

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

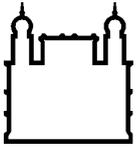
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE ISOLADOS DO
SUBTIPO C DO HIV-1 CIRCULANTES NO BRASIL**

JOANA PAIXÃO MONTEIRO

Rio de Janeiro

2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOANA PAIXÃO MONTEIRO

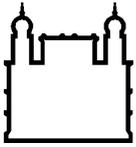
Caracterização Molecular e Biológica de Isolados do Subtipo C do HIV-1 Circulantes no Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: JOANA PAIXÃO MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE ISOLADOS DO
SUBTIPO C DO HIV-1 CIRCULANTES NO BRASIL**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Aprovada em: 30/03/2006

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Mariza Gonçalves Morgado – Presidente_____

Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente_____

Prof. Dr. Luiz Carlos Jr. Alcântara_____

Rio de Janeiro, 30 de março de 2006

Aos meus pais, Izabel Maria e José Maurício por todo amor, dedicação e incentivo, pelo exemplo de caráter, dignidade e luta: vocês são o alicerce da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo Geraldo Argôlo Ferraro pela orientação, por todos os ensinamentos nessa primeira etapa de minha vida profissional, pelo incentivo e principalmente pela sua amizade.

Ao Dr. Bernardo Galvão pela orientação neste trabalho de tão grande importância para minha carreira científica, pela confiança depositada e acima de tudo pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório Avançado de Saúde Pública.

Ao Dr. Dumith Chequer Bou-Habib pela forma tão acolhedora e carinhosa como me recebeu no Laboratório de Imunologia Clínica/IOC/FIOCRUZ no Rio de Janeiro, pela disposição constante e pela orientação tão dedicada.

À Dra. Simone Kashima e à Roberta Carreto pela colaboração no sequenciamento das amostras.

À Dra. Monique Guimarães pelo auxílio indispensável no sequenciamento das amostras.

Ao Dr. Túlio de Oliveira por sua preciosa ajuda nas análises filogenéticas e pela prestatividade.

Ao Dr. Luis Carlos Alcântara pela oportunidade de ter desenvolvido grande parte deste trabalho no Laboratório de Bioinformática e pelo apoio e incentivo constantes.

À Dra. Mariza Morgado pela revisão e sugestões e pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/IOC/FIOCRUZ.

Ao Victor Pedreira Cunha por todos os momentos de compreensão, carinho e paciência e por estar sempre ao meu lado torcendo e me apoiando.

Ao meu irmão Felipe Paixão Monteiro pela sua amizade em todos os momentos da minha vida.

Aos tios Tereza e Pedro Carsalade por todo o amor e carinho recebidos durante minha inesquecível estadia na “Cidade Maravilhosa”.

Aos amigos Maria Inês e Eduardo Martins, meu tios “emprestados” que estarão para sempre no meu coração. Obrigada por tudo.

Aos colegas do LASP pelos bons momentos de convivência e de aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Clínica, que fizeram desta minha passagem uma inesquecível e agradável lembrança.

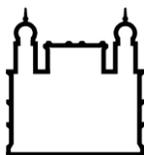
À Eugênia Góes, Elizabeth Vasconcelos, Rodrigo Gaspar e Cláudio Paulo pelo apoio e atenção.

À Rosália Oliveira da Silva e à Lana Abreu pela solicitude e prestatividade.

À Cleide de Souza e à Eliete Teixeira Perez por todo o apoio e solicitude ao longo destes dois anos.

Ao Dr. Lain Pontes e ao Dr. Mitermayer Reis pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

Ao Hemocentro da Bahia (HEMOBA) pela doação das bolsas de sangue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

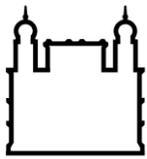
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE ISOLADOS DO SUBTIPO C DO HIV-1 CIRCULANTES NO BRASIL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joana Paixão Monteiro

A grande variabilidade genética do HIV-1 se reflete na emergência de partículas virais com características antigênicas e comportamentos biológicos variados, que se constituem como os principais obstáculos para o controle da infecção pelo sistema imune do hospedeiro e para o desenvolvimento de terapias e vacinas. Entre as diversas formas genéticas de HIV, o subtipo C é atualmente a mais disseminada mundialmente, contribuindo com cerca de 56% de todas as infecções, o que sugere que este subtipo pode apresentar características peculiares quanto à capacidade de transmissão. O subtipo C é responsável por cerca de 50% das infecções recentes no sul do Brasil, entretanto, a caracterização dos subtipos não-B no país é ainda muito limitada. O presente estudo teve como objetivo a caracterização biológica e molecular de cepas do subtipo C circulantes no sul do Brasil. Para tanto, 22 amostras de sangue de indivíduos infectados pelo HIV-1 da cidade de Porto Alegre foram processadas. Isolados virais foram obtidos através do co-cultivo com PBMCs de doadores normais. O subtipo foi determinado através do sequenciamento dos genes *gag* e *env*. Estas seqüências foram comparadas com seqüências de diferentes origens dos subtipos B, C e F através de métodos filogenéticos. Propriedades fenotípicas de cinco isolados do subtipo C e de dois recombinantes C/B foram investigadas. Para investigar a capacidade de infectar macrófagos e de formar sincícios em células de linhagem T CD4+, estas células foram expostas aos sobrenadantes positivos para HIV-1. Para avaliar o uso preferencial do receptor de quimiocina, células U87 foram expostas aos sobrenadantes infecciosos. Entre as 22 amostras, 8 foram classificadas como subtipo B (36,4%), 6 foram classificadas como subtipo C (27,3%), 1 foi classificada como subtipo F (4,5%), 6 foram classificadas como subtipo C em *gag* e como subtipo B em *env* (27,3%) e 1 foi classificada como subtipo B em *gag* e como subtipo F em *env*. As seqüências do subtipo C formaram um único grupo monofilético e apresentaram 6 e 18 assinaturas de aminoácidos características em *gag* e em *env*, respectivamente. Três padrões distintos de recombinação entre os subtipos B e C foram observados. Todos os 7 isolados virais testados foram capazes de se replicar em macrófagos. Dos cinco isolados do subtipo C, 4 utilizaram exclusivamente o correceptor CCR5 e foram não-indutores de sincícios, enquanto 1 isolado deste subtipo foi capaz de utilizar alternativamente o receptor CXCR4 e de induzir sincícios em células de linhagem. Os isolados recombinantes C/B foram capazes de utilizar ambos os receptores e de induzir sincícios. A região V3 das seqüências do subtipo C foi cerca de 3 vezes mais conservada do que a das seqüências do subtipo B. Os resultados sugerem que os vírus do subtipo C circulantes no Brasil são resultantes de uma introdução única e recente no país e que eventos locais de recombinação entre os subtipos B e C estão ocorrendo em elevadas taxas há mais de 10 anos. O estudo de caracterização biológica confirma a hipótese de que o subtipo C é distinto dos demais quanto à evolução da utilização do correceptor.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

