nef* genes**

Couto-Fernandez, JC.<sup>1</sup>, Montavon, C.<sup>2</sup>, Guimarães, ML.<sup>1</sup>, Grinsztejn, B.<sup>3</sup>, Delaporte, E.<sup>2</sup>, Peeters, M.<sup>2</sup> and Morgado, MG.<sup>1</sup>.

1. Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Dept. of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; 2. Laboratory Retrovirus, IRD/ORSTOM, Montpellier, France; 3. Evandro Chagas Hospital, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

### **Summary**

**Objective:** To genetically characterize a novel HIV-1 subtype D strain recently identified in Brazil (Morgado et al., 1998), and compare the sequences with previously described subtype D viruses.

**Methods:** DNA was extracted from PBMC of a HIV-1 infected patient and initially a 5000 bp fragment of the HIV-1 genome has been amplified by PCR. Double-stranded nested PCR fragments were directly sequenced with fluorescent dye-labeled sequencing terminators, using an automated sequencer. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor joining method and the branching orders using bootstrap approach, were implemented by using CLUSTAL W. Recombination identification program (RIP) and overlapping phylogenetic trees were used to identify eventual mosaic sequences.

**Results:** HIV-1 subtype D virus was obtained from a rapid progressor AIDS patient, with low CD4+ cell counts and plasmatic viral load ranged from 30,000 to 130,000 copies/ml. The nucleotide sequences were determined from the entire envelope gene (*env*), the accessory genes region (*vif*, *vpr*, *tat*, *vpu*, *rev*) and the *nef* gene. The sequences of Brazilian D gp160, clearly grouped with virus from subtype D. The cysteine residues were relatively well conserved, only one site was absent in the V1 region and two new sites were detected. New glycosylation sites and a big insertion was detected in the V1/V2 region. However, the V3 loop displayed the characteristic GPGQ motif in the top. No recombinant events were observed in the viral envelope and accessory genes. However, the 5' region of the *nef* gene (myristylation site, PXXP site and some CTL sites), seemed to be closer to subtype B sequences.

**Discussion:** Due to the increasing amount of international travel and migration, the different HIV-1 subtypes spread all over the world. An increasing number of new viral recombination events between subtypes, have been reported last years. The impact of the introduction of a new genetic subtype in a country and the possibility of emerging recombinant forms, in the pathogenesis, disease progression and virus transmission remains still to be elucidated. These results emphasize the need of continued epidemiological molecular surveys in Brazil, mainly in areas that were not previously investigated.



## INTRODUCTION

The complexity of the genetic diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), is well established by extensive database of viral sequences (1). Phylogenetic analysis of HIV-1 viruses from different geographic locates has revealed that HIV-1 can be divided into at least three distinctive groups M (Major), O (Outlier) and N (new non-M non-O) [1]. Group M, the Major group, comprises the majority of the HIV-1 strains responsible for the AIDS epidemic worldwide. HIV-1 group O viruses have only 50% homology with the group M isolates in the *env* gene (1). HIV-1 group O seems to be endemic in West Central Africa, especially Cameroon, where the frequency of infection is estimated to 2-5% of infected individuals (2). Group N viruses were recently reported from 2 Cammeroonian patients (3). Full length genome sequencing showed that group M HIV-1 viruses can be further subdivided into at least 9 different, non recombinant subtypes (A, B, C, D, F, G, H, J and K) approximately equidistantly related and recombinant forms, recently denominated "Circulating Recombinant Forms" (CRFs) [1]. There are currently several CRFs of HIV-1: AE-CM240 from southeast Asia, the AG-IBNG from Africa, the AGI-CY032 from Cyprus and Greece, AB-KAL153 like viruses found in the Kaliningrad IDU epidemic in Russia and AGIJ-BFP90/95ML84 viruses in West Africa. Although these broad outlines of the molecular phylogeny of HIV-1 are well established, the detailed genomic structure of many of these subtypes is unclear.

In Brazil, five different clades (B/B'', F, C, D and A) and additional recombinant forms comprised of genetic material from two different subtypes, B/F and B/C have been identified in different states (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Initially, Brazilian HIV-1 strains were characterized by sequencing of short genomic regions, HMA genotyping or by peptide serotyping. These analysis provided evidence for a predominance of genetic subtype B (80%) in Brazil, followed by subtype F (15%), subtype C (5%), and more recently the subtype D and A were identified in Rio de Janeiro.

For the coming decades, the World Health Organization estimated that the global incidence of new infections will be highest for clades non-B, particularly for the clades C and E, followed by clades A, D and B (12), with the majority of these cases occurring in developing countries. For this reason, obtaining data of prototypic full-length genomes of Brazilian subtype non-B strains would be desirable in light of these predictions mainly for designing in effective broad-spectrum vaccines. In this study, we describe for the first time, an almost full-length molecular clone of HIV-1 subtype D in Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Clinical samples and DNA extraction**

Heparinized blood samples were obtained from a Brazilian HIV-1 positive patient living in Rio de Janeiro, reporting homo/bisexual contacts as the source of infection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation in Ficoll-Hypaque gradient and uncultured cells were used to extract total genomic DNA.

After proteinase K digestion, the nucleic acids were extracted with an equal volume of phenol-chloroform, ethanol precipitated, vacuum dried and dissolved in 50ul of sterile distilled water.

### **PCR amplification and Cloning**

The genomic sequence of the Brazilian HIV-1 subtype D was obtained by amplifying three overlapping subgenomic fragments using nested PCR as previously described (13). Briefly, a partial full-length proviral DNA was amplified using two primers flanking the 5' (PBS-5'-AAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGAC) and 3' (LsiGi - 5' TCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAGCA) long terminal repeat (LTR) regions and enzymes with proofreading ability, in an expanded long template PCR system (Boehringer, Mannheim, Germany). Cycling conditions comprised a denaturation start during 2 min. at 94°C, followed by

20 cycles of denaturation (94°C) for 30 s and extension (68°C) for 10 min, then 17 cycles of denaturation at 94°C for 30 s and extension at 68°C for 10 min., with 20-second increments per cycle.

Nested PCR was done using 5 $\mu$ l of the product of long-PCR procedure and different sets of primers according to a variety of cycling temperatures (13). All positive PCR products were purified using a QIAamp PCR purification kit (Qiagen Inc., Norway) according to manufacturer's instructions and used as template for direct sequencing and cloning in a PCR product cloning system (pGEM – Promega, Holland).

### **DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis**

Amplified and cloned segments of HIV-1 provirus were sequenced using a serial of primers described along the HIV-1 genome (13). Double-stranded fragments were sequenced in both directions using a ABI PRISM fluorescent dye-labeled terminator sequencing kit (ABI-Prism Dye Terminator Cycler Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer) using an automated DNA sequencer (ABI Model 370, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut, USA).

Nucleotide and protein sequences were aligned using CLUSTAL W program (14) with minor manual adjustments, bearing in mind the protein sequences. The phylogenetic trees using the neighbor-joining method and reliability of the branching orders using bootstrap approach were implemented by using CLUSTAL W. Evolutionary distances were calculated with the Kimura's two-parameter method (15). A variety of previously determined HIV-1 sequences were included in this analysis for comparative purposes, and the sequence of SIVcpz-GAB was used as outgroup.

Recombination identification program (RIP, Los Alamos National Laboratory), diversity plotting (ANRS, France) and overlapping phylogenetic trees were used to identify eventual mosaic sequences.

## RESULTS

The HIV-1 subtype D virus was obtained from a 36 year-old Brazilian man presented to Evandro Chagas Hospital, Rio de Janeiro with symptoms characteristic of rapid progressor AIDS infection. The patient never left Brazil and the HIV-1 seropositivity was confirmed by Western blot. The level of CD4<sup>+</sup> cell counts was low (96/mm<sup>3</sup>) and plasmatic viral load ranged from 30,000 to 130,000 copies/ml, two successive attempts of virus isolation were performed without success. At the moment, this patient is under antiretroviral therapy.

Proviral DNA amplification with several sets of HIV-1 group M was attempted on first round PCR product derived from PBMC DNA. We successfully amplified a 3523 bp corresponding to the entire envelope gene, another fragment with 1465bp comprising the accessory genes region (*vif*, *vpr*, *tat*, *vpu*, *rev*) and a product of 534bp like the *nef* gene. Amplification was negative with at least ten different group M *gag* and *pol* primers. Even the H-pol set of primers and PBS/Gag1 corresponding to highly conserved regions, respectively in *pol* and *gag* regions of the HIV genome, did not generate any genomic products in nested PCR.

Phylogenetic trees have been constructed and the Brazilian subtype D found to cluster with viruses of the D clade, in concordance with our original classification (8) and with a very high bootstrap value (98%). The nucleotide sequence analysis of the viral envelope and accessory genes clearly grouped with virus from subtype D. The genetic distance, calculated by using the Kimura method, shows that genomic sequences clustered with ELI and NDK African subtype D isolates (figure 1a).

The overlapping phylogenetic trees based on short sequence fragments (350pb) of the near full-length genome, showed differences in the branching structures between the subtypes D and subtypes B. In particular, it falls in the 3' terminal sequences of *env* and *nef* genes. Detailed structure analysis performed with diversity plot and RIP program using master alignments (subtypes A-H) as background, showed no evidence of recombinant events in auxiliary genes and the major parts of the *env* gene, scored best with subtype D (figure 1b).

However, the 5' region of the *nef* gene (myristilation site, PXXP site and some CTL sites), seems by genomic sequence to be closer to subtype B sequences with 60% of bootstrap value.

The amino acid sequence analysis of envelope gene (figure 2), shows a particular V1/V2 region characterized by an insertion of 34 amino acids. However, the V3 loop, displayed the characteristic GPGQ motif in the top.

The predicted amino acid sequence shows high stability in terms of the number and position of cysteine residues in the envelope protein. Only one site was absent in the V1 region and two new cysteine sites and glycosylation sites were detected. The gp120-CD4 binding site domains and gp 41 were relatively conserved.

Despite of the amino acid sequences of the *nef* gene displays an alternance of sequences between subtype B and D, the majority of the CTL sites were well conserved.

## **DISCUSSION**

The global spread of HIV-1 continues with epidemics occurring in locations previously spared. Due to the increasing amount of international travel and migration, new epidemics are sometimes caused by subtypes that were not widespread previously.

In Brazil, some populations displays several sociodemographic characteristics of large African or Haitian cities. The introduction of African genetic subtypes could have a great impact on the epidemiology of HIV-1 subtypes, changing the now existing pattern. The establishment of a major focus of HIV-1 infection in Thailand by subtype E and the rapid spread of HIV-1 in Southern India associated to subtype C, are characteristic example.

Indeed, the probability of introduction of a new HIV-1 subtype in a given region, the possibility of genetic recombination with circulating strains and the implications for the pathogenicity and transmissibility of HIV-1 are unclear. The potential to abruptly juxtapose segments of different subtypes in a mosaic virion structure, may provide HIV-1 with an important venue for the generation of variants with altered biological, epidemiological, or immunological properties.

The availability of sequence data of Brazilian subtype D provides an opportunity to analyze the levels of conservation and diversity of genome organization in comparison with African HIV-1 subtypes D. This information is important from the perspective of a global anti-HIV-1 vaccine program, given the rapid spreading of non-subtype B viruses in areas prevalently affected by HIV-1 subtype B. The meaning and the implications of sequence diversity in the V1/V2 region of the HIV-1 subtype D pathogenesis remains unclear and needs further investigation. These results emphasize the need for a continued epidemiological molecular survey in Brazil.

## REFERENCES

1. Korber, B., Hahn, B., Foley, B., Mellors, JW., Leitner, T., Myers, G., McCutchan, F. & Kuiken, CL. : Human retroviruses and AIDS 1998: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory 1998, NM: Theoretical Biology and Biophysics Group, *Los Alamos National Laboratory*, 1998.
2. Van den Haesevelde M, Decourt J-L, De Leys R, Vanderborght B, van der Groen G, van Heuverswijn, and Saman E: Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent african human immunodeficiency virus isolate. *J Virology* 1994;68:1586-96.
3. Simon F, Maucière P, Roques P, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine* 1998; 4(9):1032-37.
4. Potts KE, Kalish ML, Lott T, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 1993; 7:1191-97.
5. Morgado MG, Sabino EC, Sphaer EG, et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototypes and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:569-76.
6. Couto-Fernandez JC, Janssens W, Heyndrickx L, et al. Genetic and antigenic variability of HIV type 1 in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1157-63.
7. WHO Network for HIV isolation and characterization: HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of representative viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1927-43.
8. Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBG, et al. High prevalence of B subtype and recent introduction of HIV-1 subtype D infection in Rio de Janeiro city, Brazil: no evidence of association between HIV-1 subtypes and exposure categories. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:488-94.
9. Caride, E., Hertogs, K., Larder, B., Dehertogh, P., Brindeiro, R., Machado, E., De Sá, CAM., Eyer-Silva, W., Sion, W., Passioni, LFC, Menezes, JA., Calazans, AR. & Tanuri, A. : Genotyping and phenotyping of B and non-B human immunodeficiency virus type 1 subtypes from patients under highly active antiretroviral therapy. III Simpósio Brasileiro de Pesquisa Básica em HIV/AIDS. Abstract nº 81- Comandatuba Island, Bahia, Brazil..
10. Sabino EC, Sphaer EG, Morgado MG, et al. Identification of HIV-1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically-linked individuals from Brazil. *J Virology*. 1994; 68:6340-46.
11. Cornellisen, M., Kampinga, G., Zorgdrager, F., Goudsmit, J. : Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. The UAIDS Network for HIV isolation and characterization. *J Virology* 1996; 70:8209-8212.

12. WHO Working group: The HIV/AIDS pandemic: 1995 overview. Global Programme on AIDS, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1995.
13. Pecters, M., Liegeois, F., Torimiro, N., Bourgeois, A, Mpodi, E., Vergne, L., Saman, E., Delaporte, E. & Saragosti, S. : Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virology* 1999; 73 (9):7368-75.
14. Thompson J, Higgins D, and Gibson, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. *Nucleic Acid Res* 1994; 22:4673-80.
15. Kimura, M.: A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotides sequences. *J Mol Evol* 1980; 16:111-120 .





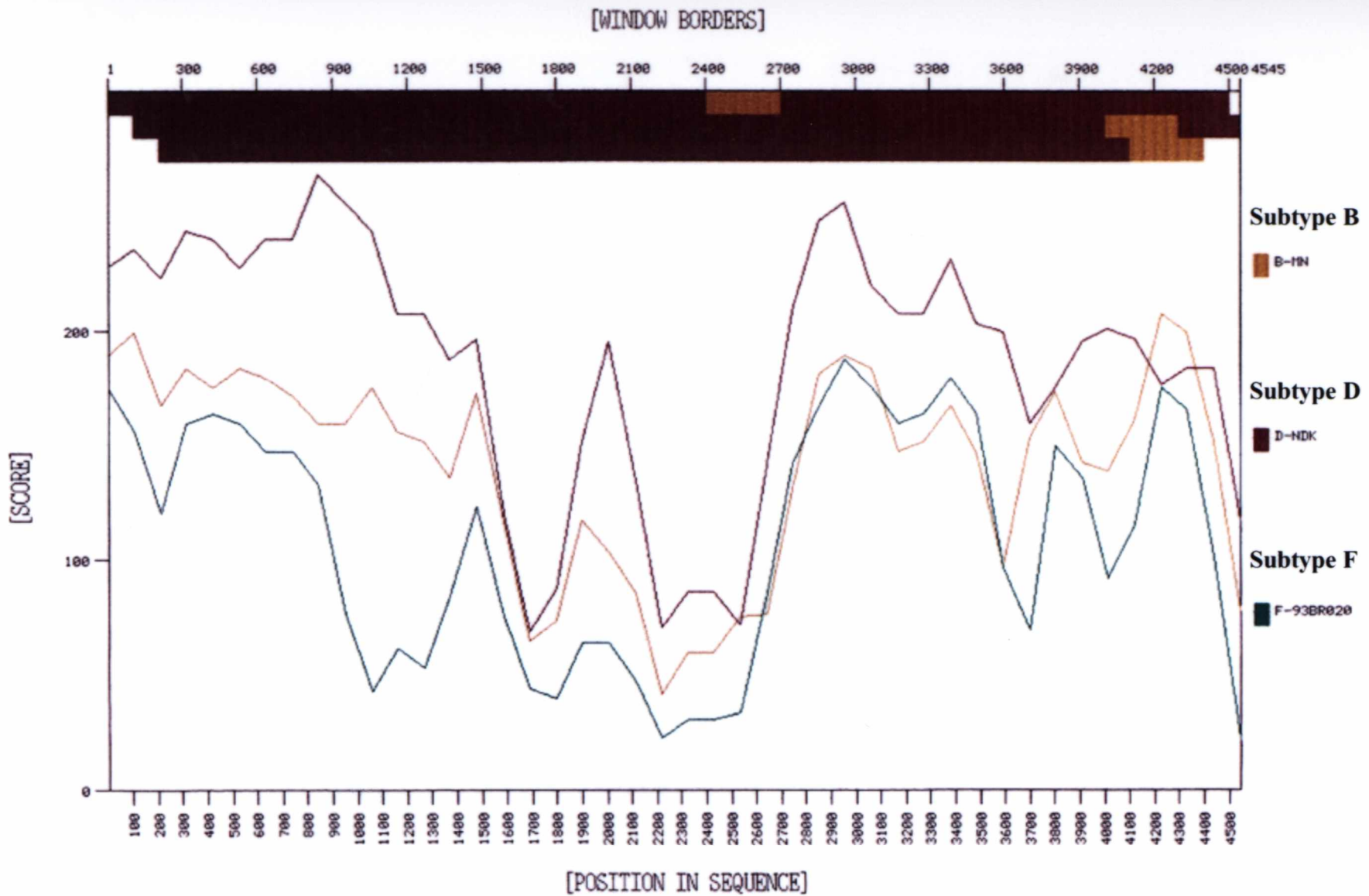


Figure 1b. Detailed structure of recombination analysis performed using bootscanning program of Brazilian HIV-1 subtype D. The analysis comprise the region from *vif* to *nef* genes and the scale in the top represents the similarities with the Brazilian subtype D strain.

V1/V2

F\_BZ126 WKNNMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNMRDKKQVHALFY.....KLDIVYRLIHCOTSTITQACPKVSWDPI
F\_BZ163 WKNNMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNMRDKKQVHALFY.....RLDIVYRLINCNSTITQACPKVSWGPI
MP255 WKNNMVDQMHLDIISLWDQSLKPCVKSTPLCVTLNCTDKN-CSPFNVDKRRKQALFY.....RLDVEYKLIISCMSTVTOACPKVSDPI
MP257 WKNNMVDQMHEDIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNVDKRRKQALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
F\_93BR020.1 WENNMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQKQVHALFY.....KLDIVYRLINCADSTITQACPKVSWDPI
MP84 WNNMVDQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKKQVHALFY.....RLDIVYRLINCNSTITQACPKVSNFI
MP535 WKNNMVEQMHHTDIISLWDESLKPCVELTPLCVTLNCTDKN-CSPFNKDKKQKESALFY.....RLDVLVYRLINCNSTITQACPKVTFEPI
ZR36 WKNNMVEQMHHTDIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNVDKRRKQVHALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
B\_HXB2 WQNDMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNIRGKQVQKEYALFY.....KLDIIYKLTSCNSTVITQACPKVSDPI
B\_JRFL WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNIRDEVQKEYALFY.....KLDVVYRLISCDTSVITQACPKISFEPI
B\_OYI WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVLFRLIHCNSTITQACPKISFEPI
B\_RF WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
D\_Z226 WRNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....RLDIVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
D\_ELI WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....RLDIVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
D\_NDK WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDIVYRLINCNSTITQACPKISFEPI
D\_94UG114.1 WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
A\_KENYA WQNNMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....RLDIVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
A\_SF170 WQNNMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
A\_U455 WQNNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....RLDIVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
A\_92UG037.1 WQNNMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
G\_92NG083.2 WQNNMVEQMHEDIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
G\_92RU131.9 WQNNMVEQMHEDIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
G\_92UG975.10 WQNNMVEQMHEDIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....RTDVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
G\_92NG003.1 WQNNMVEQMHEDIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....RLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
E\_CM240 WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
E\_TN235 WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDIVYRLINCNSTITQACPKISFEPI
E\_93TH253.3 WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDIVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
E\_90CR402.1 WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....NNNSMFRLLIHCNSTITQACPKVSDPI
C\_ETH2220 WKNDMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDIVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
C\_UG268 WQNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
C\_92BR025.8 WENDMVEQMHHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....RLDIVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
C\_ZAM18 WKNDMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
CP2GAB WQNNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....VEDVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
D.BR100 WKNNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDKN-CSPFNTRDKQVQKEYALFY.....KLDVVYRLINCNSTITQACPKVSDPI
\* \* \* \* \*

V3 loop

F\_BZ126 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
F\_BZ163 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
MP255 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
MP257 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
F\_93BR020.1 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
MP84 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
MP535 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
ZR36 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
B\_HXB2 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
B\_JRFL PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
B\_OYI PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
B\_RF PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
D\_Z226 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
D\_ELI PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
D\_NDK PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
D\_94UG114.1 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
A\_KENYA PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
A\_SF170 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
A\_U455 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
A\_92UG037.1 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
G\_92NG083.2 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
G\_92RU131.9 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
G\_92UG975.10 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
G\_92NG003.1 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
E\_CM240 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
E\_TN235 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
E\_93TH253.3 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
E\_90CR402.1 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
C\_ETH2220 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
C\_UG268 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
C\_92BR025.8 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
C\_ZAM18 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
CP2GAB PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
D.BR100 PIHYCAPAGYAILKCNDRKFNFTGPKCNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIIIR SQNISDNARTIIVHFNESVQINCTRPNNYTRKSIYFPGRAFVTGKI I-GDIRKACHNSV
\* \* \* \* \*

Figure 2. Amino acid alignment of V1-V3 subtype D envelope sequences. Amino acid sequences were aligned using CLUSTAL W and consensus sequences were obtained from Los Alamos Database (1998).

**Documento nº 6**

Couto-Fernandez, J.C., Gomes, LP., Figueiredo, LJ., De Simoni, SG. & Morgado, MG.: AMINO ACID DIVERSITY OF THE V3 LOOP SEQUENCES IN NSI/SI-LIKE BRAZILIAN HIV-1 STRAINS. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999 (manuscrito em fase de preparação).

A diversidade do fenótipo do viral tem um importante papel na patogenia da infecção pelo HIV-1. Normalmente, isolados obtidos de pacientes na fase inicial da infecção, se replicam lentamente em culturas celulares, mostrando tropismo preferencial por células macrofágicas (M-trópico) e sem a capacidade de induzir sincício em linhagens linfocíticas (NSI). Durante o curso da infecção, ocorre o surgimento de variantes com capacidade replicativa aumentada, mostrando tropismo para linhagens de células T (T-trópico), e com capacidade de indução de sincício em linhagens celulares (SI). A transição do fenótipo M-trópico para T-trópico *in vivo*, e o surgimento de variantes SI, coincidem com uma acelerada queda dos níveis de células CD4+ e uma rápida progressão para AIDS. Com isso, o conhecimento das bases moleculares envolvidas na transição do fenótipo viral, constituem elemento fundamental para a elaboração de uma vacina terapêutica que bloqueie o surgimento destas variantes SI.

As seqüências contidas no domínio hipervariável V3 da gp120, tem demonstrado ser o principal determinante da capacidade indutora de sincício do HIV-1 (De Jong e cols., 1992; Fouchier e cols., 1992). Mais recentemente, foi demonstrado que a presença de aminoácidos básicos em posições específicas nesta região, seriam determinantes do fenótipo SI, principalmente pelo acúmulo de cargas positiva em sua estrutura (Milich e cols., 1993).

Baseado nestas evidências, e na tentativa de identificar o perfil de substituições que estariam relacionados à indução do fenótipo SI nas amostras Brasileiras, realizamos a estruturação molecular das diferentes seqüências da região V3. Uma análise espacial da distribuição de cargas positivas e negativas nesta região, foi realizada no sentido de

verificar a influência do acúmulo de cargas, como elemento favorecedor da ligação seletiva do V3 aos co-receptores.

Os resultados desta meta-análise, a construção das imagens e distribuição de cargas ao longo do domínio V3 nas amostras NSI e SI, encontram-se sumarizadas no documento 6.

## **Amino Acid Diversity of the V3 Loop Sequences in NSI/SI-like Brazilian HIV-1 strains**

Couto-Fernandez, JC.<sup>\*1</sup>, Gomes, LP.<sup>1</sup>, Figueiredo, LJ.<sup>2</sup>, De Simone, SG<sup>2</sup>. and Morgado, MG<sup>1</sup>.

1. Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Department of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ\*\*, Rio de Janeiro, Brazil; 2. Laboratory of Biochemistry of Proteins and Peptides, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

\*Corresponding author: Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Department of Immunology, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil - 21045-900. E-mail address: [coutofer@gene.dbbm.fiocruz.br](mailto:coutofer@gene.dbbm.fiocruz.br)

\*\* UNAIDS Collaborating Centre

Sponsorship: Partially supported by FIOCRUZ AIDS Integrated Program, The National Coordination of STD/AIDS Brazilian Ministry of Health and Brazilian Research Council (CNPq).

Running head: HIV-1 V3 loop diversity of NSI/SI strains in Brazil.

## Introduction

HIV-1 biological phenotype diversity plays an important role in the pathogenesis of AIDS (J Goudsmit et al. 1995). In early asymptomatic HIV-1 infection, slowly replicating macrophage-tropic (M-tropic), non-syncytium-inducing (NSI) isolates are predominant (H Schuitemaker et al. 1992, T Zhu et al. 1993). During the course of HIV-1 infection, T lymphocyte-tropic (T-tropic), syncytium-inducing (SI) isolates with increased replication capacity emerge. The transition from M-tropic to T-tropic *in vivo* and the emergence of SI viruses, coincide with a drastic CD4<sup>+</sup> T cell decline and a more rapid progression to AIDS (RI Connor et al. 1994, 1997). More recently, the change of the viral phenotype/tropism followed by the switch in the co-receptor usage, has been suggested as a fundamental event in the follow-up of AIDS progression (S Glushakova et al. 1997). In this context, the understanding of the molecular basis involved in the transition of the viral phenotype may have important implications in the designing of therapeutic vaccines that can potentially block the emergence of these SI variants.

Many studies have addressed the V3 domain of HIV-1 gp120 as a major determinant of viral phenotype and a target of cell tropism (JJ De Jong et al. 1992, RA Fouchier et al. 1992). Construction of chimeric viruses derived from NSI and SI phenotypes, has also demonstrated the involvement of the V1-V2 and V4 hypervariable (M Groenink et al. 1993, M Cornelissen et al. 1995), and C4 regions (Carrillo & Ratner 1996, L Milich et al. 1997) in the induction of *in vitro* SI capacity.

The V3 region from SI variants has increased sequence diversity in addition to the basic amino acid substitutions when compared to NSI isolates (B Chesebro et al. 1992, L Milich et al. 1993). Certain substitutions of basic amino acids in the V3 loop have shown to be associated with changes in the viral phenotype from NSI to SI, and a decrease of the HIV-1 capacity to replicate in macrophages (D Bhattacharyya et al. 1996). Actually, the most significant correlation was observed between the SI phenotype and was the presence of specific basic amino acid substitutions within the V3 loop region (RA Fouchier et al. 1995).



In order to evaluate the molecular diversity of Brazilian HIV-1 isolates displaying different phenotypes/tropism, and the implications of the positively charged amino acid substitution in the V3 region, as predictor of a SI phenotype, we analyzed the patterns of amino acid diversity in Brazilian NSI-like and SI-like V3 sequences, from different HIV-1 subtypes. The presumed distribution of spatial charges the percentage of basic amino acid and the isoelectric point of the V3 region and their implications in the viral phenotype are discussed.

## **Materials and Methods**

### *Source of V3 sequences*

Forty-two Brazilian V3 envelope sequences and the corresponding biological phenotype obtained from different HIV-1 subtypes used in this analysis, were selected from the data published by Couto-Fernandez et al. (1994, 1999), Brazilian Network for HIV-1 isolation and characterization (1999) and from the HIV-1 sequence data base from Los Alamos (B Korber et al. 1998 – Los Alamos Database).

Six envelope sequences were obtained from HIV-1 positive individuals from different regions at the early (1987-1989) AIDS epidemic in Brazil (JC Couto-Fernandez et al. 1994). The others 9 samples were obtained more recently (1995-1997) from individuals showing different source of HIV-1 infection in Northeast Brazil (JC Couto-Fernandez et al. 1999). Moreover, 23 new V3 sequences were obtained by the Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization from HIV positive individuals selected in three sites for HIV-1 vaccines (São Paulo, Rio de Janeiro and Belo Horizonte). The remaining 4 sequences were obtained from a compilation of the V3 amino acid sequences from Brazilian HIV-1 isolates in sequence database (B Korber et al. 1998).

In all references of the V3 region alignment (figure 1), the N-terminal cysteine is referred to as position 1 and amino acids are numbered consecutively through the C-terminal cysteine which is numbered 35.

#### *Determination of V3 sequence variability*

In order to correlate the pattern of amino acid sequence variability within the V3 region that could characterize the viruses between the state SI and NSI, we compared directly the frequency of different amino acid substitutions at specific positions within the two groups of sequences. In our analysis, the criteria to consider an isolate as a potentially SI-like, were the presence of one or more non-conservative basic amino acid substitutions at positions 11, 13, 19, 23, 24, and 32 and a change at position 25 substituting an acidic amino acid by a neutral or basic amino acid. On the other hand, V3 sequences that do not have these features are considered to be NSI-like. A consensus sequence was derived for each HIV-1 subtype and the percentage of sequence variability was calculated by using CLUSTAL W (J Thompson et al. 1994).

#### *Hierarchical cluster analysis and Molecular Modeling*

The statistical correlation between biological activity and the physical protein properties such as isoelectric point, total charge and the percentage of basic amino acids were determined by a multivariate chemometric analysis by using the Peptide Comparison Software (Arthur plus 7 package programs, USA). The phylogenetic relationship between the different HIV-1 sequences and the relative distances between the samples were calculated by using The Distan & Hier Program. The builds of chester (phylogenetic) trees were implemented using the Hier Program. The presumable distribution of charges in function of the 35 amino acids that form the V3 region of Brazilian HIV-1 SI/NSI-like strains, were analyzed using the WebLab ViewerLite Program, version 3.10 (Molecular Simulation Inc, USA). The model of the V3 structures was based on homology modeling using the Swiss-PDB Viewer Program, version 3.1 (Glaxo Wellcome Inc., UK).

## Results

### *Analysis of the V3 region diversity*

Analyzing our results in comparison with V3 sequences deposited in the Los Alamos sequence Database, we identify in Brazilian HIV-1 isolates the majority of amino acid substitution described occurring in the V3 envelope region. The results of this analysis are summarized in figure 1, listed for significant amino acid changes in relation to consensus sequences of the different HIV-1 subtypes.

The threonine 2 was highly conserved in the majority of isolates. The substitution N5→S associated to a NSI phenotype, was observed in 4 NSI samples and one SI-like (3 subtype B and 2 subtype B"). The N7 was relatively conserved, only two NSI-like samples showing substitution for lysine (P7) and serine (RJ011). At this position, any samples showed the substitution N7 for tyrosine, associated to a SI phenotype (L Milich et al. 1997). The T8 was maintained in the majority of samples, only one NSI sample showed a basic amino acid substitution for lysine at this position, not showing correlation with the SI phenotype inducer. The substitution of R9→S, associated to this same phenotype, was observed in a not typable sample from Bahia (Ba103).

Four out of 31 subtype B samples showed the substitution K10→R (P7, Ba95, Ba118-subtype B and RJ013 variant B"), without correlation to the SI phenotype. Although the substitution of serine for glycine are not associated to a SI inducer profile at the position 10 (L Milich et al. 1997), 4 out of 5 Brazilian samples with this substitution (P6, P9 e RJ001), showed the SI capacity. The basic amino acid substitution S11→R was observed in a SI isolate (P4) and S11→D in a NSI isolate (RJ017). The isoleucine 12 was highly conserved, only one SI isolate (P4) showed substitution for methionine.

Position 13 appears to play a central role in V3 variability, although the nature of that role is unknown. This position is the only one that has substitutions present in both phenotype categories. The substitution H13→Y associated to the SI behavior was not observed in all

Brazilian HIV-1 samples. The substitutions H13→N and H13→P associated to the NSI phenotype was detected in 3 samples not phenotyped and 2 NSI-like strains. Additional substitutions of the H13 for T, S and Q were detected, not showing correlation with viral phenotype. HIV-1 samples collected in Bahia were the more polymorphic samples at this position, followed by B'' isolates. At position 14, we detected the substitution of I14 by methionine, leucine, phenylalanine and valine, apparently without involvement in the SI-capacity of these viruses.

The highly conserved residues at the tip of the V3 loop G15, P16, G17 and R18 represent the most important residues in forming the characteristic S-shaped turn structure of the loop (JB Ghiara et al. 1994). The glycines at positions 15 and 17 were highly conserved in all Brazilian HIV-1 isolates analyzed. On the other hand, at position 16 we detected the substitution of P16→F in three isolates (P6, P8 e RJ012) and P16→M in one isolate (P6).

Among the 31 subtype B samples analyzed, 9 showed the substitution for tryptophan at position 16, characteristic of the variant B''. Two substitutions were observed in the conserved basic arginine at position 18, where two samples changed R18→S (RJ004 and RJ011) and for a basic lysine in a not genotyped isolate (Ba95). The substitution of conserved A19→V, characteristic of the SI phenotype, was observed in only one SI-like isolate (P4), elsewhere, two additional changes for threonine and serine were verified at this position.

The role of F20→Y/V substitution in contributing to the SI phenotype has recently been demonstrated using a recombinant virus (B Chesebro et al. 1996). These substitutions were verified in only two T-cell adapted, SI isolates (P4 e P9). The additional substitution F20→L was observed in 7 samples, and F20→M in one SI isolate (RJ004). The tyrosine 21 was highly conserved in our samples, only one NSI isolate showed the Y21→I change. The substitution Y21→V/H, predictive of SI phenotype (L Milich et al. 1997) was not observed in HIV-1 Brazilian samples. Whereas the non-prediction phenotype substitution T22→A, was observed in 19 out of 31 subtype B isolates, in addition to the substitution T22→V and T22→G in a NSI isolate.

The substitution T23→A related to the SI phenotype was not observed in Brazilian samples. One SI isolate (RJ012) showed the substitution T23→I, and T23→S in a NSI isolate (MG003). The recent description that substitution of threonine for the polar amino acid asparagine at position 23 could lead to a concentration of positive charges as promoter of the SI phenotype (F Venier et al. 1999), was observed in two subtype B'' SI-isolates (RJ009 e RJ010). On fact, the analysis of spatial distribution of charges of the isolates that showed these same substitution patterns, clearly show a significant concentration of positive charges in this point (figure 2 a).

The glycine 24 was highly conserved in V3 sequences, one non-phenotyped isolate (Ba 103) showed the substitution G24→E, predictive of SI phenotype and a basic amino acid substitution G24→R was detected in a SI isolate (P9).

The acid residue E25, where substitutions to neutral or basic amino acids have a central role in determining viral tropism (JJ De Jong et al. 1992), and the emergence of SI viruses during the course of HIV-1 infection (RA Fouchier et al. 1992, D Bhattacharyya et al. 1996), was shown to be relatively conserved in the Brazilian HIV-1 isolates. The presence of acid glutamic (E) and aspartic (D) amino acids, have shown correlation with viruses that preferentially use the CCR5 co-receptor for infection (F Verrier et al. 1999). On the other hand, the presence of positively charge amino acid arginine (R), lysine (K) and the polar glutamine (Q), have been shown to display a strict correlation with the use of CXCR4 co-receptor for infection (B Korber et al. 1994, M Cornelissen et al. 1995).

In our analysis, among the 24 Brazilian HIV-1 isolates from subtype B biologically characterized, 21 have the acidic residues E (16) or D (5) at position 25. Of these, 12 HIV-1 samples (49,5%) showed the NSI phenotype and only two SI samples presented the basic substitution E25→K (P9) and polar substitution E25→Q (RJ004). Among the subtype F isolates, 3 out of 4 phenotyped samples showed the NSI profile. The substitution E25→N was observed in one subtype B NSI isolate (RJ011), one subtype F SI (RJ003) and the subtype C NSI isolate (SP006), confirming previous results that the amino acid

substitution of this residue alone was not capable to determinate the viral phenotype (L Milich et al. 1997).

The isoleucines at positions 26 and 27 were well conserved, one NSI sample showed the substitution I26→V (RJ011) and the substitution I27→V, predictive of SI phenotype (L Milich et al. 1997), was detected in a SI T-cell adapted isolate (P4). The G28 was unchanged in all Brazilian HIV-1 sequences.

Similarly to that occurring at position 25, a neutralization of negative charges was observed in function of the substitution D29→N (F Venier et al. 1999). This event was verified in 6 subtype B samples and one from subtype F (RJ003). Among them, 3 subtype B and one subtype F isolate showed the SI profile (RJ002, RJ009, RJ010 e RJ003). The analysis of spatial distribution of charges of the subtype F isolate that presented these same substitution pattern, clearly shows a significant concentration of positive charges in this point (figure VI). In addition, another SI subtype B isolate showed the basic substitution D29→K (RJ004).

One NSI subtype B isolate displayed the substitution of conserved isoleucine for proline at position 30, whereas the R31 was unchanged in all Brazilian HIV-1 samples. The glutamine at position 32 was relatively conserved between the subtype B isolates, only two samples showed the substitutions Q32→K (P4) and Q32→L (RJ002). Among the HIV-1 subtype F, one isolate (RJ003), displayed an unique substitution of K32 for leucine (Los Alamos Database, 1998). The substitution H34→Y was observed in the same subtype F isolate (RJ003) and in 6 HIV-1 subtype B.

#### *Hierarchical cluster analysis of protein parameters*

The percentage of basic amino acids in the V3 region of the different HIV-1 Brazilian isolates, varied between 11,76% and 22,85%. The isolates obtained in the early AIDS epidemic (JC Couto-Fernandez et al. 1992, 1994), that were submitted to multiple passage in lymphoblastoids cells, showed the higher values (mean 21,17%) and, samples recently

isolated by the Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization (1999), the smaller values (mean 15, 33%). No correlation was observed between this parameter and genetic subtypes, biological characteristics or geographical distribution. Although we analyzed a limited number of non-B isolates, we did not observe significant differences in the percentage of basic amino acids among B isolates and the others non-B HIV-1 subtypes. These values were similar also between SI-like isolates and NSI-like isolates.

The hierarchical cluster analyzes performed in the HIV-1 samples showed stricted phylogenetic relationship with respect to this parameter. Twenty-nine (92,8%) out of 42 samples, showed maximum values of similarity concerning the percentage of basic amino acids (figure II). The others 13 samples were segregated in three branches were the values of similarity varied between 58% to 80% .

No correlation was observed between HIV-1 subtype, phenotype or geographical distribution and the isoelectric point of the V3 region of the Brazilian isolates. A strict range of pI values was observed (8,86 to 11,35 ?), however, the hierarchical dendogram scaling determined considerable levels of diversity, where 17 out 42 samples have shown 100% of similarity. The others samples were segregated in seven branches varing the values of similarities from 45% to 95% (figure III).

No significant differences were observed in the value of total charges along the 35 amino acid that constitute the HIV-1 V3 region (data not shown).

#### *Molecular modeling of V3 region*

The molecular model structure established through the amino acid composition of V3 region from Brazilian HIV-1 isolates did not show any significant changes in their structure conformation (figure IV), in comparison with the structure consensus previously determined by Kwong et al. 1998. No differences were observed in the structure of the different HIV-1 subtypes or SI/NSI-like isolates (figure V). Apparently, the amino acid

diversity of the V3 region was not capable, for itself, to promote substantial turns in their conformational structure.

Even the B'' isolates, that present a drastic substitution of the conserved proline 16 at the top of V3 loop for tryptophan (fig. RJ009), and some isolates that presented multiple substitutions at specific positions (fig. RJ003), did not promote substantial conformational changes in the V3 structure (fig. 3).

On the other hand, when we analyzed the distribution of the positive charges in the V3 structure, a substantial concentration of these charges was observed in T lymphocyte-tropic, SI isolates, in comparison with macrophage-tropic, NSI isolates (fig. SI/NSI isolates). Although no differences were observed in the total positive charges among the different NSI/SI-like isolates, there is a clear point concentration of these charges, in specific regions of the V3, that could be attributed to basic and/or neutral substitutions at specific points.

A loss of positive charges was detected in the 3' extremity of the V3 protein, promoted by substitutions of a basic amino acid for a polar and/or hydrophobic amino acid in the positions 25 and 29. However, this loss of charge was not predictive of a given HIV-1 phenotype.

## **Discussion**

The V3 region of HIV-1 envelope has been identified as a primary target of neutralizing antibodies in laboratory-adapted and SI strains of HIV-1 (T Vogel et al. 1994; TC Vancott et al. 1995). The potential benefit of using V3 as a vaccine target was demonstrated through the use of an anti-V3 monoclonal antibody to block or lower infection in animals infected with culture-adapted HIV-1 isolates (EA Emini et al. 1992; AJ Conley et al. 1996). In this context knowledge of the underlying patterns of V3 variability should allow for an improved design of V3 peptides immunogens.



In order to identify amino acids elsewhere in the V3 region that may be linked to the patterns of sequences variability that should be associated with the determination of virus tropism. Among the HIV-1 Brazilian isolates, three substitutions in V3 sequences were frequently associated with the NSI phenotype: N5→S, K10→R and H13→T. The maintenance of acid residues at position 25 was also associated with viral NSI characteristics. On the other hand, six substitution patterns were frequently observed in viruses with the SI phenotype: S11→G, F20→Y/V, T23→N, D/E25→K, D29→N and H34→Y. Confirming previous results (L Milich et al. 1993), the analysis of V3 Brazilian sequences shows that certain substitutions are highly associated with the presence or absence of the basic amino acid at position 11 and 25. However, these same basic substitutions in other positions were not correlated with the virus phenotype. Positions 13, 20, 22, 25 and 29 showed dramatic increases in variability in SI and NSI-like HIV-1 isolates, mainly in T-cell adapted isolates (JC Couto-Fernandez et al. 1994).