GENETIC AND BIOLOGIC CHARACTERIZATION OF HIV-1 SUBTYPE C ISOLATES FROM BRAZIL

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joana Paixão Monteiro

The high level of genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is responsible for the emergence of viral strains with different biological properties. Such feature has been a major obstacle in the development of a globally useful vaccine for AIDS and treatment strategies. Among the genetic forms of HIV-1, the subtype C is the most prevalent, accounting for 56% of infections worldwide. This figure suggests that this subtype may present particular features in its spreading ability. The subtype C is responsible for nearly 40% of new infections in the South of Brazil, however, the characterization of non-B subtypes in the country is very limited. Thus, we aimed to investigate the genetic and biological diversity of HIV-1 subtype C strains circulating in Brazil. On this purpose, 22 blood samples from HIV-1-infected individuals from Porto Alegre were processed. Viral isolates were obtained using the co-culture method, as recommended by World Health Organization. The subtype was determined by sequencing *gag* and *env* genes. The sequences were compared with others subtypes B, C and F strains from different countries using phylogenetic methods. Phenotypic characteristics of five subtype C isolates and two C/B recombinants were investigated. To evaluate the virus ability to infect macrophages and to form syncytium in CD4+ T cell lines, these cells were exposed to HIV-1 positive supernatants. To investigate the coreceptor usage, U87 cells were exposed to infectious supernatants. Out of 22 samples, we observed six subtype C (27.3%), eight subtype B (36.4%), one subtype F (4.5%), six C/B recombinant (27.3%) and one B/F recombinant (4.5%) samples. Subtype C sequences from Brazil formed a unique phylogenetic group and presented 6 and 18 specific amino acid signatures in *gag* and *env*, respectively. Three distinct patterns of C/B recombinants were observed. All tested isolates were able to replicate in macrophages. Among 5 subtype C isolates, 4 used only CCR5 as coreceptor and were non-syncytium-inducing viruses, while the other subtype C isolate was also able to use the CXCR4 receptor and to induce syncytium. The C/B recombinants used both coreceptors and were syncytium-inducing viruses. The V3 region of subtype C sequences was 3 times more conserved than the V3 region of subtype B sequences. These findings suggest that subtype C viruses circulating in Brazil are the result of a unique and recent introduction into the country. Recombination events between subtypes B and C are occurring in elevated rates for more than 10 years in the South region of Brazil. Biological characterization confirms the hypothesis that subtype C is distinct from the others in the evolution of coreceptor utilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.3.1: Desenho esquemático da estrutura morfológica do HIV-1.	5
Figura 1.3.2: Organização do genoma do HIV-1.	6
Figura 1.3.3: Representação esquemática da gp120 do HIV-1.	8
Figura 1.5.1: História natural da infecção pelo HIV-1.	12
Figura 1.6.1: História evolutiva dos lentivírus de primatas.	15
Figura 1.7.1: Distribuição mundial dos diferentes genótipos de HIV-1.	17
Figura 3.8.1: Esquema dos fragmentos dos genes <i>gag</i> e <i>env</i> amplificados na PCR.....	34
Figura 4.2.1: Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação filogenética das seqüências de <i>env</i> das amostras com seqüências de referência de todos os subtipos e CRFs 01, 02, 06 e 11.	42
Figura 4.2.2: Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação filogenética das seqüências de <i>gag</i> das amostras com seqüências de referência de todos os subtipos e CRFs 01, 02, 06 e 11.	43
Figura 4.2.3: Gráficos gerados através do método “Bootscreening” implementado no programa Simplot (Salminen et al., 1995) com base nos 1000 pb formados pela união das seqüências <i>gag</i> e <i>env</i> das amostras que agruparam com subtipos divergentes nas árvores filogenéticas.	45
Figura 4.3.1: Análise filogenética Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação dos vírus do Brasil do subtipo C do HIV-1 com isolados do subtipo C de diferentes regiões geográficas com base nas seqüências do envelope.....	48
Figura 4.3.2: Análise filogenética Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação dos vírus do Brasil do subtipo C do HIV-1 com isolados do subtipo C de diferentes regiões geográficas com base nas seqüências de <i>gag</i>	49
Figura 4.5.1: Alinhamento das seqüências consenso de aminoácidos do subtipo C de diferentes países comparadas com a seqüência consenso mundial deste subtipo.....	53

Figura 4.6.1: Árvore filogenética Neighbor-Joining (NJ) construída com base na junção dos fragmentos de <i>gag</i> e <i>env</i> mostrando as relações filogenéticas dos vírus recombinantes C/B do Brasil com seqüências de todos os subtipos e principais formas recombinantes do grupo M.	56
Figura 4.6.2: Gráficos gerados através do método “Bootscanning”, implementado no programa Simplot (Salminen et al., 1995), com base método nos 1000 pb formados pela união das seqüências <i>gag</i> e <i>env</i> dos recombinantes C/B e das amostras de referência de todos os subtipos.....	57
Figura 4.6.3: Alinhamento das seqüências <i>env</i> (a) e <i>gag</i> (b) dos vírus recombinantes com a seqüência consenso mundial dos subtipos B e C respectivamente	67
Figura 4.8.1: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da alça V3 dos 7 isolados virais caracterizados.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.1: Dados clínicos e epidemiológicos dos 22 pacientes infectados pelo HIV-1	40
Tabela 4.2.1: Classificação dos subtipos de HIV-1 com base nas regiões genômicas <i>gag</i> e <i>env</i>	44
Tabela 4.4.1: Diversidade genética das seqüências do subtipo C do HIV-1 de diferentes regiões geográficas e das seqüências do Brasil do subtipo B.....	50
Tabela 4.7.1: Caracterização molecular e biológica de isolados de HIV-1 circulantes no Brasil	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Ag	Antígeno
AZT	Azidotimidina
C1	Primeira região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C2	Segunda região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C3	Terceira região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C4	Quarta região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C5	Quinta região constante da gp120 do envelope do HIV-1
CA	proteína do capsídeo
CCR2b	Receptor para β quimiocinas
CCR3	Receptor para β quimiocinas
CCR5	Receptor para β quimiocinas
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono (Gás carbônico)
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
CRF	Forma recombinante circulante
CXCR4	Receptor para α quimiocinas
D	Aspartato
ddNTP	Dideoxynucleosídeos-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxynucleosídeo-trifosfato
DT	Isolado duplo trópico
E	Glutamato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<i>env</i>	Gene do envelope do HIV
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FITC	Fluoresceína isoticianato
G	Glicina
<i>gag</i>	Gene do grupo antígeno do HIV
gp120	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 120 kD

gp160	Glicoproteína precursora do envelope do HIV-1 com massa molecular de 160 kD
gp41	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 41 kD
HEMOBA	Hemocentro da Bahia
HEPES	Ácido (N[2-hidroxifenil]piperazina-N-[2-etanosulfônico])
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (“Human Leukocyte Antigen”)
HTLV-1	Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I
HTLV-II	Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo II
(I)	Proporção de sítios invariáveis
IL-2	Interleucina 2
IN	Integrase
IS	Indutor de sincício
K	Lisina
kb	Kilobase
kd	Kilodalton
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus
LTR	Longas regiões terminais repetidas
µg	Micrograma
µl	Microlitro
MA	Proteína da matriz viral
min	Minuto
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1 β
ml	Mililitro
ML	Maximum Likelihood
mM	Milimolar
NC	proteína do nucleocapsídeo
Nef	Negative Factor
ng	Nanograma