In case of the substitution D29→N, the neutral amino acid asparagine can lead to different charge patterns due to its composition, depending on which rotamer is set this region became basic. In others words, when the ramification NH<sub>2</sub> becomes free of hydrogen bonds.

These patterns of substitution do not provide by themselves an answer to the nature of the SI switch, and in fact only a fraction are unique to either data set and none is present as a unique change in all of the sequences in V3 sequences data set. The fact that the changes are to a large extent specific suggest that the SI state of V3 region is a specific structure in some way distinct from the NSI state, although we did not observe any structural changes between SI and NSI-like isolates.

Finally, the complex nature of coreceptor choice and its impact on the variability seen in cell tropism, is also likely to contribute to the complexity of the patterns of sequence variability in V3 region.

## References

- Bhattacharyya, D., Brooks, BR. & Challahan, L. : Positioning of positively charged residues in the V3 loop correlates with HIV type 1 syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:83-90.
- Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization: HIV-1 diversity in Brazil: Genetic biological and immunological characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *J Acquir Immun Syndr Hum Retroviruses* 1999 (no prelo).
- Carrillo, A. & Ratner, L. : Human immunodeficiency virus type 1 tropism for lymphoid cell lines : Role of the V3 and C4 envelope determinants. *J Virology* 1996; 70:1301-1309.
- Connor, RI. & Ho, DD.: Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virology* 1994; 68:4400-4408.
- Connor, RI., Sheridan, KE., Ceradini, D. & Landau, NR. : Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185:621-628.
- Cornellisen, M., Muder-Campinga., G., Veenstra, J. et al. : Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium- inducing SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J Virology* 1995; 69: 1810-1818.
- Couto-Fernandez, JC., Janssens, W., Heyndrickx, L., Motte, J., Fransen, K., Delaporte, E., Galvão-Castro, B., Piot, P. & van der Groen, G. : Genetic and antigenic variability of HIV type 1 in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(9):1157-63.
- Couto-Fernandez, JC., Morgado, MG., Bongertz, V., Tanuri, A., Brites, C. & Galvão-Castro, B.: HIV-1 subtyping in Salvador-Bahia, Brazil: City with african sociodemographic characteristics. *J Acquir Immun Syndr Hum Retroviruses* 1999; 22(3):388-393.
- Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J. & Perryman, S.: Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: Definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virology* 1992; 66:6547-6554.
- Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J. & Perryman, S. : Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virology* 1996; 70:9055-9059.
- De Jong, JJ., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M. & Goudsmit, J. : Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype : Analysis of single amino acid substitution. *J Virology* 1992; 66:6777-6680.
- Fouchier, RA., Groenink, M., Kooststra, NA., Tersmette, M., Huisman, HG., Miedema, F. & Schuitemaker, H. : Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 molecule. *J Virology* 1992; 66:3183-3187.
- Fouchier, RA., Broesen, S., Brower, M., Tersmette, M., Van't Wout, AB., Groenink, M. & Schuitemaker, H. : Temporal relationship between elongation of the HIV type 1 glycoprotein 120

V2 domain and the conversion toward a syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:1473-1478.

- Ghiara, JB., Stura, EA., Satanfield, RL., Profy, AT. & Wilson, IA.: Crystal structure of the principal neutralization site of HIV-1. *Science* 1994; 264:82-85.

- Goudsmit, J.: The role of viral diversity in HIV pathogenesis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10:S15-19.

- Glushakova, S., Baibakov, B., Zimberg, J. & Margolis, LB.: Experimental HIV infection of human lymphoid tissue: Correlation of CD4+ T cell depletion and virus syncytium-inducing/non-syncytium-inducing phenotype in cocultures inoculated with laboratory strains and patient isolates of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:461-471.

- Groenink, M., Andeweg, AC., Fouchier, R., et al.: Phenotype-associated *env* gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for *in vivo* recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virology* 1992; 66:6175-6180.

- Korber, BT., Maclnnes, K., Smith, RF. & Myers, G.: Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virology* 1994; 68: 6730-6744.

- Korber, B., Hahn, B., Foley, B., Mellors, JW., Leitner, T., Myers, G., McCutchan, F. & Kuiken, CL. : Human retroviruses and AIDS : A Compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory 1998.

- Milich, L., Margolin, BH. & Swanström, R. : V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein : Interpreting sequence variability. *J Virology* 1993; 67:5623-5634.

- Milich, L., Margolin, BH. & Swanstrm, R. : Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked charge in the CD4-binding domain of the HIV-1 *env* protein. *Virology* 1997; 239:108-118.

- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, L. et al.: Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell tropic virus populations. *J. Virol.* 1992; 66:1354-1360.

- Thompson J, Higgins D, and Gibson, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. *Nucleic Acid. Res.* 1994; 22:4673-80.

- Korber, B., Hahn, B., Foley, B., Mellors, JW., Leitner, T., Myers, G., McCutchan, F. & Kuiken, CL. : Human retroviruses and AIDS : A Compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory 1998.

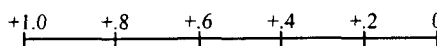
- Zhu, T., Mo, H., Wang, N., Nam, Ds., Cao, Y., Koup, RA. & Ho, DD.: Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993; 261:1179-1181.

	1	5	10	15	20	25	30	35																													
Consensus V3B	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C		
Consensus B''	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	M	G	W	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	Phenotype	
Subtype B/B''																																					
P3	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	M	G	W	G	R	T	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NSI	
P4	C	S	R	P	N	N	N	T	R	K	R	M	T	L	G	P	G	R	V	Y	T	T	G	E	I	V	G	D	I	R	K	A	H	C	SI		
P6	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	I	H	M	G	M	G	R	A	L	Y	V	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C	SI	
P7	C	T	R	P	S	N	K	K	R	R	I	H	I	G	P	G	R	A	F	I	G	T	-	E	I	T	G	D	I	R	Q	A	H	C	NSI		
P8	C	T	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	V	G	F	G	R	A	L	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NSI	
P9	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	I	H	I	G	P	G	R	A	V	Y	T	T	R	K	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	SI	
Subtype B (WHO)																																					
92BR004	C	T	R	P	G	N	N	T	R	K	G	I	P	I	G	P	G	G	S	F	Y	A	T	E	R	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	SI	
92BR014	C	I	R	P	N	N	N	T	R	R	S	I	P	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C	SI	
Subtype B																																					
Ba 23	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NA	
Ba 75	C	T	R	P	N	H	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	R	S	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	-	Q	A	P	C	NA	
Ba 95	C	T	R	P	N	N	N	T	R	R	S	I	Q	I	G	P	G	K	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C	NA	
Ba 103	C	T	R	P	N	N	N	T	S	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	W	Y	T	T	E	K	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C	NA	
Ba 104	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NA	
Ba 118	C	T	R	P	N	N	N	T	R	R	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NA	
Ba 122	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	A	I	I	G	N	I	R	Q	A	H	C	NA	
Subtype B																																					
RJ002	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	L	G	P	G	R	T	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	N	I	R	L	A	Y	C	SI	
RJ004	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	F	G	P	G	S	A	M	Y	A	T	G	Q	I	I	-	K	I	R	Q	A	H	C	SI	
RJ005	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	L	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	I	G	N	P	R	Q	A	H	C	NSI	
RJ011	C	T	R	P	S	N	S	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	S	A	F	Y	A	T	G	N	V	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NSI	
RJ012	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	M	G	F	G	R	A	L	Y	A	I	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	SI	
RJ015	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NSI	
RJ019	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	-	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	NSI	
RJ020	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	T	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	N	I	R	Q	A	H	C	NSI	
MG003	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	T	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	S	-	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	Y	C	NSI	
SP003	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	S	M	G	F	G	R	A	L	Y	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	SI	

Figure I: Amino acid alignment of HIV-1 envelope V3 region from Brazilian subtypes and biological phenotype.



SIMILARITY VALUES



Sample	% basic aa	HIV-1 Subtype	Phenotype
P6	17,44	B	SI
P8	17,44	B	NSI
BR4	17,44	B	SI
BA23	17,44	B	NA
RJ002	17,44	B	SI
RJ011	17,44	B	NSI
RJ015	17,44	B	NSI
RJ020	17,44	B	NSI
SP003	17,44	B	SI
RJ006	17,44	B''	SI
RJ008	17,44	B''	NSI
RJ009	17,44	B''	SI
RJ010	17,44	B''	SI
RJ013	17,44	B''	NSI
RJ016	17,44	B''	NSI
BA94	17,44	F	NA
RJ003	17,44	F	SI
BR025	17,44	C	NSI
SP006	17,44	C	NSI
P3	20,00	B''	NSI
BR020	20,00	F	NSI
BA104	20,00	B	NA
BA122	20,00	B	NA
RJ005	20,00	B	NSI
RJ012	20,00	B	SI
RJ001	20,00	B''	SI
BA73	20,00	F	NA
RJ014	20,00	F	NSI
SP004	20,00	F	NSI
BA118	20,08	B	NA
RJ004	20,58	B	SI
RJ019	20,58	B	NSI
BR014	14,28	B	SI
BA95	14,28	B	NA
BA103	14,28	B	NA
RJ017	14,28	B''	NSI
MG003	14,70	B	NSI
BA75	11,76*	B	NA
P4	22,85	B	SI
P9	22,85	B	SI
RJ021	22,85	F	NSI
P7	26,47**	B	NSI

Legend:  
 NSI - non-syncytium-inducer  
 SI - syncytium-inducer  
 Na - not available  
 \* - minimum % value  
 \*\* - maximum % value

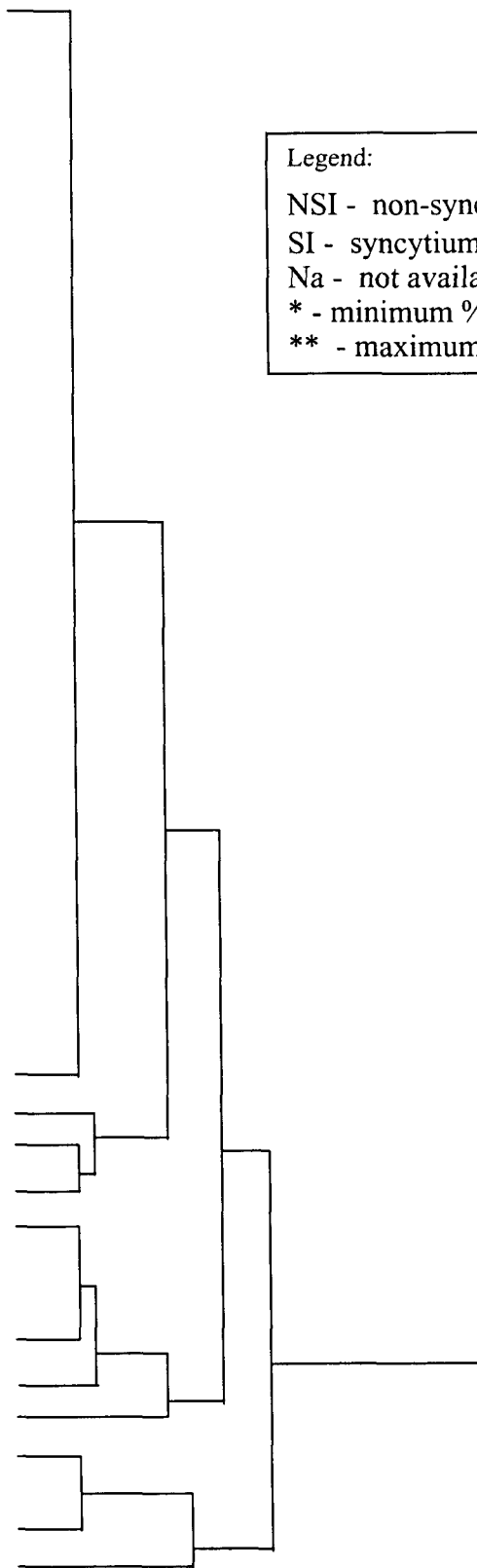
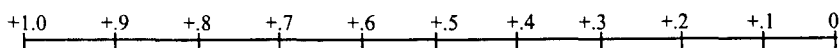


FIGURE II. HIERACHICAL DENDROGRAM PLOT - PERCENTAGE OF BASIC AMINO ACIDS OF V3 HIV-1 REGION EQUAL SAMPLE WEIGHT PAIR-GROUP METHOD OF CLUSTERING.

SIMILARITY VALUES



pI range: 8,86 - 11,35

Legend:  
 NSI - non-syncytium-inducer  
 SI - syncytium-inducer  
 ND - not determined  
 \* - minimum value  
 \*\* - maximum value

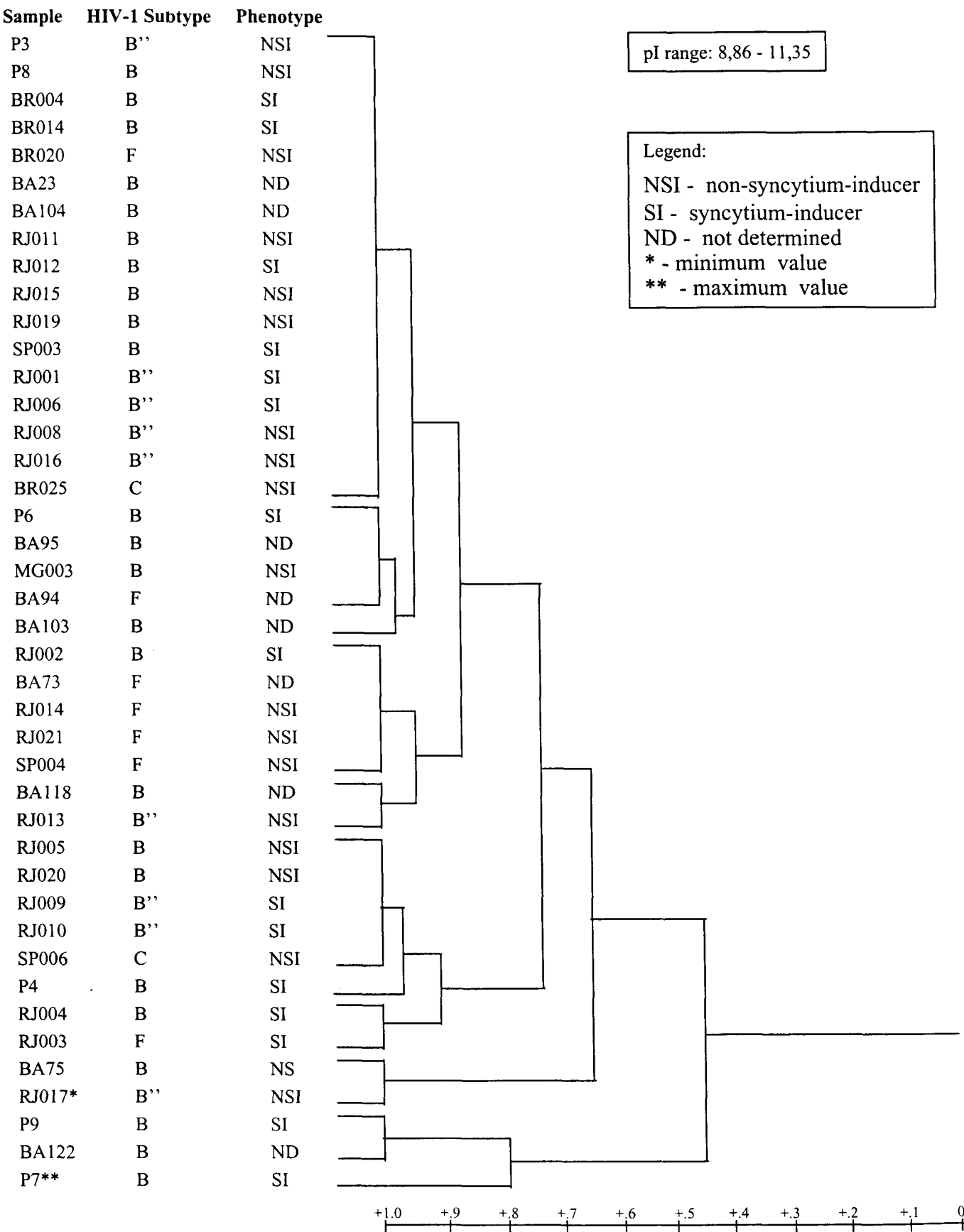
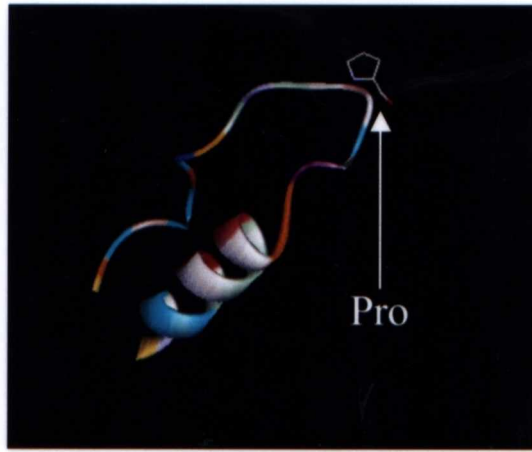
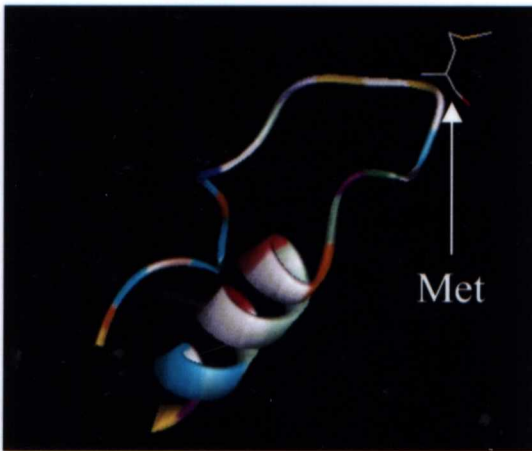


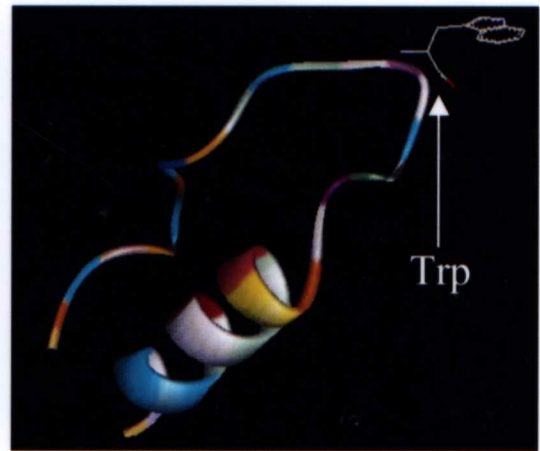
FIGURE III. HIERACHICAL DENDROGRAM PLOT - ISOELECTRIC POINT (pI) OF V3 PROTEIN  
 EQUAL SAMPLE WEIGHT PAIR-GROUP METHOD OF CLUSTERING



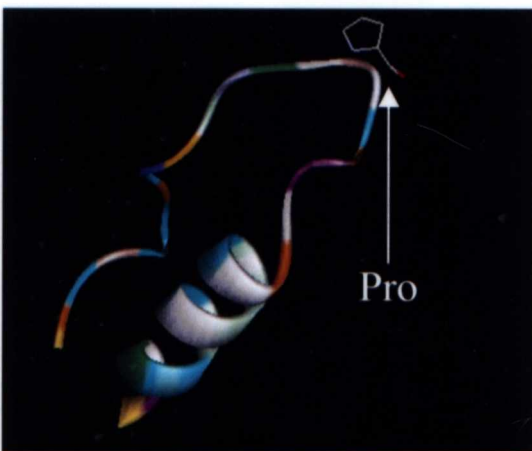
Consensus (B)



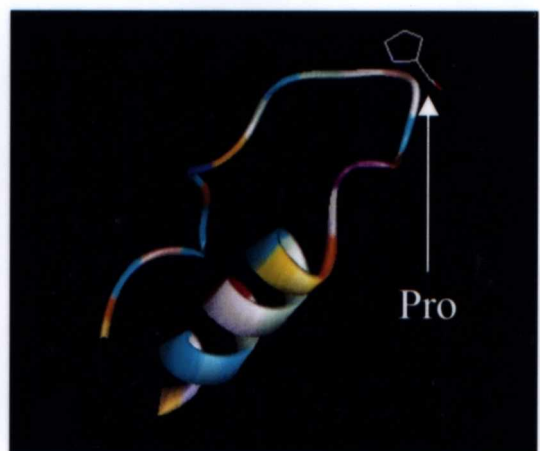
P6 (B)



RJ006 (B'')



RJ003 (F)



SP006 (C)

Figura IV. Structure conformation of envelope V3 loop of HIV-1 Brazilian subtypes. The colors are indicative of each amino acid position. The replacement of the proline 16 for methionine (P6) or tryptophan (RJ006) are in represented on the top of each figure. HIV-1 subtype of each isolated is indicated in parenthesis.



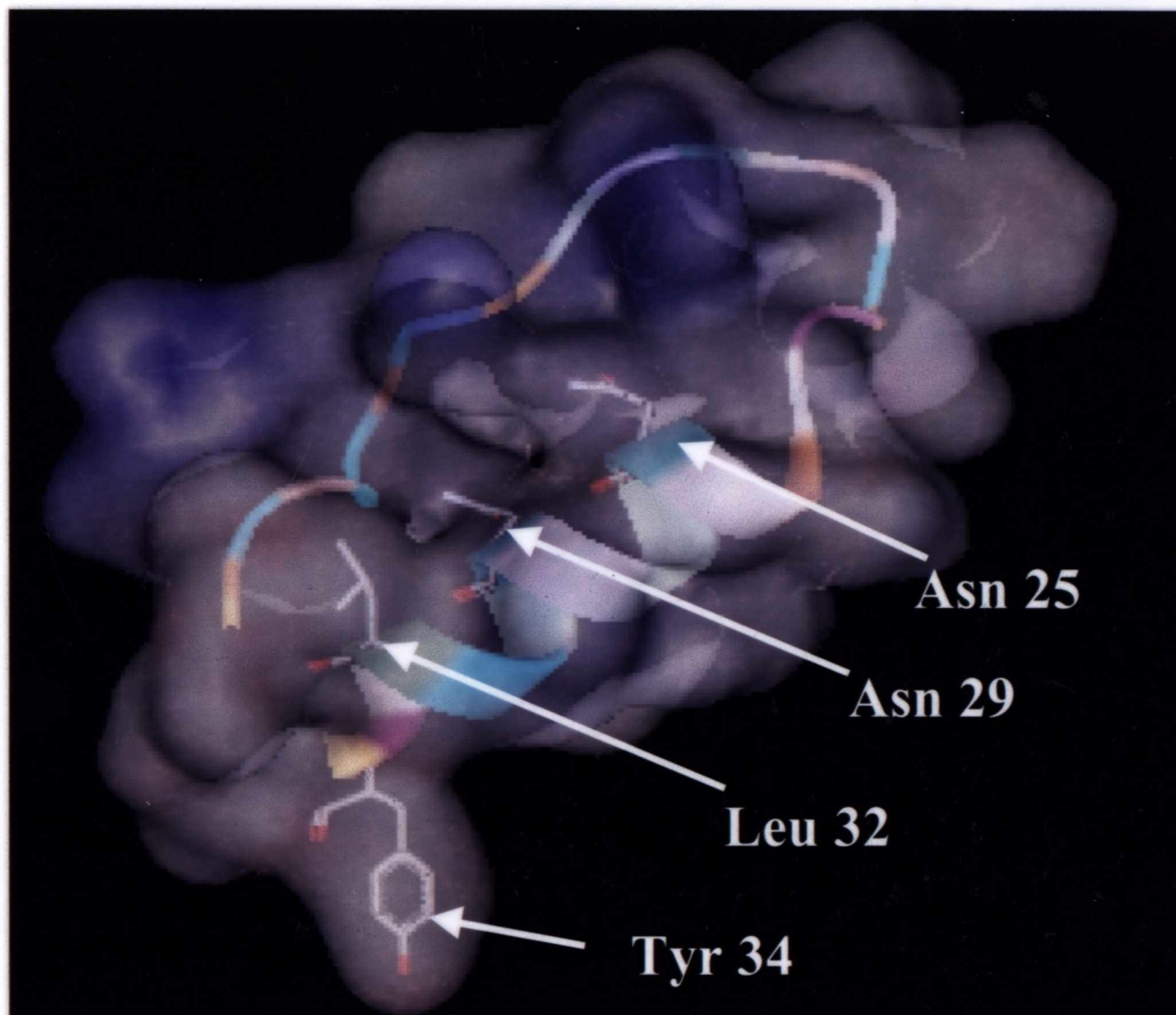


Figure VI. Amino acid substitution pattern of a SI Brazilian HIV-1 subtype F isolate. Positive charges are in blue and the arrows represents each specific amino acid substitution.

## DISCUSSÃO

Buscando melhor conhecer o espectro da diversidade do HIV-1 no Brasil, realizamos neste estudo o isolamento viral e a caracterização fenotípica, genotípica e antigênica de amostras de HIV-1 circulantes em diferentes regiões geográficas do país, em diferentes momentos da epidemia de AIDS no Brasil.

Analisando os primeiros isolados virais coletados no Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia, já podíamos observar um acentuado grau de diversidade, tanto ao nível fenotípico como genotípico, em amostras obtidas nos primórdios da epidemia de AIDS no Brasil (Couto-Fernandez e cols., 1992). Estes isolados mostravam um tropismo diferenciado frente às diferentes linhagens celulares utilizadas, além de um polimorfismo genético, determinado pelo perfil de restrição enzimática utilizando a técnica de RPLF (Benn e cols., 1985). Naquela época, as amostras de HIV-1 eram classificadas em função de sua proximidade genética com amostras africanas (tipo A) ou norte americanas/européias (tipo B). Os isolados brasileiros de HIV-1 mostraram perfis de restrição mais próximos dos vírus identificados nos EUA/Europa do que com as amostras de HIV-1 africanas usadas nesta análise comparativa (Couto-Fernandez e cols., 1992).

Subseqüentemente, a análise molecular das seqüências de nucleotídeos de uma região de aproximadamente 900pb do envelope viral destas amostras, entre outras, mostrou que suas estruturas genômicas estavam estreitamente relacionadas com o genótipo do subtipo B circulantes nos EUA e Europa (Couto-Fernandez e cols., 1994 - documento 1), confirmando os achados prévios baseados no perfil de RFLP.

A variante B<sup>2</sup> do HIV-1 foi identificada em uma amostra da Bahia, confirmando dados prévios da circulação desta variante na região nordeste (Potts e cols., 1993) e sudeste do Brasil (Morgado e cols., 1994). Além da substituição P→W, duas amostras da região sudeste mostram substituições atípicas no motivo GPG do topo da alça V3 (P→F e P→M), como descrito anteriormente para amostras do Rio de Janeiro (Morgado e cols., 1994).

A variabilidade fenotípica e genotípica do HIV-1 vem sendo bastante estudada em virtude das potenciais implicações em futuras preparações vacinais anti-HIV/AIDS. Nos últimos anos, uma grande quantidade de informações sobre os níveis de diversidade do HIV-1 se tornaram disponíveis graças a inúmeros estudos de caracterização coordenados pela OMS, realizados nos sítios selecionados para futuros testes de vacinas, além de uma série de iniciativas de diferentes grupos de pesquisa disseminados pelo mundo. O Brasil participou desta ação global, coletando amostras em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (região sudeste), onde a maioria dos casos estão concentrados, além de Rio Grande do Sul (região sul) e Bahia (região nordeste). Neste estudo foi identificada a presença dos subtipos genéticos B e C, sendo este último em 1 amostra entre 5 coletadas no Rio Grande do Sul (WHO Network for HIV-1 isolation and characterization, 1994).

Da mesma forma, buscando conhecer os níveis de diversidade do HIV-1 no Brasil, foi criada a Rede Nacional para o Isolamento e Caracterização do HIV-1 (1993), que permitiu isolar e analisar de forma detalhada as características genéticas, biológicas e antigênicas de amostras virais obtidas no Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization, documento 2 – no prelo).

De fato, a entrada diferenciada dos diferentes subtipos no Brasil pode ser constatada no estudo que realizamos no âmbito da Rede Nacional onde, ao analisarmos comparativamente as seqüências das amostras B e F coletadas em de diferentes estados da região sudeste, percebemos um percentual de divergência de 21% para as amostras do subtipo B, enquanto que no subtipo F a taxa de divergência foi de 10% (Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization. - documento 3, no prelo).

Níveis diferenciados de diversidade também puderam ser observados em outras regiões do Brasil onde as amostras coletadas na Bahia, apesar de mostrarem alto grau de variabilidade, apresentaram níveis de diversidade genética (18%) que poderiam sugerir uma circulação menos antiga de amostras do subtipo B e uma menor freqüência do subtipo F (2,9% das amostras estudadas), do que a observada na região sudeste (Couto-Fernandez e cols., 1999 - documento 4).

Nossos dados vêm se adicionar a estudos prévios que mostraram a presença dos subtipos B, F, C, D e, mais recentemente, A do HIV-1 no Brasil, além da ocorrência de genomas recombinantes e infecções mistas entre os diferentes subtipos virais (Potts e cols., 1993; Lowagie e cols., 1994; Morgado e cols., 1994; Couto-Fernandez e cols., 1994 - documento 1; Couto-Fernandez e cols., 1999 - documento 4; WHO, 1994; Morgado e cols., 1998; Janini e cols., 1998; Tanuri e cols., 1999; Caride e cols., 1999).

No seu conjunto, estes dados reforçam a necessidade de manutenção e ampliação de sistemas de monitoramento da diversidade dos diferentes subtipos do HIV-1 no Brasil, no sentido de se conhecer a prevalência dos diferentes subtipos genéticos nas regiões brasileiras

epidemiologicamente importantes para a infecção pelo HIV, assim como monitorar a introdução de novos subtipos e sua disseminação nos diferentes grupos populacionais, permitindo, assim, avaliar a influência desta diversidade na dinâmica da epidemia de AIDS no Brasil, assim como na seleção de reagentes mais apropriados para uso em nosso meio.

### **Análise da diversidade da alça V3 e relação com o fenótipo viral**

A alça V3 do HIV-1 tem sido implicada como alvo primário de anticorpos neutralizantes em amostras SI e isolados estabelecidos em linhagens celulares (Javaherian e cols., 1989; Profy e cols., 1990; Vogel e cols., 1994; Vancott e cols., 1995). O benefício potencial do uso de seqüências da alça V3 como alvo imunoprolático foi amplamente demonstrado no modelo experimental de infecção pelo HIV-1 em chimpanzés, através do uso de anticorpos monoclonais que protegiam contra a infecção viral, e que bloqueavam ou diminuían a infecção *in vitro* de amostras adaptadas em cultura (Emini e cols., 1992; Conley e cols., 1996). Esta região está igualmente implicada em numerosas funções biológicas do vírus, em particular suas propriedades citopatogênicas e replicativas (McKeating e cols., 1989; Grimaila e cols., 1992). Além disso, os aminoácidos que compõem a alça V3 constituem um determinante fundamental do tropismo viral por células macrofágicas ou por linfócitos T (Chesebro e cols., 1991; Trkola e cols., 1996; Wu e cols., 1996), ou seja, pelos co-receptores CCR5 ou CXCR4 (Dorang e cols., 1996; Feng e cols., 1996).

Aproximadamente 50% dos pacientes infectados com HIV-1 do subtipo B desenvolvem variantes virais SI durante o curso da infecção, cujo aparecimento está freqüentemente associado com uma perda acelerada de células CD4+ (Cheng-Mayer e cols., 1988; Koot e cols., 1996) e uma rápida progressão para AIDS (Richman e cols., 1994; Connor e cols., 1997). Apesar dos mecanismos envolvidos no surgimento destas variantes serem desconhecidos até o momento, esta transição do fenótipo viral, acompanhado pela mudança na utilização do co-receptor celular, parece ser um evento chave na patogenia da infecção pelo HIV-1 (Schuitemaker e cols., 1992; Koot e cols., 1996; Connor e cols., 1997).

Estudos mais recentes, utilizando anticorpos monoclonais dirigidos à alça V3 de diferentes isolados virais, sugerem que esta região adota uma conformação diferenciada segundo o fenótipo SI e NSI (Ebenbichler e cols., 1993; Fouchier e cols., 1995). Uma estreita correlação pode ser observada entre o aparecimento do fenótipo SI e mudanças na estrutura proteica do envelope viral do HIV-1 (Seillier-Moiseiwitsch e cols., 1994; Cornelissen e cols., 1995; Fouchier e cols., 1995). Certas substituições de aminoácidos básicos ao longo dos 35 aminoácidos que compõe a alça V3 têm mostrado correlação com a mudança do fenótipo NSI para SI, bem como com uma diminuição da capacidade replicativa destes isolados em macrófagos (De Jong e cols., 1992; Fouchier e cols., 1992; Groenink e cols., 1993). Mais recentemente, outras regiões do envelope como a V1/V2 e C4 foram igualmente implicadas na determinação do tropismo viral associada ao fenótipo do tipo SI (Cornelissen e cols., 1995; Carrillo & Ratner, 1996; Milich e cols., 1997).

Em relação à alça V3, sabemos que a substituição da arginina e lisina em posições específicas no V3, a presença de aminoácidos básicos nas posições 11 e 25 (De Jong, e cols., 1992; Fouchier e cols., 1992; Fouchier e cols., 1995) e a heterogeneidade adicional nas posições 11, 13, 19, 23, 24 e/ou 32, estão fortemente associadas ao surgimento do fenótipo SI (Milich e cols., 1993). Novas substituições no V3 foram mais recentemente descritas, às quais se atribui a responsabilidade da manutenção do perfil SI ou NSI, além de substituições presentes nos dois fenótipos sem, no entanto, apresentarem correlação com o perfil biológico (Milich e cols., 1997; Verrier e cols., 1999).

A fim de analisar a composição de aminoácidos da alça V3 e sua correlação com o fenótipo SI e NSI, procuramos alinhar as amostras brasileiras de HIV-1 incluídas neste estudo, em associação com amostras já disponíveis em banco de dados (Korber e cols., 1998).

O aminoácido correspondente à posição 13 da alça V3 aparentemente exerce um papel importante na variabilidade genética do envelope viral, (Milich e cols., 1997). De fato, nesta posição foi detectado o maior número de substituições entre as amostras analisadas. Os aminoácidos conservados no topo da alça V3: G15, G17 e R18, se mostraram bastante conservados em todas as amostras, contudo, na posição da P16, geralmente conservada, pudemos observar substituições em três isolados, além das 9 amostras que apresentavam a substituição P16→W tipicamente descrita para a variante B".

A presença dos aminoácidos ácidos D e E na posição 25 tem mostrado correlação com vírus que utilizam o co-receptor CCR5 para infecção (Bhattacharyya e cols., 1996;

Milich e cols., 1997). Por outro lado, a presença de aminoácidos básicos como a R, K e polares como Q, mostram correlação com isolados virais que utilizam preferencialmente o CXCR4 (Cornelissen e cols., 1995). Na nossa análise, entre as 24 amostras do subtipo B caracterizadas biologicamente, 21 possuíam o resíduo E (16) ou D (5) na posição 25. Entre elas, 12 amostras (49,5%) mostravam o fenótipo NSI, sugerindo que a presença de aminoácidos básicos nesta posição não é por si só determinante do tropismo viral..

A recente descrição de que a mudança do aminoácido D para N na posição 29 provocaria um acúmulo de cargas positivas nesta região associada ao fenótipo SI (Venier e cols., 1999), foi verificada em 6 amostras brasileiras do subtipo B e uma do subtipo F.

A única substituição inédita na estrutura da região V3 (Korber e cols., 1998 - Los Alamos Database) foi observada na posição 32 de uma amostra do subtipo F (RJ003), que apresenta a substituição K32→L, levando a uma diminuição de cargas positivas na terminação 3' da região V3. Mesmo com a substituição de um aminoácido básico por um hidrofóbico nesta posição, esta amostra mostra comportamento biológico característico do fenótipo SI, provavelmente mantida pela presença da asparagina (polar) na posição 25 (Verrier e cols., 1999).

O padrão de substituições de aminoácidos observados na alça V3 das amostras brasileiras não é capaz por si só de fornecer uma resposta sobre a natureza do surgimento de variantes SI. De fato, somente uma pequena parte destas substituições é conservada em todas as seqüências genômicas SI estudadas.



Analisando os níveis de diversidade das seqüências de aminoácidos da alça V3 das diferentes amostras brasileiras, podemos observar uma maior diversidade nas variantes indutoras de sincício, quando comparado às amostras não indutoras, confirmando dados prévios da literatura utilizando amostras norte americanas/européias (Chesebro e cols., 1991; McNearney e cols., 1992; Milich e cols., 1993). Por outro lado, pudemos observar associação entre o fenótipo SI e substituições I19→V, F20→Y/V e E25→K na região V3, conforme descrito por Milich e colaboradores (1997), além de substituições adicionais do tipo I27→V e D29→N (Verrier e cols., 1999). A freqüência de substituições básicas ao longo da alça V3 nestas amostras brasileiras SI foi consistente com dados obtidos a partir de isolados virais provenientes de diferentes regiões geográficas (Milich e cols., 1997).

Estudos mais recentes, utilizando vírus recombinantes e ensaios de seleção de tropismo para linhagens de células T, demonstraram claramente que a habilidade que certos vírus têm em crescer em linhagens T transformadas não é determinada somente pela presença de aminoácidos básicos em posições específicas na alça V3 (Chesebro e cols., 1996). De fato, o conceito da existência destas duas populações virais (NSI e NI) se mostra bastante genérico, na medida em que é possível identificar vírus que podem utilizar diferentes ou múltiplos co-receptores (Deng e cols., 1996; Simmonds e cols., 1996), vírus com tropismo diferenciado em culturas de células primárias e linhagens T transformadas (Chesebro e cols., 1996) e vírus trópicos por linhagens de células T que aparentemente não possuem a capacidade de induzir sincício (Yoshimura e cols., 1996). Todos estes eventos puderam ser comprovados analisando o perfil de substituições de aminoácidos e disposição das cargas positivas na região V3 das amostras brasileiras de HIV-1 incluídas neste estudo.

Primeiramente, foi possível detectar uma elevada concentração de cargas positivas nos isolados virais de 1994, submetidos a sucessivas passagens em linhagens celulares, independente do fenótipo viral (Couto-Fernandez e cols., 1992; Couto-Fernandez e cols., 1994 - documento 1). Já em outras amostras, não houve um acúmulo de cargas positivas, mas sim uma diminuição destas cargas em função de substituições de aminoácidos conservados básicos por outros aminoácidos polares e/ou hidrofóbicos, principalmente nas posição 13 e 34. O inverso deste evento ocorreu na posição 25, pela substituição do ácido glutâmico (subtipo C e F) e aspártico (subtipo B) conservados por aminoácidos sem carga, com diminuição do caráter ácido da proteína e levando, conseqüentemente, a um acúmulo de cargas positivas em todas as amostras SI, independente do subtipo. Podemos observar claramente nas imagens de distribuição de cargas das amostras SI um acúmulo de cargas positivas nesta região, como também na posição 34. Um fato interessante, que fala a favor desta diminuição de cargas positivas pela substituição de aminoácidos básicos e ácidos por polares e/ou hidrofóbicos, foi o ocorrido com um isolado do subtipo F (RJ003), que acumulou ambos eventos e uma substituição adicional K32→L, ainda não descrita para amostras deste subtipo. O resultado é que este isolado, com fortes características SI em cultura, possui uma densa concentração de cargas na posição 3' da região V3, sinalizando para uma ligação preferencial deste isolado ao co-receptor CXCR4.

Ainda com relação a este evento, podemos observar nas amostras coletadas na Bahia, durante o período de 1995 a 1997, uma elevada frequência das substituições da histidina nas posições 18 e 34 por aminoácidos polares. Não dispomos da fenotipagem destas amostras, porém, por se tratarem de IDUs na fase assintomática da infecção, podemos pressupor tratarem-se, provavelmente, de formas NSI.

Concluindo, podemos observar uma elevada diversidade nas seqüências de aminoácidos que compõem a região V3 do envelope das amostras brasileiras de HIV-1, assim como de suas propriedades biológicas independente do subtipo genético ou distribuição geográfica.

### **Diversidade viral durante o curso da infecção**

A variabilidade genética observada entre diferentes isolados virais tem aumentado progressivamente nos últimos anos (Kuiken e cols., 1996), devendo-se, principalmente, á uma rápida evolução das amostras virais *in vivo* durante a infecção HIV-1 (Lukashov & Goudsmit, 1998). De fato, a coexistência de variantes virais muito similares mas distintas geneticamente no mesmo paciente, já foi claramente descrita por vários autores (Meyerhans e cols., 1989; Goudsmit e cols., 1992; Diaz e cols., 1995; Lukashov e cols., 1995).

A fim de estudar as características genotípicas dos vírus presentes no momento da primo-infecção e durante o curso da infecção, a equipe de J. Goudsmit analisou amostras virais no momento da soroconversão e depois de cinco anos de infecção (Goudsmit e cols., 1996). Não foram observadas assinaturas nucleotídicas comuns a partir da análise das seqüências consenso dos dois grupos, apesar dos vírus encontrados no momento da primo infecção possuírem características fenotípicas similares (Kuiken e cols., 1996). Vários grupos estudaram isolados de HIV-1 no momento da soroconversão e não encontraram assinatura comum aos vírus transmitidos (McNearney e cols., 1992; Zhu e cols., 1993).

Por outro lado, estudos mais recentes, realizados em amostras de HIV-1 obtidas de pacientes infectados pelas vias sexual e parenteral, demonstraram que os vírus do subtipo B, obtidos a partir de usuários de drogas injetáveis (UDIs), diferiam das amostras coletadas de indivíduos homossexuais masculinos em diversas regiões genômicas, incluindo os genes *vpu*, *vpr* e seqüências codificadoras da alça V3 da gp120 do HIV-1 (Kuiken e cols., 1994, 1996). Buscando identificar assinaturas genômicas relacionadas à transmissão destas populações virais, vários estudos epidemiológicos foram realizados em diferentes grupos populacionais (Lukashov e cols., 1996, 1998; Goudsmit e cols., 1998).