NJ	Neighbor-Joining
NIS	Não indutor de sincício
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Prolina
p17	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 17 kd
p24	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 24 kd
p7	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 7 kd
pb	Pares de base
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial de hidrogênio
PHA	Fitohemaglutinina
pmol	Picomol
PR	Protease
<i>pol</i>	Gene da polimerase do HIV
Q	Glutamina
R	Arginina
R5	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CCR5
R5X4	Isolado de HIV-1 capaz de utilizar ambos os receptores CCR5 e CXCR4
RANTES	Regulated upon activation normal T-expressed and secreted
Rev	Anti-repression transactivator protein
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
S	Serina
SDF-1 α	Stromal cell-Derived Factor -1 α
seg	Segundo
SFB	Soro Fetal Bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SU	Glicoproteína da superfície do envelope viral
TAE	Tampão acetato EDTA
Taq	Enzima DNA polimerase extraída do termófilo <i>Thermus aquaticus</i>

Tat	Trans-acting transcription transactivator
TL	Trópico para células T ou linfocitotrópico
TM	Trópico para macrófagos ou monocitotrópico
TM	Glicoproteína transmembranar do envelope viral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TR	Transcriptase reversa
U	Unidades Internacionais
V1	Primeira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V2	Segunda região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V3	Terceira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V4	Quarta região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V5	Quinta região variável da gp120 do envelope do HIV-1
VDRL	Venereal Diseases Research Laboratory
Vif	Virion Infectivity Factor
Vpr	Viral Protein R
Vpu	Viral Protein U
Vpx	Viral Protein X
WHO	World Health Organization
X4	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CXCR4

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de ilustrações	VIII
Lista de tabelas	X
Lista de abreviaturas	XI
1 – Introdução	1
1.1 Preâmbulo	1
1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana	3
1.3 Estrutura e Genoma do HIV	4
1.4 Ciclo de Infecção/Replicação	8
1.5 Aspectos Clínicos e Imunológicos da Infecção pelo HIV	9
1.6 Classificação e Origem do HIV	12
1.7 Epidemiologia Molecular do HIV-1	15
1.8 Variabilidade Fenotípica do HIV-1	17
1.9 O Subtipo C do HIV-1	21
1.10 O Subtipo C no Brasil	25
1.11 Racional	26
2 – Objetivos	28
3 – Material e Métodos	29

3.1 Amostras Clínicas	29
3.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico – PBMCs.....	29
3.3 Isolamento e expansão viral.....	30
3.4 Avaliação da capacidade replicativa em macrófagos humanos primários.....	30
3.5 Avaliação da capacidade replicativa em células de linhagem T CD4+	31
3.6 Análise da utilização do receptor de quimiocina	32
3.7 Extração de DNA genômico	33
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
3.9 Purificação e Sequenciamento	35
3.10 Análises Filogenéticas.....	36
3.10.1 Determinação do subtipo das amostras	36
3.10.2 Análise intra-subtipo C	36
3.10.3 Determinação das distâncias genéticas	37
3.10.4 Análise das seqüências de aminoácidos.....	37
3.10.5 Análise de recombinação	37
4 – Resultados	39
4.1 Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes.	39
4.2 Identificação dos subtipos de HIV-1.....	41
4.3 Análise Filogenética Intra-Subtipo C.....	47
4.4 Determinação das distâncias genéticas	50
4.5 Análise das seqüências de aminoácidos.....	51

4.6 Análise de recombinação	54
4.7 Caracterização Biológica	68
4.8 Caracterização Molecular da alça V3 dos isolados.....	69
5 – Discussão	71
6 – Conclusões	80
Anexos	81
Anexo A.....	81
Anexo B	82
Referências Bibliográficas	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Preâmbulo

A síndrome da imunodeficiência adquirida (“Acquired Immune Deficiency Syndrome” - AIDS) tem se constituído em um dos mais sérios agravos já enfrentados pelo homem, sendo considerada a quinta causa de morte em todo o mundo e a principal causa na África subsaariana (UNAIDS, 2005). Desde que os primeiros casos de AIDS foram diagnosticados no início dos anos 80, a disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocorreu rapidamente por todas as regiões do mundo, como consequência do crescente movimento de globalização e da expansão do turismo. Mais de 65 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV no mundo, sendo que, destas, mais de 25 milhões foram a óbito (UNAIDS, 2005). Atualmente, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 40,3 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus, incluindo 2,5 milhões de crianças com menos de 15 anos. Desse total,

aproximadamente 95% vive em países em desenvolvimento, sobretudo na África subsaariana, onde 10% da população está contaminada. Apesar dos inúmeros esforços e recursos investidos por entidades e cientistas de todo o mundo, até o momento não existe nenhuma vacina eficaz e nem medicamentos que levem à cura da doença. Ao contrário, o número total de pessoas vivendo com o HIV continua a crescer. Até novembro de 2005 foi registrado o maior número de casos por ano desde o início da epidemia, com mais cinco milhões de novas infecções. Neste mesmo ano, mais de três milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS e, destas, mais de 500 mil eram crianças (UNAIDS, 2005). Estes fatos fazem desta síndrome uma das mais destrutivas epidemias na história da humanidade.

A AIDS foi primeiramente relatada em 1981 nos Estados Unidos e esteve associada a indivíduos adultos do sexo masculino que apresentavam alguns aspectos em comum, como sarcoma de Kaposi, pneumonia por Pneumocystis carinii, comprometimento do sistema imune e comportamento

homossexual, o que levou à conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível. Logo após a identificação da AIDS, as pesquisas se voltaram para a identificação do agente etiológico desta síndrome. Em 1983, o HIV foi isolado pela primeira vez por um grupo de pesquisadores liderados por Luc Montaignier do Instituto Pasteur de Paris, França, sendo então denominado LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983). Um ano depois, a equipe do pesquisador norte americano Robert Gallo também identificou o vírus (GALLO et al., 1984). A partir de então, os esforços foram direcionados para o desenvolvimento de testes de diagnóstico laboratorial, vacinas e medicamentos para combater a doença. Em 1987 surgiu a primeira droga terapêutica contra o HIV, conhecida como zidovudina (azidotimidina - AZT), um análogo nucleosídico, o qual age inibindo a atividade da enzima transcriptase reversa e, portanto, impedindo a replicação do vírus (EZZELL, 1987). Apesar de ter se mostrado eficaz inicialmente, reações

adversas e a resistência a esta droga foram complicações importantes. Anos depois, surgiram novas substâncias que impediam a atividade de outra enzima, como os inibidores da protease que impedem a maturação de novas partículas virais. Estas substâncias, associadas ao AZT (terapia dupla), aumentaram discretamente a sobrevivência das pessoas afetadas (RICHMAN, 2001). Em 1996, surgiu uma nova proposta terapêutica, conhecida como “Coquetel Anti-Aids” ou terapia anti-retroviral de alta potência (“Highly Active Anti-Retroviral Therapy” - HAART), baseada na combinação de três agentes inibidores. O “coquetel” se mostrou eficaz na redução da mortalidade e na indução da supressão da carga viral. Atualmente, existem cerca de 17 drogas que compõem o arsenal contra o HIV, entretanto, nenhuma delas isoladamente ou em combinação é capaz de eliminar completamente o vírus.