A relação mais consistente desta diversidade foi baseada em duas substituições nucleotídicas sinônimas e uma mudança de aminoácido, dos quais o mais conservado é uma substituição no códon da segunda glicina localizada no topo da alça V3 do HIV-1 (Kuiken e cols., 1994). O códon GGC foi observado em 85% dos UDIs do norte da Europa, 71,4% da Grécia (Adwan e cols., 1999) e em 45% da América do Norte (Lukashov e cols., 1996). Entretanto, este padrão (GGC) não foi observado em amostras obtidas de homossexuais masculinos das mesmas regiões. Estas observações permitiram especular que as epidemias estabelecidas no norte da Europa em homossexuais e UDIs tiveram diferentes fontes de infecção (Lukashov e cols., 1996). Mais recentemente, este mesmo grupo conseguiu, através da análise deste padrão de assinatura genômica, determinar a origem comum dos vírus responsáveis pela recente epidemia de AIDS em indivíduos heterossexuais na Holanda (Lukashov & Goudsmit, 1998).

No Brasil, o subtipo B tem sido mostrado como o mais prevalente entre os diferentes grupos de risco (Lowagie e cols., 1994; WHO, 1994; Morgado e cols., 1994, 1998; Tanuri e cols., 1999; Couto-Fernandez, e cols., 1999 -documento 4; Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization - documento 3, no prelo). Apesar do maior número de casos de AIDS ainda estar concentrado no grupo de indivíduos homossexuais/bissexuais masculinos, tem-se detectado nos últimos anos um rápido aumento do número de casos entre UDIs e indivíduos heterossexuais, sugerindo que estes grupos teriam sido infectados posteriormente. Não se sabe, no entanto, se a infecção pelo HIV nestes grupos teria se dado por vírus transmitidos a partir de indivíduos homossexuais/bissexuais masculinos, ou por outras fontes independentes de infecção.

Para testar esta hipótese, avaliamos a assinatura genética das seqüências do envelope das amostra de HIV-1 obtidas de uma população restrita de usuários de drogas injetáveis (UDI) provenientes da cidade de Salvador, Bahia (Couto-Fernandez e cols., 1999 - documento 4) e amostras de indivíduos infectados por via sexual obtidas pela Rede Nacional para Isolamento e Caracterização do HIV-1 (documento 3 - no prelo).

Entre as cinco amostras de UDIs do subtipo B sequenciadas, duas amostras apresentavam a assinatura GGC e três a assinatura GGG no códon da segunda glicina do topo da alça V3. Por outro lado, a grande maioria das amostras de HIV-1 (76,5%) obtidas de 17 indivíduos infectados por via sexual (homo ou hetero) com HIV-1 do subtipo B incluídos no estudo da Rede Nacional (documentos 2 e 3), possuía a assinatura GGG nesta mesma posição. Duas amostras apresentaram o padrão GGA, enquanto que duas outras que apresentavam o códon GGC para a segunda glicina do topo da alça V3.

Nossos resultados portanto não permitiram identificar uma fonte diferenciada de infecção para as categorias estudadas. No entanto, considerando o número limitado de amostras incluídas nesta análise e a relativa diversidade geográfica das mesmas, estudos mais amplos serão necessários para melhor conhecimento da epidemiologia dos subtipos e variantes de HIV-1 e sua potencial introdução entre as diferentes categorias de exposição. Vale a pena ressaltar que todas as amostras do subtipo F, independente da categoria de transmissão, apresentavam o códon GGA para as duas glicinas no topo da alça V3.

A análise filogenética de amostras de HIV-1 do subtipo B mostrou acentuada relação de similaridade entre as amostras dos UDIs, chegando, em alguns casos, próximo de 95%. Por outro lado, as amostras obtidas a partir de indivíduos infectados por via sexual se mostravam menos relacionadas filogeneticamente entre si. Entretanto, como já descrito anteriormente, não pudemos evidenciar conclusivamente um padrão genético capaz de identificar variantes virais transmitidas preferencialmente por determinada via.

### **Diversidade antigênica e sua relação com o genótipo viral**

Um acentuado grau de diversidade antigênica pode ser observado durante a resposta induzida por anticorpos neutralizantes de pacientes infectados contra isolados virais homólogos, demonstrando claramente uma variabilidade *in vivo* do HIV-1 (Ho e cols., 1987; Goudsmit e cols., 1992).

Dois tipos de anticorpos neutralizantes podem ser observados durante a infecção pelo HIV-1, incluindo anticorpos que neutralizam múltiplos isolados virais (grupo-específico), e anticorpos que mostram sua capacidade de replicação restrita a um ou a poucos isolados (tipo-específico). Os anticorpos neutralizantes tipo-específicos são diretamente direcionados contra a alça V3, o principal domínio de neutralização (PND), e os grupo-específicos são mais diretamente relacionados à região de ligação CD4 (Goudsmit e cols., 1992; Buratti e cols., 1997).

A maioria dos indivíduos infectados desenvolve uma resposta por anticorpos neutralizantes tipo-específica contra o vírus autólogo. Entretanto, freqüentemente o HIV-1 “escapa” da neutralização, como evidenciado pela ausência de anticorpos neutralizantes autólogos contra isolados obtidos em uma fase mais tardia da infecção (McKeating e cols., 1989; Albert e cols., 1990b; Tremblay & Waimberg, 1990). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência à neutralização não foram ainda completamente elucidados, mas mutações na glicoproteína do envelope parecem ter um envolvimento importante (Carrow e cols., 1991; Back e cols., 1993). A maioria dos anticorpos contra epítomos definidos das moléculas da gp120, gp41 e gp160 do HIV-1 não possuem a capacidade de neutralização de isolados primários (Goudsmit e cols., 1992; Nyambi e cols., 1996). Entretanto, a maioria destes estudos foi realizada em isolados virais submetidos a múltiplas passagens em linhagens linfoblastóides T (TCLA - “T cell line adapted”), extremamente sensíveis à neutralização *in vitro*, por soro de indivíduos infectados. Ao contrário, isolados primários de HIV-1, mantidos sob um número reduzido de passagens em culturas primárias, são mais resistentes à neutralização (Van der Groen e cols., 1998).

Estes dados poderiam explicar em parte os níveis variáveis de neutralização heteróloga observados entre os isolados brasileiros de HIV-1 deste estudo, os quais foram mantidos em culturas de linfócitos estimulados pela PHA. Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura, onde se descreve que isolados virais mantidos em linhagens celulares são mais susceptíveis à neutralização, em comparação aos isolados primários de HIV-1 (Nyambi e cols., 1997).

A hipótese mais freqüente invocada para explicar a relativa resistência à neutralização de isolados primários é que, contrariamente as amostras cultivadas, os sítios de neutralização de destes isolados seriam menos acessíveis à ação dos anticorpos (Bou-Habib e cols., 1994). De fato, a modelagem molecular hipotética da estrutura tridimensional da gp120 do HIV-1 (Kwong e cols., 1998) mostra claramente que a alça V3 se apresenta menos exposta que outras regiões do envelope viral, sendo exposta progressivamente na medida que ocorre sua interação com os receptores (Moore & Binley, 1998), pouco antes da penetração viral na célula hospedeira.

A capacidade de neutralização heteróloga de soros policlonais obtidos de indivíduos infectados com vírus dos diferentes subtipos genéticos de HIV-1 do grupo M e grupo O em neutralizarem isolados primários dos mesmos subtipos de HIV-1, mostraram que a neutralização tipo-específica não possui correlação com os subtipos genéticos do HIV-1 (Moore e cols., 1995; Kostrikis e cols., 1996; Nyambi e cols., 1996; Weber e cols., 1997).

Estes dados estão de acordo com a análise do perfil de neutralização intra e inter-subtipo dos isolados brasileiros de HIV-1 incluídos neste estudo (Brazilian Network for



HIV-1 Isolation and Characterization, no prelo - documento 3), onde não observamos uma correlação entre os subtipos genéticos e o padrão de neutralização, apesar do pequeno número de amostras não-B incluídas neste estudo (4 amostras do subtipo F e uma do subtipo C). Estes resultados confirmam dados prévios mostrando extensa reatividade de amostras dos subtipos B, F e da variante B'' do HIV-1 no Brasil (Bongertz e cols., 1997, 1998).

A potente reatividade cruzada de anticorpos neutralizantes observada em certos soros deste estudo sugere que no indivíduo infectado o repertório de linfócitos B seja capaz de induzir uma resposta abrangente por anticorpos neutralizantes frente às diferentes variantes virais. É provável que esta capacidade neutralizante esteja relacionada a uma ativação sinérgica de diferentes populações de anticorpos, diretamente contra diferentes epítomos conservados, provavelmente com baixa imunogenicidade (Bongertz e cols., 1994a; Beirnaert e cols., 1998). Estes achados reforçam a hipótese que isolados primários de diferentes subtipos de HIV-1 possuem antígenos ou imunógenos comuns, com importante envolvimento numa ampla resposta neutralizante cruzada (Nyambi e cols., 1998).

O perfil de reatividade sorológica frente à diferentes peptídeos sintéticos gerados a partir de seqüências da alça V3 dos diferentes subtipos de HIV-1 representa, igualmente, uma importante ferramenta no estudo da diversidade antigênica do HIV-1. Inicialmente, o ensaio imunoenzimático utilizando peptídeos HIV-1-específicos ("enzyme-linked immunosorbent assay"- PEIA) foi utilizado, com o objetivo de identificar padrões de reatividade sorológica (sorotipos) capazes de discriminar ou agrupar os diferentes isolados de HIV-1 (Fields e cols., 1991). Posteriormente, esta metodologia foi introduzida na

determinação dos subtipos genéticos, ainda como complemento a estudos moleculares e biológicos em diferentes isolados virais (Cheingsong-Popov e cols., 1994). Em função das complexidades metodológicas em se tipar geneticamente o HIV-1 pela técnica de HMA ou sequenciamento molecular, esta técnica passou a ser uma possibilidade interessante na subtipagem do HIV-1 (Bachmman e cols., 1994). Além de permitir a análise sistematizada de um grande número de amostras, a sorotipagem do HIV-1 é uma técnica simples, economicamente viável e de fácil transferência de tecnologia.

A região V3 do envelope do HIV-1 foi selecionada como sítio antigênico para uso na sorotipagem por várias razões. Apesar de variável, esta região se mostra relativamente conservada entre os diferentes isolados (La Rosa e cols., 1990), além de ser altamente antigênica *in vivo*, a resposta imune humoral intensa contra este peptídeo é frequentemente detectada na maioria dos pacientes infectados pelo HIV-1 (Zwart e cols., 1992).

Nos últimos anos vários grupos de pesquisa utilizaram esta técnica objetivando a sorotipagem do HIV-1 (Pau e cols., 1993; Cheingsong-Popov e cols., 1994; WHO Network for HIV-1 Isolation and Characterization, 1994; Couto-Fernandez e cols., 1994 - documento 1; Bongertz e cols., 1994a, 1994b). Entretanto, mais recentemente, o valor desta metodologia na identificação dos subtipos genéticos do HIV-1 tem sido repetidamente questionado, em função da elevada frequência de reatividade cruzada entre os diferentes peptídeos sintéticos utilizados (Nkengasong e cols., 1998).

De fato, pudemos observar este evento em 114 soros obtidos de indivíduos HIV-1 positivos coletados no Rio de Janeiro (Couto-Fernandez e cols., 1994 – documento 1).

Dezoito diferentes padrões de sororeatividade puderam ser observados nestas amostras, onde 62,3% dos soros reagiram com mais de um peptídeo. Por outro lado, o elevado número de soros com nenhuma atividade frente aos diferentes peptídeos sugeriu a presença de variantes virais com formas diferenciadas ao genotipo conservado GPGR no topo da alça V3 de isolados brasileiros de HIV-1. Mais recentemente, analisando soros HIV-1 positivos provenientes de outras regiões geográficas (Couto-Fernandez e cols., 1999-documento 4; Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization, no prelo - documento 3), pudemos observar uma reatividade cruzada destes soros, não permitindo no seu conjunto, estabelecer nenhuma relação entre a reatividade sororógica à alça V3 e os diferentes subtipos genéticos de HIV-1 prevalentes no Brasil.

Esta ausência de diferentes sorotipos no Brasil, confirmados por resultados de neutralização, indica que ao contrário da existência de 2 sorotipos na Tailândia (Cheingsong-Popov e cols., 1998) e pelo menos 5 sorotipos na África (WHO, 1994), no Brasil a diversidade antigênica encontrada até o presente momento, não nos parece constituir uma barreira para os ensaios de vacinas anti-HIV/AIDS já em desenvolvimento baseados em isolados do subtipo B do HIV-1.

### **Sequenciamento genômico de amostras brasileiras não-B**

O sequenciamento molecular de grandes fragmentos genômicos, compreendendo a maior parte do genoma proviral, é o estágio mais avançado da caracterização genética da diversidade do HIV-1 e dos seus diferentes subtipos. Devido às limitações técnicas e

financeiras para a realização desta análise, a seleção destas amostras deve ser respaldada por uma série de parâmetros clínicos, virológicos e moleculares, capazes de direcionar a identificação de formas atípicas ou subtipos minoritários e/ou recombinantes, circulando em determinada região.

Além disso, a identificação de genomas representativos da pandemia devem ser priorizados, em virtude da possibilidade de recombinação entre subtipos levando, potencialmente, ao surgimento de formas com características biológicas alteradas e/ou resistentes às terapias anti-retrovirais, entre outros.

No documento número 5, apresentamos pela primeira vez o resultado do sequenciamento genético de uma amostra do subtipo D do HIV-1 isolada recentemente no Rio de Janeiro (Morgado e cols., 1998). Aproximadamente 5.500 pb do seu genoma foram analisados, cobrindo, no sentido 5'-3', a região dos genes acessórios do HIV-1 (genes *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu* e *ref*), todo o gene do envelope (*env*) e o gene *nef* (Couto-Fernandez e cols., submetido - documento 5). A análise filogenética destes fragmentos genéticos confirmou sua tipagem prévia como subtipo D do HIV-1, baseada na técnica de HMA e na análise da seqüência de nucleotídeos da região C2-V3 do envelope viral (Morgado e cols., 1998).

A análise filogenética do subtipo D brasileiro mostra claramente semelhança com isolados africanos de HIV-1. Não houve identificação de eventos de recombinação viral analisando-se os genes acessórios e envelope, com exceção da região *nef*, que apresentou uma seqüências genômicas similares à do subtipo B do HIV-1 (Couto-Fernandez e cols, 1999 -documento 5, figura 1b). Entretanto, este evento não foi respaldado pela análise das

distâncias evolutivas implementadas pelo programa Clustal W (Thompson e cols., 1994), onde se observou um baixo valor de “bootstrap” (62%) na análise filogenética (Couto-Fernandez e cols, 1999 - documento 5, figura 1a). Além disso, foi observada uma importante inserção de 34pb nas regiões V1-V2, as quais estão associadas ao tropismo viral (Groenink e cols., 1993; Andeweg e cols., 1993) e indução de anticorpos neutralizantes (Sullivan e cols., 1993).

A identificação e análise de genomas de amostras não-B, possibilita um melhor conhecimento dos mecanismos de diversidade do HIV-1 no Brasil, além de permitir identificar e mapear o surgimento de formas recombinantes no país. Um exemplo marcante desta realidade foi a própria identificação do subtipo D no Rio de Janeiro (Morgado e cols., 1998) onde, graças a diferentes programas epidemiológicos e de monitoramento da diversidade viral implantados no Brasil, foi possível identificar este subtipo de origem africana, em um paciente heterossexual, que nunca deixou o Brasil. Portanto, é bastante provável que a infecção se deu a partir de uma fonte externa, talvez introduzida e em circulação com outros subtipos epidemiologicamente importantes há alguns anos. Este evento pode permitir a recombinação gênica onde vários subtipos co-circulam favorecendo o surgimento de variantes com comportamento diferenciado tendo, conseqüentemente, potencial impacto sobre o diagnóstico, imunopatogenia e sensibilidade aos anti-retrovirais.

No seu conjunto, as informações incluídas neste estudo, reforçam a necessidade de manutenção e implementação de sistemas contínuos de vigilância epidemiológica da diversidade do HIV-1, principalmente em regiões fronteiriças, portuárias e de grande afluência turística, ou onde nenhum estudo de epidemiologia molecular foi até agora

conduzido. Estas medidas de vigilância serão de fundamental importância na prevenção de fontes potenciais de entrada de novos tipos, grupos, subtipos e variantes de HIV-1 no Brasil. Além disso, a associação entre estudos moleculares e imunológicos será de grande relevância no estabelecimento de futuros ensaios de vacinas anti-HIV/AIDS no Brasil.

## CONCLUSÕES

- 1) Quatro subtipos diferentes de HIV-1 (B/B'', F, C e D) puderam ser evidenciados nas amostras de HIV-1 incluídas neste estudo, coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil.
- 2) Uma maior diversidade genética foi observada entre amostras do subtipo B do que entre isolados do subtipo F, sugerindo uma introdução mais recente deste subtipo genético.
- 3) As amostras do subtipo B, independente de sua origem geográfica, mostraram relações filogenéticas com isolados norte-americanos/europeus. Chama a atenção o fato das amostras correspondentes à variante B'' terem se agrupado em um braço independente, embora incluído no subtipo B.
- 4) Uma menor prevalência do subtipo F do HIV-1 foi observada na região nordeste comparativamente à região sudeste do país.
- 5) A técnica de mobilidade de heteroduplexes, HMA, mostrou estreita correlação na subtipagem genética com os resultados obtidos a partir do sequenciamento de nucleotídeos, confirmando a validade desta técnica como apropriada no "screening" molecular de amostras de HIV-1.

- 6) Os elevados níveis de reatividade cruzada frente aos diferentes peptídeos sintéticos utilizados na sorotipagem do HIV-1, inviabilizam esta técnica para a determinação dos diferentes subtipos genéticos no Brasil, onde existe a circulação de múltiplos subtipos e variantes de HIV-1 antigenicamente relacionados.
- 7) Os elevados níveis de reatividade cruzada aos diferentes peptídeos sintéticos HIV-1-específicos utilizados neste estudo indicam, possivelmente, baixa diferenciação antigênica entre os diferentes subtipos prevalentes no Brasil. Este nos parece ser um dado promissor para ensaios de candidatos a vacinas baseados em isolados circulantes em países desenvolvidos.
- 8) A técnica de sororeatividade frente a diferentes peptídeos sintéticos associada aos perfis de neutralização e fenótipo biológico é uma ferramenta importante na avaliação do espectro de diversidade antigênica do HIV-1.
- 9) A ausência de diferentes sorotipos no Brasil verificada nestes estudos e confirmada pelos resultados de neutralização heteróloga, indica uma razoável homogeneidade antigênica dos genótipos virais circulantes no Brasil.
- 10) Não pudemos observar associação entre o genótipo viral e via de transmissão, sexo ou fator racial.



- 11) Apesar da população de Salvador-Bahia, mostrar características raciais e socio-demográficas fortemente relacionadas à países do continente africano, não pudemos observar um perfil de distribuição dos subtipos de HIV-1 como ocorre na África, ao contrário, um predomínio do subtipo B foi evidenciado nesta região.
  
- 12) O estabelecimento de um sistema coordenado para o estudo dos níveis de diversidade do HIV-1 no Brasil, permitiu melhor conhecer a distribuição dos diferentes subtipos genéticos, reforçando a necessidade de expansão deste sistema de vigilância para as demais regiões brasileiras.
  
- 13) A introdução de vírus não-B no Brasil pode ter importância no surgimento de formas recombinantes mostrando características antigênicas, replicativas, citopatogênicas e de resistência diferenciados, podendo exercer um potencial impacto sobre o perfil da epidemia de AIDS no Brasil

## PERSPECTIVAS E DIRETRIZES

A partir de um melhor conhecimento do polimorfismo do HIV-1 e da distribuição dos diferentes subtipos genéticos no Brasil, uma série de programas foram estabelecidos pelo Ministério da Saúde em parceria com diversas instituições governamentais, entre elas, a FIOCRUZ. Exemplos destas iniciativas podem ser citados como o estabelecimento do “Programa de monitoramento de subtipo de HIV-1 em diferentes regiões geográficas”, “Rede de quantificação de carga viral e tipagem de CD4 em pacientes acompanhados na rede pública, engajados em protocolos terapêuticos” e “Rede para monitoramento da resistência viral”, entre outras.

Todas estas informações em conjunto permitirão auxiliar na identificação de variantes virais e/ou recombinantes com patogenicidade diferenciada, representando um potencial de risco de disseminação na população. Dois exemplos marcantes que falam a favor desta possibilidade foi, (1) a explosão do subtipo C do HIV-1 nos últimos 10 anos, estendendo a infecção a focos epidemiologicamente importantes na Ásia e alguns países da África (UNAIDS, 1999) e, (2) a proliferação da forma recombinante em usuários de drogas na Rússia (Liitsola e cols., 1998).