O comportamento homossexual foi o principal fator de risco para a infecção pelo HIV nos primeiros anos da epidemia de AIDS nos países desenvolvidos. Secundariamente, o uso de drogas injetáveis passou a exercer um papel importante na transmissão do vírus, particularmente em regiões como a Ásia e leste da Europa. Outra via que passou a contribuir para a disseminação do HIV nesse período foi a transmissão através de transfusão sanguínea, que diminuiu drasticamente na maioria dos países desenvolvidos com a implantação de testes sorológicos nos bancos de sangue (GAYLE; KOPLAN, 2001). Nos últimos anos, um grande aumento do número de casos por exposição heterossexual vem sendo

observado. Este fato se reflete no número de 17,5 milhões de mulheres vivendo com HIV no mundo (UNAIDS, 2005). Assim, a exposição heterossexual representa atualmente a forma predominante de transmissão do HIV no mundo.

No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2005, já foram notificados cerca de 372 mil casos da doença. Entretanto, estima-se que cerca de 600 mil brasileiros (0,61%) estejam infectados pelo HIV. Até dezembro de 2004, cerca de 172 mil óbitos devido à AIDS foram registrados no país. As regiões mais afetadas pela doença são as Regiões Sudeste e Sul que juntas somam mais de 80% do total de casos. O Sudeste é a região mais atingida desde o início da epidemia e, apesar da alta taxa de incidência, é a única que mostra uma tendência de declínio desde 1998. Nas demais regiões, têm-se observado aumento das taxas de incidência de casos, principalmente na Região Sul. Do total de casos registrados, a maior parte envolveu indivíduos com idade entre 15 a 49 anos, com predomínio de indivíduos do sexo masculino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Entretanto, nos últimos anos, observaram-se mudanças na dinâmica de transmissão do HIV, com algumas tendências notáveis. Após uma primeira fase de maior incidência de casos de AIDS entre adultos homossexuais masculinos, seguida por aumento em usuários de drogas injetáveis, tem havido, assim como na epidemia mundial de AIDS, um aumento significativo de casos associados à transmissão heterossexual (heterossexualização). Esse fato se refletiu no incremento marcante de casos entre mulheres (feminização), com conseqüente aumento do número de casos de transmissão vertical, os quais, entretanto, diminuíram nos últimos anos, graças aos programas de controle implantados pelo Ministério da Saúde. Associado a isso está o crescimento da epidemia entre indivíduos de baixo poder aquisitivo (pauperização) e a crescente incidência no interior do país (interiorização) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

O Brasil foi um dos primeiros países a adotar políticas de saúde significativas para a melhoria da assistência aos indivíduos infectados pelo HIV. Estas incluem, entre outras iniciativas, um programa de distribuição universal e gratuita dos medicamentos anti-retrovirais na rede pública de saúde. Esta medida do Ministério da Saúde representou um marco importante na epidemia de AIDS do país, possibilitando uma melhoria na qualidade de vida dos indivíduos infectados pelo HIV, com a redução da morbidade e mortalidade e o conseqüente aumento da sobrevivência dessas pessoas. No entanto, segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde de 2005, a taxa de incidência de AIDS no país mantém-se, ainda, em patamares elevados (19,2 casos por 100 mil habitantes, em 2003), basicamente devido à persistência da tendência de crescimento entre as mulheres. Ainda, apesar de estabilizada, a mortalidade por AIDS no país permanece alta (cerca de 11 mil óbitos anuais desde 1998), observando-se também, o crescimento entre as mulheres e entre indivíduos categorizados como de raça/cor “Preta” e “Parda”, expondo a iniquidade no acesso aos

serviços de saúde para diagnóstico e tratamento das populações menos favorecidas socioeconomicamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Estes fatores refletem a necessidade de medidas de prevenção e assistência aos portadores do vírus voltadas para estes focos de infecção, além de estudos que contribuam para o desenvolvimento de vacinas e terapias eficazes e mais acessíveis, para a contenção da epidemia no Brasil.

1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana

O HIV pertence à família Retroviridae e caracteriza-se pela presença de um genoma constituído por duas fitas simples de RNA e da enzima transcriptase reversa que exerce o papel-chave de transcrição inversa (ou retrotranscrição) do RNA para uma fita dupla de DNA. Este processo ocorre dentro da célula hospedeira, logo após a infecção e o DNA produzido irá incorporar-se ao DNA da célula, com objetivo de reproduzir o vírus. Devido às altas taxas de erro da transcriptase reversa, à ausência de um sistema de correção desses erros, à dinâmica da replicação viral (ROBERTS et al., 1988), e à sua propriedade de recombinação, o HIV é caracterizado por uma marcante variabilidade genotípica. Isto faz com que praticamente cada partícula viral contenha um genoma diferente das demais. Essa alta taxa de variação é responsável pelo aparecimento de cepas virais apresentando características biológicas diferentes (SIMMONDS et al., 1990) e de resistência à terapia anti-retroviral (COFFIN et al., 1995). Ainda, esta grande variabilidade genética do vírus se constitui como um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina universal. Dentro da família Retroviridae, o HIV pertence à subfamília lentivirinae, que é caracterizada, em geral, por infecção persistente crônica com desenvolvimento de danos progressivos ao sistema imune do hospedeiro e conseqüentes alterações patológicas nos estágios tardios da doença (BARRÉ-SINOUSSE, 1996).

As células utilizadas pelo HIV para a infecção e replicação são aquelas que apresentam o receptor de membrana CD4 (linfócitos T CD4⁺, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langherans e microgliais), o qual faz parte do processo de interação do vírus com a célula hospedeira (COHEN et al., 1999). Além da ligação ao receptor CD4, durante o processo de penetração na célula hospedeira, o HIV liga-se a um dos receptores de quimiocinas que são denominados correceptores. Os correceptores mais utilizados pelo HIV-1 são o CCR5 e o CXCR4 (CORMIER et al., 2000; DRAGIC et al., 2000), expressos tanto em células T, como em macrófagos. O CCR5 é um receptor natural para β – quimiocinas como RANTES, MIP - 1 α e MIP - 1 β (COCCHI et al., 1995), enquanto o CXCR4 é receptor para α – quimiocinas como o SDF - 1 α

(BLEUL et al., 1996; OBERLIN et al., 1996). Embora com menor frequência, os receptores CCR2b (DORANZ, 1996), CCR3 (CHOE et al., 1996), STRL33/BONZO/TYMSTR (LIAO et al., 1997; DENG et al., 1997), BOB/GPR15 (MARX; CHEN, 1998) e Apj (CHOE et al., 1998) também podem ser utilizados como mediadores da infecção pelo HIV.

1.3 Estrutura e Genoma do HIV

O HIV é uma partícula constituída de uma camada lipídica ou envelope que envolve o nucleocapsídeo (Figura 1.3.1) onde estão abrigadas as duas fitas simples de RNA. Sua estrutura viral possui formato icosaédrico medindo cerca de 110nm de diâmetro, e apresenta estruturas protuberantes na camada exterior – são as glicoproteínas do envelope. O genoma de RNA possui cerca de 9,5kb de comprimento e é ocupado em grande parte pelos três genes estruturais: *gag* (grupo antígeno), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), que são delimitados por duas regiões contendo seqüências repetitivas, denominadas longas regiões terminais repetidas (LTR – long terminal repeat region), onde estão as principais seqüências promotoras para a transcrição dos genes virais. Há ainda, seis outros genes acessórios e regulatórios no genoma, sendo os cinco: *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef* comuns ao HIV-1 e HIV-2 e, *vpu* e *vpx* para o HIV-1 e HIV-2, respectivamente (ZEICHNER, 1994) (Figura 1.3.2).

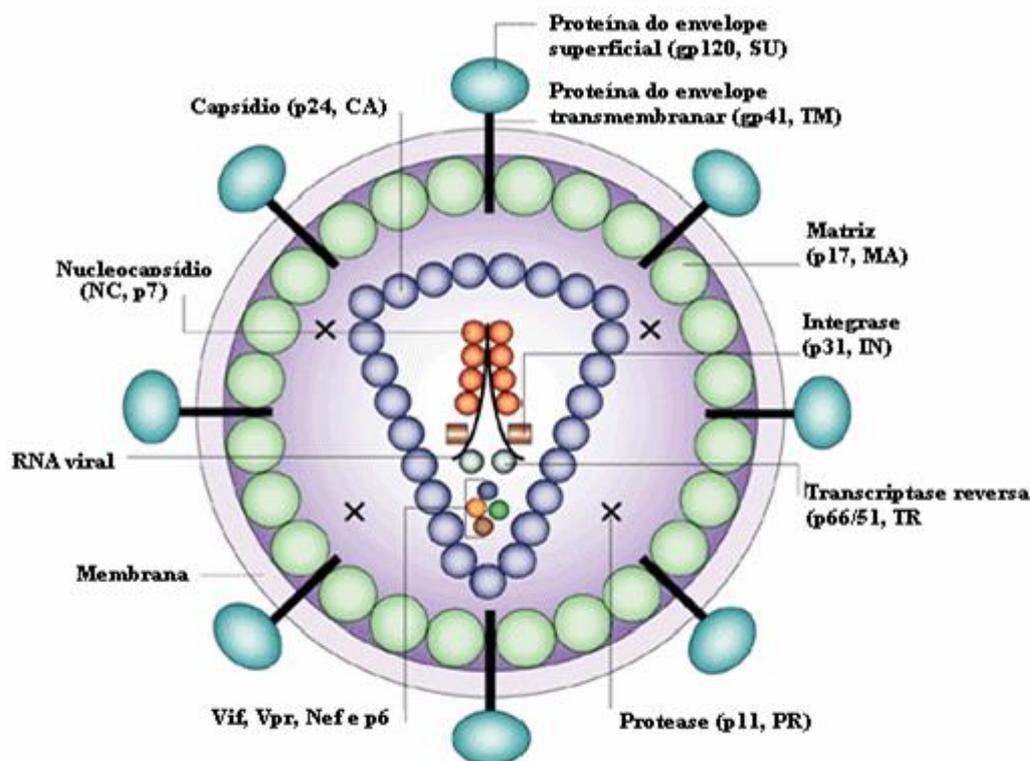


Figura 1.3.1: Desenho esquemático da estrutura morfológica do HIV-1. Adaptado de http://www.nature.com/nri/journal/v2/n4/slideshow/nri776_F1.html.

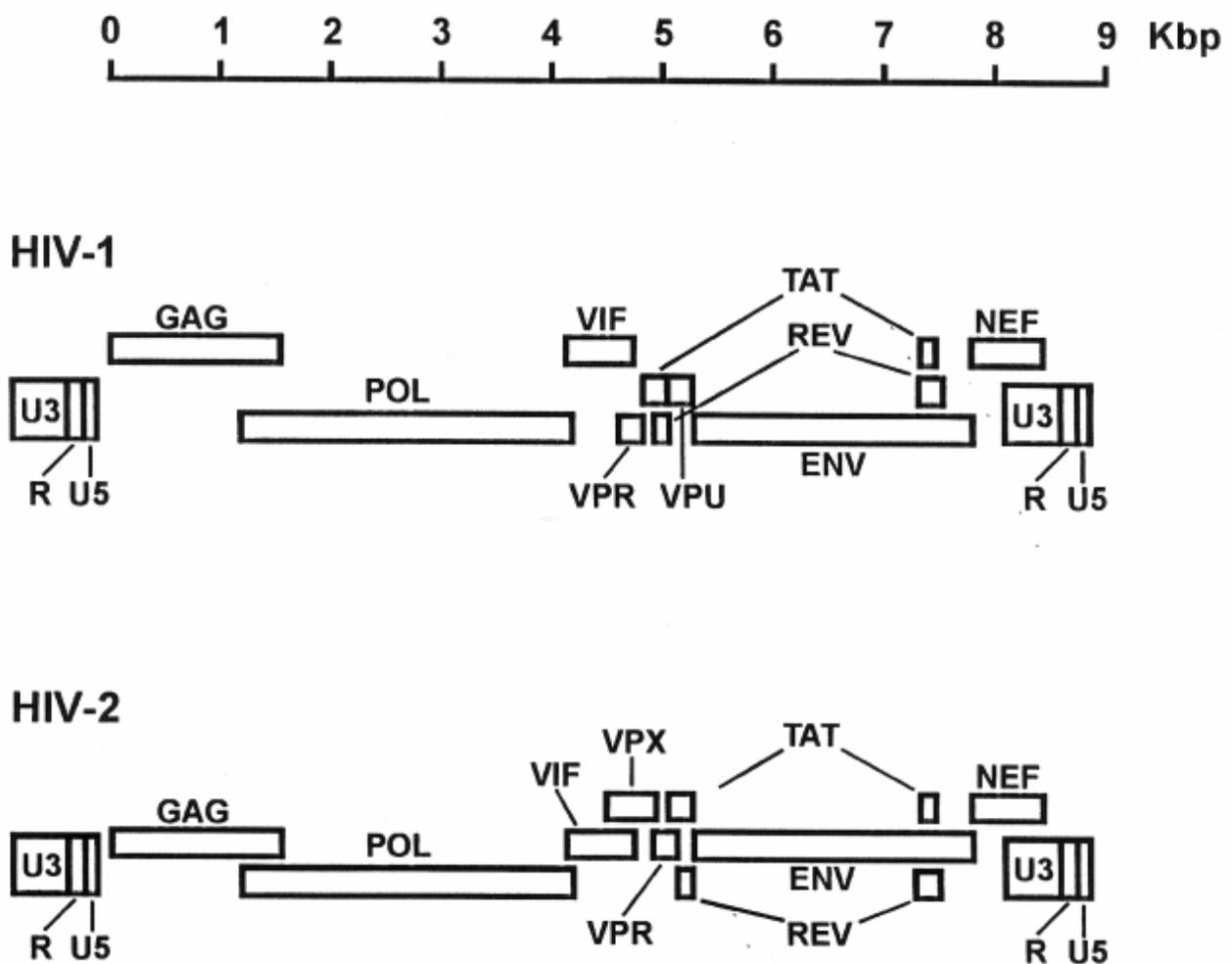


Figura 1.3.2: Representação esquemática do genoma do HIV-1 e do HIV-2.