Diversos registros recentes da introdução de subtipos não-B no Brasil já foram feitos, conforme discutido no corpo deste trabalho (Morgado e cols., 1994; WHO, 1994; Rede Nacional para isolamento e caracterização do HIV-1 no Brasil, no prelo; Caride e cols., 1994) e, através da análise detalhada de boa parte do genoma do subtipo D brasileiro onde pudemos identificar uma grande inserção na região V1V2 do seu envelope.

Este evento pode ter importância na imunopatogenia, diagnóstico e sensibilidade à drogas dos vírus transmitidos.

Pretendemos, a partir desta experiência na busca de respostas sobre os níveis de diversidade do HIV-1 no Brasil, contribuir na implementação dos programas de vigilância desta diversidade, direcionando nosso foco de interesse para um conhecimento mais aprofundado dos níveis de resistência dos diferentes subtipos de HIV-1, e de formas recombinantes frente aos diferentes antiretrovirais. Utilizaremos a abordagem fenotípica, através da avaliação dos níveis de sensibilidade à drogas, e genotípica, a partir do sequenciamento molecular do gene *pol* do HIV-1.

## BIBLIOGRAFIA

- Albert, J., Naucier, A., Böttiger, B., Broliden P.A., Albino, P., Ouattaara, S.A., Björkegren, C., Valentin, A., Biberfeld, G. & Fenyö, E.M.: Replicative capacity of HIV-2, like HIV-1, correlates with severity of immunodeficiency. *AIDS* 1990a; 4:291-295.
- Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., Aurelius, E., Gaines, H., Nyström, G. & Fenyö, E.M.: Rapid development of isolate specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 1990b; 4:107-112.
- Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Tiollais, P., Montagnier, L. & Wain-Hobson, S.: Molecular cloning of lymphadenopathy associated virus (LAV). *Nature* 1984; 312:757.
- Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L. & Sonigo, P.: Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* 1986; 46:63-74.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. & Berger, E.A.: CCR5: a RANTES, MIP-alpha, MIP-beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272:1955-1958.
- Andeweg, A.C., Leeftang, P., Osterhaus, A.D. & Bosch, M.L.: Both the V2 and V3 regions of the human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein functionally interact with other envelope regions in syncytium formation. *J Virology* 1993; 67:3232-3239.
- Andreolli, T. E., Benett, J. C., Carpenter, C.C., Plum, F. & Smith, L.H.: HIV infection and acquired immunodeficiency syndrome. In: Cecil Essentials of Medicine pp. 702-7019. Eds. Wyngaarden, J.B., Smith, L. H., Benett, J. C., WB Saunders Company. USA, 1993.

- Asjö, B., Albert, J., Karlsson, A. et al. : Replicative properties of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* 1986; ii:660-662.
  
- Bachmann, M.H., Delwart, E.L., Shpaer, E.G. et al : Rapid genetic characterization of HIV type 1 strains from four World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites using a heteroduplex mobility assay. WHO Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1345-1353.
  
- Back, N., Smit, L., Schutten, M., Nara, P.L., Tersmette, M. & Goudsmit, J. : Mutations in human immunodeficiency virus type 1 gp 41 affect neutralization by gp 120 antibodies. *J Virology* 1993; 67:6897-6902.
  
- Barber, A.M., Hizi, A., Maizel, J.V. & Hugues SH : HIV-1 Reverse transcriptase : structure predictions for the polymerase domain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990;6: 1061.
  
- Barin, F., Lahbabi, Y., Buzelay, L., Lejeune, B., Baillou-Beaufils, A., Denis, F., Mathiot, C., M'Boup, S., Vithaysai, V., Dietrich, U. & Goudeau, A. : Diversity of antibody binding to the V3 peptides representing consensus sequences of HIV-1 type 1 genotypes A to E : Na approach for HIV type serological subtyping.. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:1279-1289.
  
- Barker, E., Barnett, S.W., Stamatou, L. & Levy, J.A. : Human immunodeficiency virus. pp. 1-98. In *The Retroviridae*, vol 4. Ed. Levy, J.A. Plenum Press, New York 1995.
  
- Barré-Sinossi, F., Cherman, J.C., Rey P., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vézinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. : Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1993; 220:868-871.

- Barré-Sinossi, F. HIV as cause of AIDS. *Lancet* 1996; 348:31-35.
- Benn, S., Ruthledge, R., Folks, T., Gold, J., Baker, L., McCormick, J., Feorino, P., Piot, P., Quinn, T. & Martin, M. : Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science* 1985; 230:949-951.
- Beirnaert, E., Nyambi, P., Davis, D., Janssens, W. & van der Groen, G.: Characterization of potent HIV-1 sera able to neutralize 17 primary HIV-1 isolates belonging to group M (A-H) and group O. Abstract n° 31113. 12th World AIDS Conference Geneva, june 28-july 3, 1998.
- Bhattacharyya, D., Brooks, BR. & Challahan, L. : Positioning of positively charged residues in the V3 loop correlates with HIV type 1 syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:83-90.
- Binlay, JM., Wyatt, R., Desjardins, E., Kwong, PD., Hendrickson, W., Moore, JP. & Sodroski, J.: Analysis of the interaction of antibodies with a conserved, enzymatically deglycosylated core of the HIV type 1 envelope glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:191-198.
- Bobkov, A., Cheingsong-Popov, R., Garaev, M. & Weber, J. : Glycoprotein 120 polymorphism in na HIV type epidemic originating from a point source : nucleotide sequence analysis of variants with conserved V3 loop sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 10;12(3): 251-3.
- Boletim Epidemiológico AIDS : Ministério da Saúde - PNDST/AIDS, Ano XII, n° 03. Semana epidemiológica 22 a 34 - junho a agosto de 1999.

- Bongertz, V., Morgado, MG., Galvão-Castro, B., Wigzell, H. & Hendry, RM. : Correlation between anti-V3 peptide and neutralizing antibodies in plasma of HIV-1 infected individuals resident in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994a; 89(1):113-4.
  
- Bongertz, V., Jansson, M., Flodby, P., Morgado, MG., Galvão-Castro, B. & Wigzell, H. : Analysis of antibody specificity against the third variable region of the envelope gp120 of HIV-1 in plasma from HIV-1 positive individuals resident in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1994b; 27:1225-1236.
  
- Bongertz, V., Costa, CI., Grisztejn, B., Pilotto, JH., João Filho, EC. & Morgado, MG. : Neutralization of primary HIV-1 isolated from individuals residing in Rio de Janeiro. HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1996; 91(3): 343-5.
  
- Bongertz, V., Costa, CI., Santos, VG., João Filho, EC., Galvão-Castro, B. & Morgado, MG. : Correlation between susceptibility of primary HIV-1 isolates to autologous and heterologous neutralizing antibodies. Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. *AIDS* 1997; (8): 969-75.
  
- Bongertz, V., Costa, CI., Guimarães, ML., Grinsztejn & The HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. : Neutralization susceptibility of B subtype variant B'' primary HIV-1 isolates. *Scand J Immunology* 1998; 47:603-608.
  
- Bonhoeffer, S., Holmes, EC. & Nowak, MA. : Causes of HIV diversity. *Nature* 1995; 376:125.
  
- Bou-Habib, DC., Roderiques G., Oravec, T., Berman, PW., Lusso, P. & Norcross, MA. : Cyclic nature of envelope V3 region epitopes protects primary human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virology* 1994; 68: 6006-6013.

- Bour, S., Schubert, U. & Strebel, K. : The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to cytoplasmic domain of CD4 : implications for mechanism of degradation. *J Virology* 1995; 69: 1510-1520.
  
- Brelot, A., Heveker, N., Pleskoff, O., Sol, N. & Alizon, M. : Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus co-receptor activity. *J Virology* 1997; 71: 4744-4751.
  
- Brown, EW., Yuhki, N., Paker, C. & O'Brien, SJ. : A lion lentivirus related to feline immunodeficiency virus : epidemiologic and phylogenetic aspects. *J Virology* 1994; 68: 5953-5968.
  
- Bugelski, PJ., Maleef, BE., Klinkner, AM., Ventre, J. & Hart, TK. : Ultrastructural Evidence of an interaction between Env and Gag Proteins during assembly of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retrovirology* 1995; 11:55-63.
  
- Buratti, E., Tisminetzky, SG., D'Agaro, P. & Baralle, FE. : A neutralizing monoclonal antibody previously mapped exclusively on human immunodeficiency virus type 1 gp 41 recognizes an epitope in p17 sharing the core sequence IEEEE. *J Virology* 1997; 71:2457-2462.
  
- Bushman, F. & Craigie, R. : Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein *in vitro* : specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1339-1343.
  
- Campodonico, M., Fay, F., Taborda, M. & Fay, O. : Prevalence of HIV-1 subtypes in Argentina in Different risk groups. II Simpósio Brasileiro de Pesquisa Básica em HIV/AIDS 1997; Abstract nº 42, Angra do Reis, Rio de Janeiro, Brazil.



- Caride, E., Hertogs, K., Larder, B., Dehertogh, P., Brindeiro, R., Machado, E., De Sá, CAM., Eyer-Silva, W., Sion, W., Passioni, LFC, Menezes, JA., Calazans, AR. & Tanuri, A. : Genotyping and phenotyping of B and non-B human immunodeficiency virus type 1 subtypes from patients under highly active antiretroviral therapy. III Simpósio Brasileiro de Pesquisa Básica em HIV/AIDS. Comandatuba Island, Bahia, Brazil. Abstract nº 81.
  
- Carr, JK., Salminen, MO., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, AW., Hegerich, PA., St, Louis, D., Burke, DS. & McCutchan, FE. : Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virology* 1996; 70: 5935-5943.
  
- Carr, JK., Foley, BT., Leitner, T., Salminen, MO., Korber, B. & McCutchan, FE. : Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV-1 in the pandemic. Los Alamos 1998; III-10-11.
  
- Carr, JK., Laukkanen, T., Salminen, MO., Albert, J., Alaeus, A., Kim, B., Sandres-Buell, E., Birx, DL. & McCutchan, FE. : Genetic characterization of HIV-1 subtype A full length genomes from Africa. 1999- submitted.
  
- Carrillo, A. & Ratner, L. : Human immunodeficiency virus type 1 tropism for lymphoid cell lines : Role of the V3 and C4 envelope determinants. *J Virology* 1996; 70:1301-1309.
  
- Carrow, EW., Vujcic, LK., Glass, WL., Seamon, KB. Rasgoti, SC., Hendry, RM., Boulos, R., Nzila, N. & Quinnan, GV Jr. : High prevalence of antibodies to the gp 120 V3 region principal neutralizing determinants of HIV-1MN in sera from Africa and the Americas. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7:831-838.

- Castro de Betânjer, E., Davis, L., Echeverria de Pérez, G., Pereira dos Santos, A., Guimarães, LM. & Morgado, GM.: First subtype F identification among human immunodeficiency virus type 1 infected individuals from Venezuela: What are the epidemiological implications? *Revista Inst. Med Trop S Paulo* 1999; Abstract 046.
  
- Cazein, F., Hamers, FF., Alix, J. and Brunet, JB.: HIV-2 seroprevalence in Europe: a review of existing data. *XI International Conference on AIDS. Vancouver 1996; Abstract Mo.C. 1664.*
  
- CDC- Center for Disease Control. Persistent, generalized lymphadenopathy among homosexual males. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1982; 31:249-252.
  
- Chan, DC., Fass, D., Berger, JM. & Kim, PS.: Core structure of gp41 from HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; 89:263-273.
  
- Chanh, TC., Dreesman, GR., Kanda, P., Linette, GP., Sparrow, JT., Ho, DD. & Kennedy, RC.: Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *EMBO J* 1986; 5:3065-3071.
  
- Charneau, P., Borman, AM., Quillent, C., Guètar, D., Chamaret, S., Coehn., Rémy, G., Montagnier, L. & Clavel, F.: Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 1994; 205:247-253.
  
- Chen, Z., Telfier, P., Gettie, A., et al. Genetic characterization of a new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from feral sooty mangabey troop. *J Virology* 1997; 70:3617-3627.
  
- Cheng-Mayer, C., Seto, D., Tateno, M. & Levy, JA.: Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 1988; 240:80-82.

- Cheng-Mayer, C., Iannello, P., Shaw, K., Luciw, PA. & Levy, J. : Differential affects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* 1989; 246:1629-1632.
- Cheng-Mayer, C., Shioda, T. & Levy, J. : Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in tat and gp 120. *J Virology* 1991; 65:6931-6941.
- Cheingsong-Popov, R., Lister, S., Callow, D., Kaleebu, P., Beddows, S., Weber, J. & WHO Network for HIV-1 Isolation and Charaterization: serotyping of HIV type 1 by antibody biding to the V3 loop : relationship to viral genotypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1379-1386.
- Chesebro, B., Nishio, J., Perryman, S., Cann, A., O'Brien, W., Chen, I. & Wehrly, K. : Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. *J Virology* 1991; 65:5782-5789.
- Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J. & Perryman, S. : Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virology* 1996; 70:9055-9059.
- Clapham, PR. & Weiss, RA. : Sploit for choice of coreceptors. *Nature* 1997; 388:230-231.
- Clapham, PR. : HIV and Chemokines : ligants sharing cell-surface receptors. *Trends in Cell Biology* 1997; 7:264-268.

- Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.C., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.L. & Montagnier, L. . Isolation of a new retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233:343-346.
  
- Clerici, M., Lucey, DR., Zajac, RA., Boswell, RN., Gedel, HM., Takahashi, H., Berzofsky, JA. & Shearer, GM. : Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides gp160 in HIV-seropositive individuals. *J Immunol* 1991; 146:2214-2219.
  
- Cocchi, F., DeVico, AL., Garzino-Demo, A., Arya, SK., Gallo, RC. & Lusso, P. : Identification of RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270:1811-1815.
  
- Cocchi, F., Devico, A., Garzino-Demo, A., Cara AS., Gallo, RC. & Lusso, P. : V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nature Medicine* 1996; 2:1244-1247.
  
- Coffin, JM.: *Retroviridae : The viruses and their replication*. In : *Virology* 1992; pp. 1767-1846. Eds. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. Lippincott-Raven Publishers.
  
- Conley, AJ., Gorny, MK., Kessler JA., et al.: Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates by the broadly reactive anti-V3 monoclonal antibody 447-52D. *J Virology* 1994; 68:6994-7000.
  
- Conley, AJ., Kessler, JA., Boots, LJ., Mckenna, PM., Schleif, WA., Emini, EA., Mark, GE., Katinger, H., Cobb, EK., Lunceford, SM., Rouse, SR. & Murthy, KK. : The consequence of passive administration of na anti-human immunodeficiency virus type 1 neutralizing monoclonal antibody before challenge of chimpanzees with a primary virus isolate. *J Virology* 1996; 70:6751-6758.

- Connor, RI., Sheridan, KE., Ceradini, D. & Landau, NR. : Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185:621-628.
  
- Cornelissen, M., Muder-Campinga, G., Veenstra, J. et al. : Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium- inducing SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J Virology* 1995; 69:1810-1818.
  
- Cornelissen, M., Kampinga, G., Zorgdrager, F., Goudsmit, J. : Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. The UNAIDS Network for HIV isolation and characterization. *J Virology* 1996; 70:8209-8212.
  
- Coombs, R., Collier, A., Allain, JP., et al.: Plasma viremia in human immunodeficiency infection. *New Engl. J Med* 1989; 321:1626-1631.
  
- Couto-Fernandez, JC., Morgado, MG., Ivo-dos-Santos, I. & Galvão-Castro, B. : Molecular and Biological Diversity of HIV-1 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87(2):249-255.
  
- Couto-Fernandez, JC., Janssens, W., Heyndrickx, L., Motte, J., Fransen, K., Delaporte, E., Galvão-Castro, B., Piot, P. & van der Groen, G. : Genetic and antigenic variability of HIV type 1 in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(9):1157-63.
  
- Dalglish, AG., Beverley, PC., Clapham, PR., Crawford, DH., Greaves, MF. & Weiss, RA. : The CD4 (T4) antigen is essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312:763-767.

- Dannull, J., Surovov, A., Jung, G. & Moelling, K. : Specific binding of HIV-1 nucleocapsid protein to PSI RNA *in vitro* requires N terminal zinc finger and flanking basic amino acid residues. *EMBO J* 1994; 13:1525-1533.
  
- De Jong, JJ., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M. & Goudsmit, J. : Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype : Analysis of single amino acid substitution. *J Virology* 1992; 66:6777-6680.
  
- Delwart, EL., Sphaer, EG., Louwagie, J. et al. : Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993; 262:1257-61.
  
- Deng, H., Liu, R., Elmlmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, RE., Hill, CM., Davis, CB., Peiper, SC., Schall, TJ., Littman, DR. & Landau, NR. : Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:661-666.
  
- Desgranges, C., Fillon, S., Letourneur, F., Buzelay, L., Sepulveda, C., Guzman, MA., Afani, A., Barin, F. & Saragosti, S. : HIV-1 subtypes in Santiago, Chile. *AIDS* 1998; 12(12):1563-5.
  
- Diaz, RS., Sabino, EC., Mater, A., Mosley, JW., Busch, MP. : Dual Human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a Safety Study Group. *J Virology* 1995 ; 69:3273-3281.
  
- Dietrich, U., Maniar, JK. & Rübnsamen-Waigmann, H.: The epidemiology of HIV in India. *Trends Microbiol.* 1995; 3:17-21.

- Doranz, BJ., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, RJ., Samson, M., Peiper, SC., Parmentier, M., Collman, RG. & Doms, RW. : A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKr-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85:1149-1158.
- Dorfman, T., Mammano, F., Halsetine, W. & Göttlinger, H. : Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virology* 1994; 68:1689-1696.
- Dourado I, Andrade T, Carpenter CL et al. Risk factor for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in Northeast Brazil: Possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(1):13-18.
- Drake, JW. : A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1991; 88:7160-7164.
- D'Souza, MP. & Harden, VA.: Chemokines and HIV-1 second receptor. *Nature Medicine* 1996; 2:1293-1300.
- D'Souza, MP., Livnat, D., Bradac, JA., Bridges, SH. & the AIDS clinical trials group antibody selection working group and collaborating investigators: Evolution of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by neutralization assays: performance criteria for selecting candidate antibodies for clinical trials. *J Infect Dis* 1997; 175:1056-1062.
- Dumitrescu, O., Kalish, ML., Kliks, S., Bandea, CI., Levy, JA. : Characterization of human immunodeficiency type 1 isolates from children in Romania: identification of a new envelope subtype. *J Infect Dis* 1994; 169:281-288.

- Ebenbichler, C., Westervelt, P., Carrilo, A., Henkel, T., Johnson, D. & Ratner, L. : Structure-function relationships of the HIV-1 envelope V3 loop tropism determinant : Evidence for two distinct conformations. *AIDS* 1993; 7:639-646.
  
- Ellenberger, DL., Pieniazek, D., Nkengasong, J., Luo, CC., Devare, S., Maurice, C., Janini, M., Ramos, A., Fridlund, C., Hu, DJ., Coulibaly, IM., Ekpini, E., Wiktor, SJ., Greenberg, AE., Schochetman, G. & Rayfield, MA. : Genetic analysis of human immunodeficiency virus in Abidjan, Ivory Coast reveals predominance of HIV type 1 subtype A and introduction of subtype G. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15:3-9.
  
- Emini, EA., Schleif, WA., Nunberg, JH., Conley, AJ., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, SD., Matsushita, S., Cobb, KE., Jett, CM., Eichberg, JW. & Murthy, KK. : Prevention in chimpanzees by gp 120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* 1992; 355:728-730.
  
- Emerman, M., Vazeux, R. & Peden, K. : The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-species RNA localisation. *Cell* 1989; 57:1155-1165.
  
- Fauci, AS. : Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996; 398 :529-543.
  
- Feng, Y., Broder, CC., Kennedy, PE. & Berger, EA. : HIV-1 entry cofactor : Functional cDNA cloning of a human seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272:872-877.
  
- Fenoulillet, E.: La N-glycosylation du VIH : du modèle expérimental à l'application thérapeutique. *Medecine Sciences* 1993; 9:901-906.



- Fenyő, EM., Mortfeldt-Manson, L., Chiodi, F., et al.: Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virology* 1988; 62:4414-4419.
  
- Fenyő, E-M., Berger, EA., Doms, RW., Korber, BTM., Littman, DR., Moore, JP., Satentau, QJ., Schuitemaker, H., Sodroski, J. & Weiss, RA. : A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; 391:240.
  
- Fields, B., Knipe, D., Chanock, R., Melnick, J., Roizman, B. & Shope, R. (eds.): *In Virology*, Raven Press, New York, 1991.
  
- Fischer, A., Ensoli, B., Ivanoff, S. et al : The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* 1987; 23:888-893.
  
- Fouchier, RA., Groenink, M., Kooststra, NA., Tersmette, M., Huisman, HG., Miedema, F. & Schuitemaker, H. : Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 molecule. *J Virology* 1992; 66:3183-3187.
  
- Fouchier, RA., Broesen, S., Brower, M., Tersmette, M., Van't Wout, AB., Groenink, M. & Schuitemaker, H. : Temporal relationship between elongation of the HIV type 1 glycoprotein 120 V2 domain and the conversion toward a syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 1995; 11:1473-1478.
  