O envelope viral de natureza lipoprotéica é derivado da membrana celular do hospedeiro e formado por duas glicoproteínas extensivamente glicosiladas: gp120 e gp41 (CHAN; KIM, 1998). A estrutura da gp120 apresenta cinco regiões variáveis (V1-V5) intercaladas por cinco regiões conservadas (C1-C5) (STARCICH et al., 1986) (Figura 1.3.3). Uma das regiões variáveis, designada V3, é formada por uma alça composta de 35 aminoácidos e unida por

pontes dissulfeto. Essa região é imunodominante e contra ela são produzidos anticorpos neutralizantes (GOUDSMIT et al., 1988). Na superfície do vírus, as proteínas do envelope estão estruturadas em complexos triméricos que promovem a ligação e fusão à membrana celular (CHAN; KIM, 1998). A localização da gp120 é totalmente exterior e a gp41 tem localização transmembranar. Ambas são produzidas a partir da clivagem de uma glicoproteína precursora, a gp160, codificada pelo gene *env*. Abaixo da bicamada lipídica está a proteína da matriz p17 (MA) que é codificada pelo gene *gag*. Além da p17, são codificadas também por *gag*, as proteínas: p24 (CA) que envolve o cerne ou capsídeo viral, p7 (NC) e p6 que se localizam no nucleocapsídeo. O gene *pol* codifica as enzimas envolvidas no processo de replicação e integração do genoma viral: protease (p11), transcriptase reversa (p66/p51) e integrase (p31). As proteínas dos genes *gag* e *pol* são traduzidas como precursores que devem ser clivados pela protease nas subunidades distintas (ZEICHNER, 1994). As longas regiões terminais repetidas (LTR) não codificam proteínas, mas são essenciais para a regulação da expressão viral. Fatores transcricionais do hospedeiro e outros codificados pelo vírus ligam-se a regiões específicas da LTR e promovem a expressão dos genes do HIV (GREENE; PETERLIN, 2002). As regiões LTR contêm regiões com sinais para poliadenilação (KAO et al., 1987), TATA Box, seqüências promotoras e sítios de ligação para dois fatores transcricionais: NFκB e SP1 (KARN, 1999). A proteína Tat ("trans-acting transcription transactivator") é uma transativadora da transcrição do genoma viral e é essencial para a replicação do HIV (PUGLISI et al., 1992). Vpr medeia o processo de transporte do complexo de pré-integração viral para o núcleo da célula hospedeira (COHEN et al., 1996) e Rev está relacionada com o processo de exportação de transcritos não processados do núcleo para o citoplasma (HOPE, 1997). A proteína Nef parece estar relacionada com a redução da expressão de CD4 (AIKEN et al., 1994) e das moléculas HLA de classe I e II (COLLINS et al., 1998) na superfície das células infectadas, o que pode representar um mecanismo de escape importante do vírus à ação das células T citotóxicas e para evitar o reconhecimento pelas células T CD4⁺. A Nef pode também interferir com a ativação das células T por ligação a várias proteínas que estão envolvidas nas vias intracelulares de transdução de sinal (PETER, 1998). A proteína Vpu relaciona-se com a etapa de produção e brotamento das partículas virais e com a regulação negativa de moléculas CD4 pelas células infectadas (KLIMKAIT et al., 1990; SCHUBERT et al., 1996). A Vif é importante para os mecanismos intracelulares de transporte dos componentes virais, além de se ligar ao inibidor antiviral APOBEC3G, o qual pertence a uma família de enzimas intracelulares que desaminam especificamente a citosina em uracila no RNAm ou no DNA, resultando numa acumulação de mutações G-para-A que levam à degradação do DNA viral. Ao formar um complexo com a APOBEC3G, a Vif bloqueia a atividade inibitória da APOBEC3G (MARIANI et al., 2003).