- Freed, E.O. & Martin, M.A. : Evidence for a functional Interaction between the V1/V2 and C4 Domains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp 120. *J Virology* 1994; 68:2503-2512.
  
- Fung, MSC., Sun, CRY., Gordon, WL., Liou, RS., Chang, TW., Sun, WNC. et al : Identification and characterization of a neutralization site within the second variable region of human immunodeficiency virus type 1 gp 120. *J Virology* 1992; 66:848-856.

- Gallo, RC., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, GM., Kaplan, M., Haynes, BF., Palker, TJ., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. & Markham, PD. : Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224:500-503.
  
- Gallo, R.C. : The first human retrovirus. *Scientific American*, 1986; 255:88-98.
  
- Galvão-Castro, B., Couto-Fernandez, JC., Castilho, EA., Pereira, HG. & Pereira, M. : Human immunodeficiency virus infection in Brazil. *JAMA* 1987a; 257:2592-2593.
  
- Galvão-Castro, B., Ivo-dos-Santos, J., Couto-Fernandez, JC., Bongertz, V., Bou-Habib, DC., Sion, FS., Bart, OM., Pereira, HG. & Pereira, MS. : Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 1987b; 82(4):453-456.
  
- Gao, F., Human infection by genetically-diverse SIVsm-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 1992; 358:495-499.
  
- Gao, F., Robertson, DL., Morrison, SG., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, PN., Girard, M., Shaw, GM., Hahn and WHO and NIAID networks for HIV isolation and characterization : The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virology* 1996a; 70(10):7013-1029.
  
- Gao, F., Morrison, SG., Robertson, DL. et al : Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *J Virology* 1996b; 70: 1651-1657.

- Gao, F., Robertson, DL., Carruthers, D. et al. : A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virology* 1998; 72:5680-5698.
  
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, DL., Chen, Y., Rodenburg, CM., Michel, SF., Cummins, LB., Arthur, LO., Peeters, M., Shaw, GM., Sharp, PM. & Hahn, BH. : Origin of HIV-1 in chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397:436-441.
  
- Garcia, JA., Wu, FK., Mitsuyasu, R. & Gaynor, RB. : Interaction of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J* 1987; 6:3761-3770.
  
- Gelderblom, HR., Hausmann, EHS., Ozel, M., Pauli, G. & Koch, M. : Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocation of structural proteins. *Virology* 1987; 156:171-176.
  
- George, JR., Ou, CY., Parekh, B. et al. : Prevalence of HIV-1 and HIV-2 mixed infection in Côte D'Ivoire. *Lancet* 1992; 340: 337-339.
  
- Gibbs, J.S., Regier, DA. & Desrosiers, RC. : Construction and *in vitro* properties of SIV<sub>MAL</sub> mutants with deletions in 'Nonessential' genes. *AIDS Res. Hum Retroviruses* 1994; 10:607-616.
  
- Girard, PM., Katlama, C., Pailoux, G.: *SIDA* Edition 1998, Doin éditeurs - Paris, France.
  
- Gonzáles, SA., Affranchino, JL., Gelderblom, HR. & Burny, A. : Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus into virus-like particles. *Virology* 1993; 194:548-556.

- Gottlieb, MS., Schroff, R., Schanker, HM., Weisman, JD., Fan, PT., Wolf, RA. & Saxon, A.: *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl. J Med 1981; 305:1425-1431.
  
- Goudsmit, J., Thiriart, C., Smit, L., Bruck, C. & Gibbs, CJ. : Temporal development of cross-neutralization between HTLV-IIIB and HTLV-IIIRF in experimentally infected chimpanzees. Vaccine 1988; 6:229-232.
  
- Goudsmit, J.: Humoral immune response in human HIV-1 infection: clearance of initial burst of virus replication and protection against disease progression. Int. Rev. Immunol. 1992; 8:65-81.
  
- Goudsmit, J., De Ronde, A., Ho, DD. & Perelson, AS.: Human immunodeficiency virus fitness in vivo: calculations based on a single zidovudine resistance mutations at codon 215 of reverse transcriptase. J Virology 1996; 70:5662-5664.
  
- Goudsmit, J., Lukashov, VV., Amenijden, EJ., Zorgdrager, F., van den Burg, R. & Cornelissen, M. : Impact of sexual versus parental transmission events on the evolution of the gag and env genes of HIV type 1. AIDS Res Hum Retroviruses 1998; 14(16):1483-6.
  
- Green, WC. : The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. N Engl J Med. 1991; 324:308-315.
  
- Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., et al. : Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. J Virology 1994; 68 :2161-2168.

- Grimaila, R., Fuller, BA., Rennert, PD., Nelson, MB., Hammerskjold, ML., Potts, B., Murray, M., Putney, SD. & Gray, G. : Mutations in principal neutralization determinant of human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics and neutralization. *J Virology* 1992; 66:1875-1883.
  
- Groenink, M., Andeweg, AC., Fouchier, R., et al.: Phenotype-associated *env* gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for *in vivo* recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virology* 1992; 66:6175-6180.
  
- Groenink, M., Fouchier, RA., Broersen, S., Baker, CH., Koot, M., van't Wout, AB., Huisman, HG., Miedema, F., Tersmette, M. & Schuitemaker, H. : Relation of phenotype evolution of HIV-1 to the envelope V2 configuration. *Science* 1993; 260:1513-1516.
  
- Groopman, JE., Benz, PM., Ferriani, R., Mayer, K., Alan, JD, & Weymouth, LA.: Characterization of serum neutralization response to human immunodeficiency virus (HIV). *AIDS Res Hum Retroviruses* 1987; 3:71-85.
  
- Haseltine, W.A. : Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS* 1992; 6:347-363.
  
- Hayami, M., Ido, E. & Miura, T. : Survey of simian immunodeficiency virus among non human primate-populations. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 188:1-20.
  
- Heredia, A., Vallejo, A., Soriano, V., Epstein, JS. & Hewlett IK.: Chemokine receptors and HIV-2. *AIDS* 1997; 11:1198-1199.
  
- Hill, CM. & Littman, DR. : Natural resistance to HIV. *Nature* 1996; 392 :668-669.

- Hirsch, VM., Olmsted, RA., Murphey-Corb, M., Purcell, RH. & Johnson, PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1989; 339:389-392.
  
- Ho, D., Sarngadharan, MG., Hirsch, MS., et al.: Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognize several conserved domains on the envelope glycoproteins. *J. Virology* 1987; 61:2024-2028.
  
- Ho, D., Neumann, AU., Perelson, AS., Chen, W., Leonard, JM., Marcowitz, M. : Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995, 373 :123-126.
  
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A ., Roelants, G . & Wain-Robson. : Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 1990; 345:356-359.
  
- Hu, DJ., Dondero, TJ., Rayfield, MA., George, JR., Schochetman, G., Jaffe, HW. et al. : The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 1996; 275:210-6.
  
- dos Santos, JI., Lopes, Ma., Deliege-Vasconcelos, E., Couto-Fernandez, JC., Patel, BN., Barreto, ML., Ferreira Júnior, OC. & Galvão-Castro, B.: Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37(4):343-8.
  
- Iwatani, Y., Song, S.K., Wang, L., Planas, J., Sakai, H., Ishimoto, A. & Cloyd, M. W. : Human immunodeficiency virus type 1 Vpu modifies viral cytopathic effect through augment virus release. *J Gen Virol* 1997; 78:841-846.
  
- Janini, LM., Pieniazek, D., Peralta, Jm. et al. : Identificacion of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. *Virus Genes* 1996; 13:69-81.

- Janini, LM., Tanuri, A., Shechter, M., Peralta, JM., Vicente, AC., Dela torre, N., Pieniazek, NJ., Luo, G., Ramos, A., Soriano, V., Schochteman, G., Rayefield, MA., Pieniazek, D. : Horizontal and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 dual infections caused by subtypes B and C. *J Infect Dis*, 1998; 177(1):227-231.
  
- Janssens, W., et al. : Phylogenetic analysis of a new chimpanzees lentivirus SIVcpz-gab2 from a wild-captured chimpanzees from Gabon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994a; 10:1191-1192.
  
- Janssens, W., Heyndrickx, L., Van de Peer, Y., Bouckaert, A., Fransen, K., Motte, J., Gershy-Damet, G-M., Peeters, M., Piot, P. & Van der Groen, G. : Molecular phylogeny of part of the env of HIV-1 strains isolated in Côte d'Ivoire. *AIDS* 1994b; 8:21-26.
  
- Janssens, W., Heyndrickx, L., Fransen, K., Temmerman, M., Leonaers, A., Ivens, T., Motte, J., Piot, P. & Van der Groen, G. : Genetic variability of the HIV type 1 in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994c; 10:1577-1579.
  
- Janssens, W., Heyndrickx, L., Fransen, K., Motte, J., Peeters, M., Nkengasong, JN., Ndumbe, PM., Delaporte, E., Perret, JL., Attende, C., Piot, P. & Van der Groen, G. : Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994d; 10:877-879.
  
- Janssens, W., Buvé, A. & Nkengasong, JN. : The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *AIDS* 1997; 11:705-712.
  
- Javaherian, K., Langlois, AJ., McDanal, C., Ross, KL., Eckler, LI., Jellis, CL., Profy, AT., Rusche, JR., Bolognesi, DP., Putney, SD. & Matthews, TJ. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency type 1 envelope protein. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6768-6772.

- Johnson, PR., Myers, G., Hirsch, VM. : Genetic diversity and phylogenetic of non-human primate lentiviruses. In AIDS Reserarch Reviews. Edited by Kolf, W., Wong-Staal, F., Kennedy, R. New York : Marcel Dekker, Inc 1991; 47-62.
  
- Kaleebu, P., Bobkov, A., Cheingsong-Popov, R., Bieniasz, P., Garaev, M. & Weber, J. : Identification of HIV-1 subtype G from Uganda. AIDS Res Hum Retroviruses 1995; 11:657-659.
  
- Kalyanaraman, VS., Sarngadharan, MG., Robert-Guroff, M., et al : A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218:571-573.
  
- Kaplan, AH., Manchester, M. & Swanstom D : The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and required for release to occur with maximum efficiency. J Virology 1994; 68:6782-6786.
  
- Karlsson, G., Gao, F., Robinson, J., Hahn, B. & Sodroski, J. : Increased envelope spike density and stability are not required for the neutralization resistance of primary human immunodeficiency viruses. J Virology 1996; 70:6136-6142.
  
- Kido, H., Kamoshita, K., Fukutomi, A. & Katunuma, N. : Processing protease for gp 160 human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor in human T4+ lymphocytes. J Biol Chem 1993; 268:13406-13413.
  
- Kimura, M.: A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotides sequences. J Mol Evol. 1980; 16:111-120 .



- Klasse, P.J. & Moore, J.P.: Quantitative model of antibody and soluble CD4-mediated neutralization of primary isolates and T-cell line adapted strains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virology* 1996; 70:3668-3677.
  
- Klatzman, D., Champagner, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C. & Montagnier, L. : T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; 312:767-768.
  
- Koot, M., van't Wout, A.B., Koestra, N.A., de Goede, R.E., Tersmette, M. & Schuitemaker, H. : Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1996; 173: 349-354.
  
- Korber, B., Hahn, B., Foley, B., Mellors, J.W., Leitner, T., Myers, G., McCutchan, F. & Kuiken, C.L. : Human retroviruses and AIDS : A Compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory 1998.
  
- Kostrikis, L.G., Cao, Y., Ngai, H., Moore, J.P. & Ho, D.D.: Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *J. Virology* 1996; 70:445-458.
  
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. & Hendrickson, W.A. : Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393: 648-659.

- Kuiken, CL., Zwart, G., Baan, E., Coutinho, RA., Van den Hoek, JAR. & Goudsmit, J. : Increasing antigenic and genetic diversity of the HIV-1 V3 domain in the course of the AIDS epidemic. *Proc Natl Sci USA* 1993; 90:9061-9065.
  
- Kuiken, CL.& Korber, BTM. : Epidemiological significance of intra- and inter-person variation of HIV-1. *AIDS* 1994; 8: S73-S83.
  
- Kuiken, CL., Lukashov, VV., Baan, E., Dekker, J., Leunissen, JAM. & Goudsmit, J.: Evidence for limited within-person evolution of the V3 domain of the HIV-1 envelope in Amsterdam population. *AIDS* 1996; 10:31-37.
  
- Laman, JD., Schellekens, MM., Abacioglu, YH., Lewis, GK., Tersmette, M., Fouchier, RAM., Langedijk, JPM., Classen, E. & Boersman, JA. : Variant-specific monoclonal and group-specific polyclonal human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies raised with synthetic peptides from the gp 120 third variable domain. *J Virology* 1992; 66:1823-1831.
  
- La Rosa, GJ., Davide, JP., Weinhold, K., Waterbury, JA., Profy, AT., Lewis, JA., Langlois, AJ., Dreesman, GR., Boswell, RN., Shaduck, P., Holley, LH., Karplus, M., Bolognesi, DP., Mathews, TJ., Emini, EA. & Putney, SD. : Conserved sequences and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 1990; 246: 932-935.
  
- Lee, TM.: Acquired immunodeficiency disease vaccines: design and development. *AIDS Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention* (De Vita VT Jr., Hellman S and Rosenberg SA, eds.), 4th Ed. Lippicott-Raven Publishers 1997; pp.605-616.
  
- Levy, JA., Hoffman, AD., Kramer, SM., Landis, JA., Shimabukuro, JM. & Oshiro, LS. : Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225: 840-842.

- Levy, JA. : Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Reviews* 1993; 57:183-289.
  
- Levy, DN., Rafaeli, Y. & Weiner, DB. : Extracellular Vpr protein increase cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. *J Virology* 1995; 69:1243-1252.
  
- Li, CJ., Friedman, DJ., Wang, C., Metelev, V. & Pardee, AB. : Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995; 268: 429-431.
  
- Libonatti, O., Avila, M., Zlatkes, R., et al : First report of HIV-2 infection in Argentina [letter]. *J AIDS Hum Retrovirology* 1998; 18: 190-191.
  
- Liitsola, K., Tashkinova, I., Laukkanen, T., Korovina, G., Smolskaja, T., Momot, O., Mashkilleysen, N., Chaplinskis, S., Brummer-Korvenkonita, H., Vanhatalo, J., Leinikki, P. & Salminen, MO.: HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS* 1998; 12(14): 1907-1919.
  
- Liu, H. et al : The vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virology* 1995; 69: 7630-7638.
  
- Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M. & Moser, B. : Cloning of human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 1994; 269:232-237.
  
- Loussert-Ajaka, I., Chaix, ML., Korber, B., Letourneur, F., Goms, E., Allen, E., Ly, TD., Brun-Vézinet, F., Simon, F. & Saragosti, S. : Variability of human immunodeficiency virus type 1 group 1 strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virology* 1995a; 69: 5640-5649.

- Loussert-Ajaka, I., Descamps, D., Simon, F., Brun-Vézinet, F., Ekwalanga, M. & Saragosti, S. Genetic diversity and HIV detection by polymerase chain reaction. *Lancet* 1995b; 346:912-913.
  
- Louwagie, J., McCutchan, F., Peeters, M., Brennan, T., Sanders-Buell, E., Eddy, G., van der Groen, G., Fransen, K., Gersh-Damet, GM., de Leys, R. & Beruke D. : Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993; 7:769-780.
  
- Louwagie, J., Delwart, EL., Mullins, JI., McCutchan, F., Eddy, G. & Burke, DS.: Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1994; 10(5):561-567.
  
- Louwagie, J., Janssens, W., Heyndricks, L., Hegerich, P., van der Groen, G., McCutchan, F. & Burke, D. : Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of Africa origins. *J Virology* 1995; 69:263-271.
  
- Lu, W. & Andrieu, JM.: Similar replication capacities of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates derived from a wide range of clinical sources. *J Virology* 1992; 66:334-340.
  
- Lukashov, VW., Kuiken, CL. & Goudsmit, J.: Intrahost human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to length of the immunocompetent period. *J Virology* 1995; 69:6911-6916.
  
- Lukashov, VV., Kuiken, CL., Boer, K. & Goudsmit, J.: HIV type 1 subtypes in The Netherlands circulating among woman originating from AIDS endemic regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:951-953.

- Lukashov, VV. & Goudsmit, J.: HIV heterogeneity and disease progression in AIDS : a model of continuous virus adaptation. *AIDS* 1998; 12:S43-S52.
  
- Lukashov, VV., Opde Coul, ELM., Coutinho, RA. & Goudsmit, J.: HIV-1 strains specific for Dutch injecting drug users in heterosexually infected individuals in the Netherlands. *AIDS* 1998;12:635-641.
  
- Mariani, R. & Skowronski, J. : CD4 down-regulation by nef alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1- infected individuals. *Pro Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5549-5553.
  
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., et al. : Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994; 265 :1587-1590.
  
- Masur, H., Michelis, M.A. & Greence, J.B. : An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *N Engl J Med* 1981; 305 :1431-1438.
  
- Matsushita, S., Robert-Guroff, M., Rusche, J., et al.: Characterization of a human immunodeficiency virus neutralizing monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope. *J Virology* 1988; 62:2107-2114.
  
- McCutchan, FE., Salminen, MO., Car, JK. & Burke, DS.: HIV-1 genetic diversity. *AIDS* 1996; 71: 6332-6338.
  
- McCutchan, FE., Carr, JK., Bajani, M., Sandres-Buell, E., Harry, T., Stoeckli, TC., Robbins, KE., Gashau, W., Nasidi, A., Janssens, W. & Kalish, ML. : Subtype G and multiple forms of A/G interspecific recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* 1999; no prelo.

- McKeating, JA., Gow, J., Goudsmit, J., Pearl, LH., Mulder, C. & Weiss, RA.: Characterization of HIV-1 escape mutants. *AIDS* 1989; 3:777-784.
- McLain, L., Porta, C., Lomonosoff, GP., Durrani, Z. & Dimmock, NJ.: Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies raised to a glycoprotein 41 peptide expressed on the surface of a plant virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:327-334.
- McNearney, T., Hornickova, Z., Markham, R., Birdwell, A., Arens, M., Saah, A. & Ratner, L. : Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:10247-10251.
- Meyerhans, A., Cheynier, R. & Albert, J. : Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 1989; 58:901-910.
- Miller, MD., Warmerdam, Gastom, I., Greene, WC. & Feinberg, MB. : The human immunodeficiency virus type 1 *nef* gene product : a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* 1994; 179:101-113.
- Milich, L., Margolin, BH. & Swanström, R. : V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein : Interpreting sequence variability. *J Virology* 1993; 67:5623-5634.
- Milich, L., Margolin, BH. & Swanstrm, R. : Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked charge in the CD4-binding domain of the HIV-1 *env* protein. *Virology* 1997; 239:108-118.
- Miranda-Silva, W., Galvão-Castro, B., Bonecini-Almeida, MG., Daniel-Ribeiro, CT., Sion, FS. & Moraes de Sá, CA. : Immunological Abnormalities of acquired immunodeficiency syndrome and related disorders in patients from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83(3):305-311.

- Mizuno, A., Ido, E., Goto, T., Kuwata, T., Nakai, M. & Hayami, M. : Mutational analysis of two zinc finger motifs in HIV type 1 nucleocapsid proteins : effect on proteolytic processing of Gag precursors and particle formation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 793-800.
  
- Moog, C., Fleury, HJA., Pellegrin, I., Kim, A. & Aubertin, AM.: Autologous and heterologous neutralizing antibody response following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virology* 1997; 71: 3734-3741.
  
- Moore, JP., McCutchan, FE., Poon, SW., Mascola, J., Liu, J., Cao, Y. & Ho, DD. : Exploration of antigenic variation in gp 120 from clades A through F of human immunodeficiency virus type 1 by using monoclonal antibodies. *J Virology* 1994; 68: 8350-8364.
  
- Moore, JP., Cao, Y., Leu, I., Korber, SB. and Ho, DD.: Neutralization of human immunodeficiency virus type 1: The genetic subtypes do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp 120 antigenic serotypes. *J Virology* 1995; 232:427-444.
  
- Morgado MG, Sabino EC, Sphaer EG. et al. : V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototypes and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:569-76.
  
- Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBG, et al. : High prevalence of B subtype and recent introduction of HIV-1 subtype D infection in Rio de Janeiro city, Brazil: no evidence of association between HIV-1 subtypes and exposure categories. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:488-94.

- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G. et al. : A Conserved neutralizing epitope on gp 41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virology* 1993; 67:67.
  
- Myers, G. : *Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences* Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics 1992.
  
- Myers, G. : *Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences* Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics 1995.
  
- Myers, G. : *Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences* Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics 1997.
  
- Nara, PL., Smit, L., Dunlop, N., Hatch, W., Merges, M., Waters, D., Melliher, J., Gallo, RC., Fischinger, PG. & Goudsmit, J. : Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1. *J Virology* 1996; 17(70): 4474-4483.
  
- Nasioulas, G., Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Theodoridu, M. & Hatzakis, A.: HIV-1 subtype G in Greece. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; no prelo.
  
- Nei, M. & Gojobori, T. : Simple Methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 1986; 3:418-426.
  
- N'Gbichi, JM., de Cock, KM., Batter, V., et al. : HIV status of female sex partners of men reactive to HIV-1, HIV-2 or both viruses in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS* 1995; 9:951-954.



- Nkengasong, JN., Peeters, M., Nys, P., Willems, B., Piot, P. & van der Groen, G.: Infections virus titers, replicative, and syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virology* 1994.
  
- Nkengasong, JN., Maurice, C., Koblavi, S. et al : Field evaluation of a combination of monospecific enzyme-linked immunosorbent assays for type-specific diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 infections in HIV-seropositive persons in Abidjan, Ivory Coast. *J. Clin. Microbiol* 1998; 36:123-127.
  
- Nowak, M. : HIV mutation rate. *Nature* 1990; 347:522.
  
- Nyambi, PN., Nkengasong, J., Lewi, P., et al.: Multivariate analysis of of human immunodeficiency virus type 1 neutralization data. *J Virology* 1996; 70:6235-6243.
  
- Nyambi, P., Lewi, P., Peeters, M., et al.: Study of the dynamics of neutralization escape mutants in a chimpanzee naturally infected with the simian immunodeficiency virus SIVcpz-ant. *J Virology* 1997; 71:2320-2330.
  
- Nyambi, PN., Beirnaert, E., Dayaraj, C., Nkengasong, J., Zolla-Pazner, S. & van der Groen, G.: Study of the phenotype of primary HIV-1 isolates and their susceptibility to neutralization by polyclonal sera. Abstract n° 11211, 12th World AIDS Conference, Geneva, june 28-july 3, 1998.
  
- Nyambi, PN., Heyndrickx, L., Janssens, W., et al.: Identification of specific amino acid motifs and biophenotypic properties among primary HIV-1 group M (subtype A-H) and O isolates belonging to neutralization clusters. *J Virology* 1998; in press.
  
- Olmsted, RA., Hirsch, VW., Purcell, RH. & Johnson, PR. : Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus : genome organization in relationship to other lentiviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8088-8092.

- Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W. & Sodroski, J. : Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp 120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virology* 1990; 64: 5701-5707.
  
- Pau , CP., Lee-Thomas, S., Auwainit W. & Al. E.: Highly specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS* 1993; 7:337-340.
  
- Peeters M., Honore, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, RW. & Delaporte, E.: Isolation and partial characterization of a HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 1989; 3:625-630.
  
- Peeters, M., Fransen, K., Delaporte, E., Van den Haesevelde, M., Gershy-Damet, GM., Kestens, L., van der Groen, G. & Piot, P. : Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate CPZant) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* 1992; 6:447-451.
  
- Peeters, M., Gueye, A., M'Boup, S. et al. : Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 1997; 11:493-498.
  
- Peeters, M., Liegeois, F., Torimiro, N., Bourgeois, <sup>a</sup>, Mpodì, E., Vergne, L., Saman, E., Delaporte, E. & Saragosti, S. : Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol* 1999; 73 (9):7368-75.
  
- Peterlin, M. : Molecular biology of HIV, pp 185-238. In : *The retroviridae*, vol. 4. Ed. Levy, J.A., Plenum Press, New York 1995.
  
- Pfütznér, A., Dietrich, U., von Eichel, U., et al. : HIV-1 and HIV-2 infections in a high-risk population in Bombay, India: evidence for the spread of HIV-2 and presence of a divergent HIV-1 subtype. *J Acquired Immune Deficiency Syndrom* 1992; 5 :972-977.

- Pianiazek, D., Peralta, JM., Ferreira, JAS., et al : Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infection in Brazil by polymerase chain reaction. *AIDS* 1991; 5 :1293-1299.
  
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, AF., et al. : Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77 : 7415-7418.
  
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read,E. & Gallo, R.C. : Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 224:497-500.
  
- Potts KE, Kalish ML, Lott T., Orloff, G., Luo, C-C., Bernard, MA., Brites Alves, C., Badaro, R., Suleiman, J., Ferreira, O., Schochetman, G., Johnson, WD Jr., Ou, C-Y., Ho, JL. & the Brazilian AIDS Research Group : Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 1993; 7:1191-97.
  
- Profy, AT., Salinas, PA., Eckler, LI., Dunlop, NM., Nara, PL. & Putney, SD. : Epitopes recognized by the neutralizing antibodies of a HIV-1-infected individual. *J Immunol* 1990; 144:4641-4647.
  
- Ramos, A., Tanuri, A., Schechter, M., Rayfield, MA., Hu, DJ., Cabral, C., Bandea, CI., Baggs, J. & Pianiazek, D. : Dual and recombinant infections: An integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. *Emerg Infect Diseases* 1999; 5:65-74.
  
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, KJ., Starchich, B., Josephs, SF., Doran, ER., Rafalski, A., Whitehorn, EA., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, Jr., Pearson, ML., Lautenberger, JA., Papas, TS., Ghayeb, J., Chang, NT., Gallo, RC.& Wong-Staal, F. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985; 313: 227-284.

- Rayfield, MA., Sullivan, P., Bandea, CI., & Britvan, L. : HIV-1 group O indentified for the first time in the United States. *MMWR* 1996; 45: 561-564.
  
- Reimann, K., Li, JT., Voss, G., Lekutis, C., Jenner-Racs, K., et al: An *env* gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high *in vivo* replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J Virology* 1996; 70:3198-3209.
  
- Richman, DD. & Bozzete, SA : The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994; 169: 968-974.
  
- Roberts, DL., Bebenek, K. & Kunkel, TA.: The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988; 242:1171-1173.
  
- Robertson, DL., Hahn, BH. & Sharp, PM. : Recombination in AIDS viruses. *J Mol Evol* 1995 a, 40: 249-259.
  
- Robertson, DL., Sharp, PM., McCutchan, FE. & Hahn, BH. : Recombination in HIV-1. *Nature* 1995b: 374:124-126.
  
- Rodrigues, LG. & Chequer, P. :AIDS in Brazil, 1982-1988. *Bull Pan Am Heath Organ* 1989;23(1-2):30-4.
  
- Romieu, I., Marlink, R., Kanki, P., M'Boup, S. & Essex, M. : HIV-2 link to AIDS in West Africa. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndromes* 1990 ; 3 :220-230.
  
- Rothe, M., Israel, N., Barré-Sinossi, F. Mécanismes de la réplication virale des VIH. *Medicine Therapeut* 1996; 2 :12-18.
  
- Rübsamen-Waigmann, H., von Briesen, HV., Manjar, JK, Rao, PK., Schoz, C.& Pfützner, A. : Spread of HIV-2 in India [letter]. *Lancet* 1991; 337:550-551.

- RübSamen-Waigmann, H., von Briesen, H., Holmes, H. et al : Standard conditions of virus isolation reveal biological variability of HIV type 1 in different regions of the world. *AIDS Res. Hum Retroviruses* 1994; 11: 1401-1408.
  
- Rusche, JR., Javaherian, K., McDanal, C., et al.: Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24 amino acid sequence of the viral envelope, gp 120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3198-3202.
  
- Rutherford, G.W., Lifson, A.R., Hessel, N.A., et al. : Course of HIV infection in a cohort of homosexual and bisexual men : an 11 year follow-up study. *Brazilian Med J* 1990; 301: 118-28.
  
- Sabino EC, Sphaer EG, Morgado MG, et al. Identification of HIV-1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically-linked individuals from Brazil. *J Virology* 1994; 68:6340-46.
  
- Salminen, MO., Carr, JK., Burke, DS. & McCutchan, FE.: Genotyping of HIV-1. In: *Human Retroviruses and AIDS 1995* (Edited by Myers G). Los Almos 1995.
  
- Sanchez-Pescador, R., Power, MD. & Barr, PJ. : Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* 1985; 227:484-492.
  
- Sattentau, QG. & Moore, JP. : Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* 1991; 174:407-415.
  
- Seillier-Moiseiwitsch, F., Margolin, BH. & Swanstrom, R. : Genetic variability of the human immunodeficiency virus : Statistical and biological issues. *Annu Ver Genet* 1994; 28:559-596.

- Schubert, U. & Strebel, K. : Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J Virology* 1994; 68:2260-2271.
- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, L., et al.: Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell tropic virus populations. *J Virology* 1992; 66:1354-1360.
- Science & Vie, hors serie: Dossier SIDA. Benelux Publications 1994 ; n°137, Paris, France.
- Sharp, P.M., Robertson, D.L., Gao, F. & Hahn, B. : Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. *AIDS* 1994; 8:S27-S42.
- Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin, MC., Saragosti, S., Georges-Coubort, MC., Barré-Sinoussi, F. & Brun-Vezinet, F. : Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine* 1998; 4(9):1032-37.
- Simmonds, G., Wilkinson, D., Reeves, JD., Dittmar, MT., Beddows, S., Weber, J., Carnegie, G., Desselberger, U., Gray, PW., Weiss, RA. & Clapman, PR. : Primary syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 are dual tropic and most can use either Lestr or CCR5 as co-receptors for virus. *J Virology* 1996 ; 70:8355-8360.
- Smith, MW., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, GA., Lomb, DA., Goedert, JJ., O'Brien, TR., Jacobson, LP., Kaslow, R., Buchbinder, S., Viiyinhoff, E., Vlahov, D., Hoots, K., Hilgartner, MW. & O'Brien, SJ. : Constrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 1997 ; 277 :959-964.

- Soriano, V., Gutierrez, M., Garcia-Lerma, G., Aguilera, O., Mas, A., Bravo, R., Pérez-Labad, M., Baquero, M. & Gonzales-Lahoz, J. : First case of group O in Spain. *Vox Sang* 1996; 71:66.
  
- Spina, CA., Kwok, TJ., Chow, MY., Guatelli, JC. & Richmann, DD. : The importance of nef in induction of immunodeficiency virus type 1 replication for primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179:115-123.
  
- Stahl, R.E., Friedman-Kien, A., Dubin, R., Marmor, M. & Zolla-Prazner, S. Immunologic Abnormalities in Homosexual Men. *Am. J* 1982; 73 :171-178.
  
- Stamatatos, L. & Cheng-Meyer, C. : Evidence that structural conformation of envelope gp 120 affects immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range and syncytium-forming ability. *J Virology* 1993; 67:5635-5639.
  
- Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T. and Martin, MA. : The HIV (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 1987; 328:728-730.
  
- Sullivan, N., Thali, M., Furman, C., Ho, DD. & Sodroski, J. : Effect of amino acid changes in the V1/V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation, and recognition by a neutralizing antibody. *J Virology* 1993; 67:3674-3679.
  
- Sullivan, MT., Guido, EA., Metler, RP., et al : Identification and characterization of an HIV-2 antibody-positive blood donor in the United States. *Transfusion* 1998; 38 :189-193.
  
- Tanuri, A., Swanson, P., Devare, S., Berro, OJ., Savedra, A., Costa, LJ., Telles, JG., Brindeiro, R., Schable, C., Pieniazek, D. & Rayfield, M. : HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J AIDS Hum Retrovirol* 1999; 20:60-66.

- Takahashi, H., Merli, S., Putney, SD., Houghten, R., Moss, B., Germain, RN. & Berzofsky, JA. : A single amino acid interchange yields reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp160. *Science* 1989; 246:118-121.
  
- Takahashi, H., Germain, RN., Moss, B., & Berzofsky, JA. : Na immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II-restrict help for itself. *J Exp Med* 1990; 171:571-576.
  
- Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Mboudjeka, I., Moriyama, H., Miura, T., Tamashita, M., Gurtler, LG., Hayami, M. & Kaptue, L. : Various types of HIV mixed infections in Cameroon. *Virology* 1998; 245(1):1-10.
  
- Takeuchi, Y., Akutsu, M., Murayama, K., Shimizu, N. & Hoshino, H.: Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at neutralization epitope in env gene. *Virology* 1991; 65:1710-1718.
  
- Tersmette, M., Lange, JMA., De Goede, R., et al.: Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989a; i:983-985.
  
- Tersmette, M., Gruters, RA., De Wolf, F., et al.: Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virology* 1989b; 63:2118-2125.
  
- Thompson J, Higgins D, and Gibson, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. *Nucleic Acid Res* 1994; 22:4673-80.



- Tiganos, E., Yao, X.J., Daniel, N. & Cohen, E.A. : Putative alfa-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *J Virology* 1997 ; 71 : 4452-4460.
  
- Triques, K., Borgeois, A., Saragosti, S., Vidal, N., Mpoudi-Ngole, E., Nzilambi, N., Apetrei, C., Ekwalanga, M., Delaporte, E. & Peeters, M. : High diversity of HIV-1 subtype strains in Central Africa. *Virology* 1999; 259:99-109.
  
- Tremblay, M. & Wainberg, MA.: Neutralization of multiples HIV-1 isolates from a single subject by autologous sequential sera. *J Infect Dis* 1990; 162:735-737.
  
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, JM., Olson, WC., Allaway, GP., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, PJ. & Moore, JP. : CD4-dependent antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384:184-187.
  
- UNAIDS & WHO : Report on the global HIV/AIDS epidemic. Geneva : UNAIDS & WHO, september 1997.
  
- UNAIDS & WHO : Report on the global HIV/AIDS epidemic. Geneva : UNAIDS & WHO, november 1999.
  
- Vancott, TC., Polonis, VR., Loomis, LD., Michael, NL., Nara, PL. & Birx, DL. : Differential role of V3-specific antibodies in neutralization assays involving primary and laboratory-adapted isolates of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:1379-1391.
  
- Vaishnav, Y. & Wong-Staal, F. : The biochemistry of AIDS. *Biochem*, 1992; 60 : 578-630.

- Van der Groen, G., Phillipe, N., Nyambi, L., Beirnaert, ELS., Davis, D., Fransen, K., Heyndrickx, L., Ondo, P., van der Auwera, G. & Janssens, W. : Genetic variation of HIV type 1 : Relevance of interclade variation to vaccine development. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14(3):120-128.
  
- Van den Haesevelde, MM. et al. : Sequence analysis of a highly divergent HIV-1 related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology* 1996 ; 221 :346-350.
  
- Vellarde-Dunois, KG., Guimarães, ML., Lafuente, C., Andrade, R., Arévalo, R., Pantoja, S., Mariscal, S., Sandoval, R., Iriate, F., Angles, R., Chamón, V., Carvajal, R. & Morgado, MG. : Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals from Bolivia reveals presence of two distinct genetic subtypes. *Segundo Simpósio Brasileiro de Pesquisa Básica em HIV/AIDS 1997*. Abstract nº 44, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil.
  
- Veronesi, R., Mazza, CC., Santos-Ferreira, MO. & Lourenç, MH.: HIV-2 in Brazil. *The Lancet* 1987; ii: 402.
  
- Verrier, F., Borman, A., Brand, D. & Gurrard, M. : Role of the HIV type 1 glycoprotein 120 V3 loop in determining coreceptor usage. *AIDS Res Human Retroviruses* 1999; 15(8) :731-743.
  
- Vogel, T., Kurth, R. & Norley, S. : The majority of neutralizing abs in HIV-1 infected patients recognize linear V3 loop sequences. Studies using HIV<sub>MN</sub> multiple antigenic peptides. *J Immunol* 1994; 153:1895-1904.
  
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, P., & Alizon, M. : Nucleotide sequence of AIDS virus, LAV. *Cell* 1985; 40 :9.

- Weber, J., Fenyö, EM., Beddows, S., Kaleebu, P., Björnsdal, A. & the WHO Network for HIV-1 isolation and characterization: Neutralization serotypes of HIV-1 field isolates are not predictive by genetic subtypes. *J Virology* 1997; 70:7827-7832.
  
- Weiss, RA.: Cellular receptor and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. In: Levy, JA., ed. *The Retroviridae*, vol. 2, New York, Plenum 1993; 1-108.
  
- Wei, X., Ghosh, SK., Taylor, ME., et al : Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373:117-122.
  
- Willey, R.L., Rutledge, R.A., Dias, S., Folkst, T., Buckler, CE. & Martin, MA. : Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of acquired immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5038-5043.
  
- WHO Network for HIV isolation and characterization: HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of representative viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:1927-43.
  
- Wu, L., Gerard, NP., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, AA., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. & Sodroski J. : CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384:179-183.
  
- Wyatt, R., Sullivan, N., Thali, M., Repke., Ho, D.& Robinson, J. : Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletion of the major variable regions. *J Virology* 1993; 67 : 4557-4565.

- Wyatt, R., Moore, J., Accola, M., Desjardins, E., Robinson, J. & Sodroski, JG. : Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp 120 epitopes induced by receptor binding. *J Virology* 1995; 69:5723-5733.
  
- Wyatt, R., Kwong, PD., Desjardins, E., Sweet, RW., Robinson, J., Hendrickson, WA. & Sodroski, JG. : The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998; 393:705-711.
  
- WHO Guideline for HIV-1 Isolation and Characterization. Geneva 1994.
  
- Yoshida, K., Nakamura, M., Ohno. : Mutations of the HIV type 1 V3 loop under selection pressure with neutralizing monoclonal antibody NM-01. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:1283-1290.
  
- Yoshimura, K., Matsushita, S., Hayashi, A. & Takatsuki, K. : Relationship of HIV-1 envelope V2 and V3 sequences of primary isolates to the viral phenotype. *Microbiol Immunol* 1996; 40:277-287.
  
- Zhang, J., Mackenzie, LQ., Cleland, A., Holms, EC., Leigh Brown, AJ. & Simmonds, P. : Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virology* 1993; 67 :3345-3356.
  
- Zhang, L., Huang, Y., Ho, T., Cao, Y. and Ho, DD.: HIV-1 subtype and second-receptor use {letter}. *Nature* 1996; 381:661-666.
  
- Zhang, Y., Fracasso, C., Fiore, JR., Björndal, A., Angarano, G., Gringeri, A. and Fenyö, EM.: Augmented serum neutralizing activity against primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in two group of HIV-1 infected long-term nonprogressors. *J Infect Dis* 1997; 176:1180-1187.

- Zhu, T., Wang, N., Carr, A et al.: Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virology* 1996; 70:3098-3107.
  
- Zhu, T., Korber, BT., Nahmias, AJ., Hooper, E., Sharp, PM., & Ho, DD. : An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; 391:594-597.
  
- Zolla-Pazner, S., O'Leary, J., Burda, S., Gorny, MK., Kim, M., Mascola, J. and McCutchan, F.: Serotyping of human immunodeficiency virus type 1 from diverse geographic locations by flow cytometry. *J Virology* 1995; 69:3807-3815.
  
- Zwart, G., Wolfs, TFW., Valk, M., Van Der Hoek, L., Kiuken, CL., Goudsmit, J. : Characterization of the specificity of the human antibody response to the V3 neutralization domain of HIV-1. *AIDS Res Hum Retrovir* 1992; 8 : 1897-1908.

**TRABALHOS RELACIONADOS**

- Ivo-dos-Santos, J.; Couto-Fernandez, J.C. and Galvão-Castro, B. SPECIFICITY OF ANTIGEN CAPTURE ASSAYS. *AIDS*, 3(8): 545, 1989.
  
- Ivo-dos-Santos, J.; Campos, D.L.; Couto-Fernandez, J.C.; Passo, R.M.; Carneiro, L.A.; Castilho, E.A. and Galvão-Castro, B. EVALUATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT AND ALTERNATIVE ASSAYS FOR DETECTION OF HIV ANTIBODIES USING PANELS OF BRAZILIAN SERA. *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo*, 32(2): 96-100, 1990.
  
- Ivo-dos-Santos, J.; Couto-Fernandez, J.C.; Santana, A.J.; Luna, T.S.; Cunha-Moreira, L.; Lemos, A.C.; Dutra, M.; Miranda, C. and Galvão-Castro, B. PREVALENCE OF HIV-1 ANTIBODIES IN SELECTED GROUPS OF BRAZILIAN CITY WITH AFRICAN SOCIO-DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndromes*, 4(4): 448-449, 1991.
  
- Couto-Fernandez, J.C.; Morgado, M.G.; Dos-Santos, J.I. and Galvão-Castro, B. BIOLOGICAL AND MOLECULAR DIVERSITY OF HIV-1 IN BRAZIL. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 249-255, 1992.
  
- Loussert-Ajaka, I.; Simon, F.; Farfara, I.; Houhou, N.; Couto-Fernandez, J.C.; Dazza, M.C.; Brun-Vézinet, F. COMPARATIVE STUDY OF SINGLE AND NESTED PCR FOR DETECTION OF PROVIRAL HIV-2 DNA. *Research Virology* 145(5):337-342, 1994.
  
- dos Santos, J.I., Lopes, M.A., Deliege-Vasconcelos, E., Couto-Fernandez, J.C., Patel, B.N., Barreto, M.L., Ferreira Júnior, O.C. & Galvão-Castro, B.: SEROPREVALENCE OF HIV, HTLV-I/II AND OTHER PERINATALLY-TRANSMITTED PATHOGENS IN SALVADOR, BAHIA. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37(4):343-8.

- Brites. C.; Pedroso, C.; Netto, E.; Harrington Jr., W.; Galvão-Castro, B.; Couto-Fernandez, J.C.; Pedral-Sampaio, D.; Morgado, M.G.; Teixeira, R. & Badaró, R. CO-INFECTION BY HTLV-I/II IS ASSOCIATED WITH INCREASED VIRAL LOAD IN PBMC OF HIV-1 INFECTED PATIENTS IN BAHIA, BRAZIL. *The Brazilian Journal of Infection Diseases* 2(2):70-77, 1998.