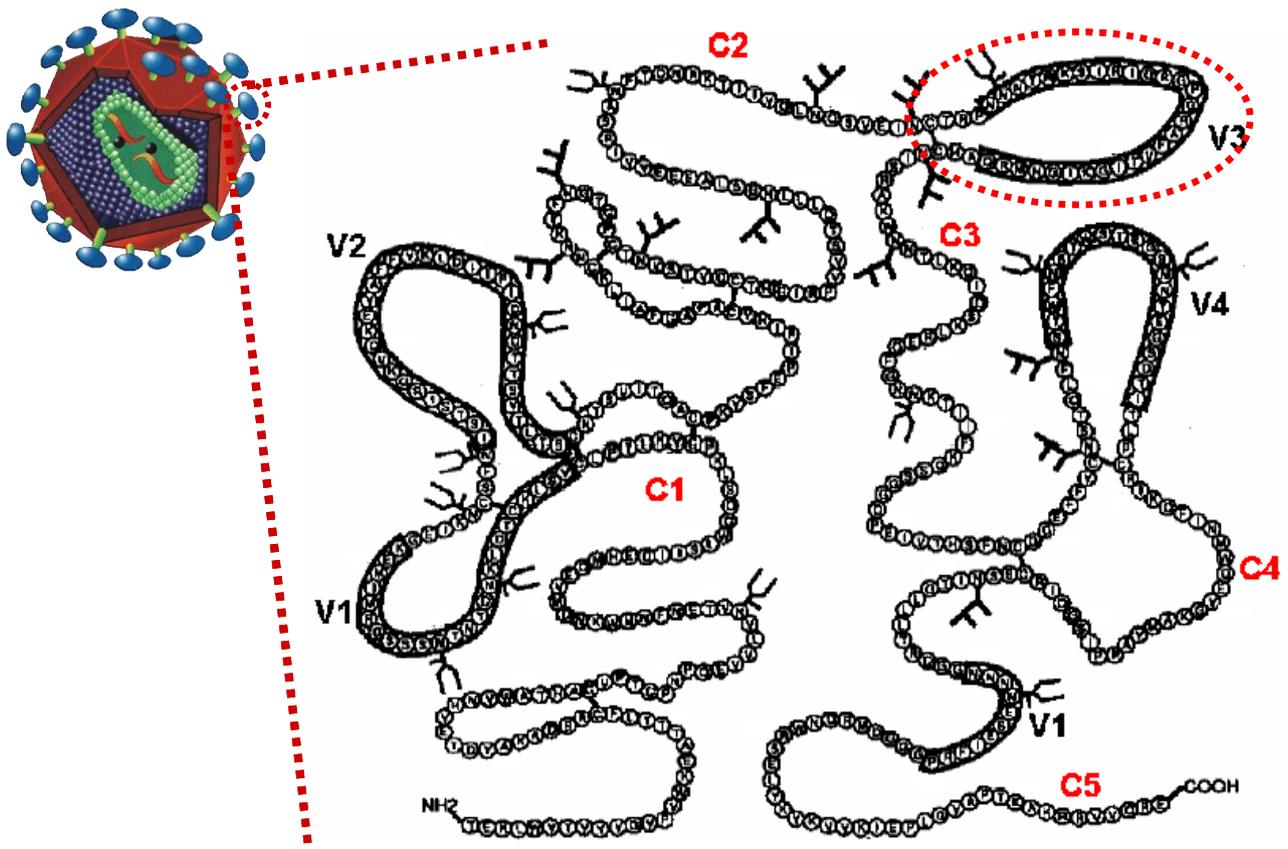


Figura 1.3.3: Representação esquemática da gp120 do HIV-1 mostrando as cinco regiões conservadas (C1-C5) e as cinco regiões variáveis (V1-V5). No detalhe a região V3 imunodominante. As pontes dissulfeto são mostradas como traços entre aminoácidos e as cadeias laterais dos N-oligossacarídeos são mostradas como estruturas ramificadas. Adaptado de Leonard et al. (1990).

1.4 Ciclo de Infecção/Replicação

Como todos os vírus, o HIV se reproduz utilizando a maquinaria genética da célula hospedeira. O início do ciclo de infecção do HIV ocorre através da ligação da partícula viral, através da proteína gp120, com o receptor CD4 na superfície da célula-alvo (UGOLINI et al., 1999; GREENE; PETERLIN, 2002). Esta reação leva à mudanças conformacionais e à subsequente participação de uma das moléculas da família dos receptores de quimiocinas (CCR5 e CXCR4 principalmente) no processo. A formação do resultante complexo ternário (UGOLINI et al., 1999) (gp120/CD4/receptor de quimiocina) resulta em uma segunda mudança na conformação das proteínas do envelope viral, levando à exposição da gp41, que se ancora na membrana plasmática da célula através de um de seus sítios hidrofóbicos (UGOLINI et al., 1999; GREENE; PETERLIN, 2002). Ocorre então a fusão entre o envelope viral e a membrana celular permitindo a entrada do capsídeo na célula (DOMS; PEIPER, 1997; GREENE; PETERLIN, 2002). A eficiência de entrada do vírus na célula, devida provavelmente à avidéz de ligação às moléculas de CD4 e do correceptor, parece estar diretamente relacionada com o “fitness” da partícula viral (MAROZSAN et al., 2005). Variações na eficiência de entrada são provavelmente consequência da grande variabilidade no gene do envelope que por sua vez está relacionada com as fortes pressões seletivas do ambiente hospedeiro (RICHMAN et al., 2003; WEI et al., 2003). Após a fusão, o capsídeo é então desencapado levando à liberação do seu conteúdo, o RNA genômico e enzimas virais, no citoplasma da

célula. Em seguida, a enzima transcriptase reversa promove a síntese de uma molécula de DNA de fita dupla a partir do RNA viral. Esta recém-sintetizada molécula de DNA, juntamente com a enzima integrase, forma um complexo de pré-integração viral, o qual é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira. Através da atividade da integrase, ocorre a integração estável do cDNA viral no DNA cromossômico da célula, estabelecendo um provírus (KATZ; SKALKA, 1994). O provírus tem uma tendência de manter-se no estado latente nos cromossomos da célula infectada sem produzir vírus até ser ativado por um determinado evento mitogênico; esta capacidade de latência complica enormemente as tentativas de tratamento da infecção com drogas antivirais. Quando a célula é ativada, através do uso da maquinaria biossintetizadora da célula e da regulação adicional pelas proteínas virais (FRANKEL; YOUNG, 1998), o provírus é repetidamente transcrito. O conjunto de RNAs transcritos é então transportado para o citoplasma, onde será traduzido em suas proteínas. As proteínas virais são clivadas pela ação das proteases, migrando em seguida para os sítios de maturação, nas imediações da membrana plasmática, de onde brotam as novas partículas virais.

1.5 Aspectos Clínicos e Imunológicos da Infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV ocorre através do contato de um indivíduo não-infectado com o sangue, sêmen ou outros fluidos corporais de um indivíduo infectado. Aproximadamente de três a seis semanas após esse período, inicia-se a fase de infecção primária (Figura 1.5.1), caracterizada por altos índices de replicação viral (acima de 10^7 cópias de RNA/ml de plasma) e conseqüente disseminação do vírus para os linfonodos e no sangue periférico. Como conseqüência, ocorre uma diminuição do número de linfócitos TCD4+ (PANTALEO; FAUCI, 1996). Estudos mostram que esta depleção de linfócitos T CD4+ ocorre de forma mais acentuada na mucosa do trato gastrointestinal do

que no sangue periférico durante a infecção primária pelo HIV-1 (GUADALUPE et al., 2003; MEHANDRU et al., 2004). De fato, a mucosa gastrointestinal abriga a maioria dos linfócitos T presentes no organismo, enquanto o sangue periférico contém apenas entre 2% e 5% dos linfócitos totais (SMIT-MCBRIDE et al., 1998). Além disso, comparando-se com os linfócitos circulantes, uma maior percentagem dos linfócitos CD4+ presentes na mucosa expressam o receptor de quimiocina CCR5 o qual é utilizado preferencialmente durante a fase inicial da infecção (CONNOR et al., 1997). Assim, o trato gastrointestinal tem sido descrito como um reservatório viral persistente (KOTLER et al., 1991; NANNINI et al., 2002) e como tendo um papel importante na patogênese do HIV-1, uma vez que é fortemente sugerido que os eventos virológicos e imunológicos durante a infecção aguda e inicial pelo HIV-1 tem um papel crucial na determinação da velocidade da progressão para doença (MELLORS et al., 1996; LEFRERE 1998). Durante a fase de infecção primária, cerca de 50% a 70% dos indivíduos infectados desenvolvem uma síndrome clínica

com sintomas que se assemelham aos de uma gripe e têm duração de uma ou mais semanas (COHEN et al., 1997). Em resposta à infecção, ocorre um aumento significativo de células TCD8+ no sangue periférico (FAUCI, 1993), provavelmente, o principal responsável pelo controle da viremia (BORROW et al., 1994; PANTALEO et al., 1994). Estas células, através da atividade citotóxica HIV-específica eliminam células infectadas, e através da produção de fatores solúveis contribuem para a supressão da replicação viral (MACKEWICZ et al., 1991). Neste período, os testes para detecção de anticorpos normalmente não conseguem diagnosticar a infecção, pois, embora os títulos virais estejam altos, os níveis de anticorpos durante a fase aguda ainda são inexpressivos (FAUCI, 1993) (Figura 1.5.1). O controle da viremia resulta então na resolução da síndrome aguda viral. Entretanto, é nesta fase que se formam os focos de células infectadas latentes que representam um dos potenciais mecanismos de escape da resposta imune e de medicamentos, além da persistência

da infecção. Assim, embora ocorra uma dramática queda da viremia, a replicação viral não é totalmente controlada (PANTALEO; FAUCI, 1996).

Após o período da infecção primária, inicia-se uma fase conhecida como latência clínica, quando todos os parâmetros virológicos se mantêm em níveis baixos ou indetectáveis, como consequência da resposta imune específica. Conseqüentemente, ocorre uma recuperação do número de linfócitos TCD4+ que se mantêm estável ou sofre um declínio gradual (COHEN et al., 1997); nesta fase, a maioria dos indivíduos infectados se mantêm assintomática. Tanto a resposta celular como a resposta humoral HIV-específicas são detectadas em níveis elevados durante o período de latência clínica (Figura 1.5.1), entretanto, os níveis de replicação viral, embora baixos, não são totalmente controlados (PANTALEO; FAUCI, 1996). Os mecanismos responsáveis pela habilidade do vírus de escapar dessas respostas ainda não são bem entendidos. Um fator que parece contribuir é a propensão do HIV em gerar seqüências variantes que podem não ser reconhecidas pelo sistema imune (COFFIN, 1995). Existem alguns estudos demonstrando que cepas variantes podem resistir à neutralização por anticorpos ou não ser reconhecidas por linfócitos T citotóxicos induzidos por uma outra cepa viral (ARENDRUP et al., 1992; BONGERTZ et al., 1997; BORROW et al., 1997).

Após um período que varia de três a dez anos, como consequência do efeito citopático direto do vírus sobre as células infectadas e de mecanismos imunológicos que causam a destruição destas células, como a apoptose e a citotoxicidade, ocorre uma perda considerável de células TCD4+, atingindo níveis inferiores a 200 células/ μ l, e a destruição da maioria do tecido linfóide no indivíduo infectado pelo HIV (COHEN et al., 1999). A resposta CTL HIV-específica é geralmente perdida e anticorpos neutralizantes são raramente detectados. Concomitantemente, ocorre um novo aumento da replicação viral culminando com o surgimento dos sintomas da AIDS. Portanto, esta síndrome se caracteriza por uma imunossupressão acentuada, tornando o indivíduo infectado suscetível a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (COFFIN et al., 1995; KAHN et al., 1998).

A taxa de progressão para a fase de AIDS pode variar substancialmente entre os indivíduos infectados pelo HIV. Após a infecção, o balanço entre a capacidade do vírus de replicação e a eficiência da resposta imune do hospedeiro a este patógeno irá determinar as diferentes taxas de progressão (PANTALEO; FAUCI, 1996). A maioria dos indivíduos infectados (70-80%) apresenta o perfil típico de progressão para a doença, levando de 6 a 8 anos para atingi-la (BUCHBINDER et al., 1994). Entretanto, uma percentagem dos indivíduos infectados pelo HIV (cerca de 10-15%) apresenta uma rápida progressão para AIDS dentro de dois a três anos após a infecção primária; são os chamados rápidos progressores (PHAIR, 1994). Por outro lado, uma menor percentagem desses indivíduos (menor que 5%), conhecidos como não-progressores, permanece assintomática, com o número de células TCD4+ dentro dos limites normais e com níveis virológicos muito baixos, por 8 a 10 anos após a infecção primária (BUCHBINDER et al., 1994; PHAIR, 1994).

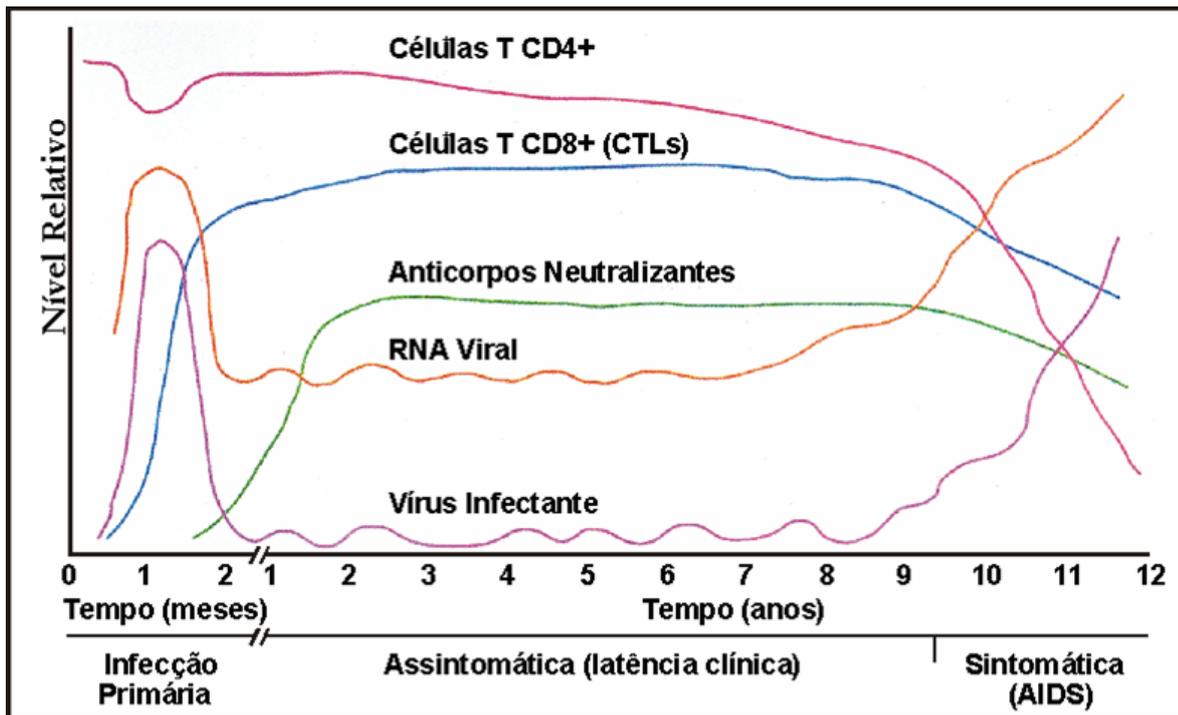


Figura 1.5.1: História natural da infecção pelo HIV-1. Adaptado de Poignard et al. (1996).

1.6 Classificação e Origem do HIV

O HIV é classificado em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é formado por seis subtipos genéticos, ordenados de A a F, apresenta distribuição mais restrita ao Oeste da África, sendo prevalente também em países como Índia (ALAEUS et al., 2000) e Portugal (SORIANO et al., 2000). Parece ser menos patogênico (ALAEUS et al., 2000) e menos transmissível do que o HIV-1 (KANKI et al., 1994; MARLINK et al., 1994), estando associado com um período assintomático mais longo (MARLINK et al., 1994). Sua disseminação permanece estabilizada ou em fase decrescente (VAN DER LOEFF; AABY, 1999). Em contraste, é observada a disseminação do HIV-1 por todas as regiões do mundo.

O HIV-1 apresenta um alto grau de diversidade de seqüências genéticas e tem sido classificado em três grupos distintos denominados M, N e O. O grupo M (major) envolve a maioria das infecções em todo o mundo e é composto por nove subtipos filogeneticamente distintos, denominados A, B, C, D, F, G, H, J e K, dos quais as seqüências dos genes do envelope diferem entre si em cerca de 24% (ROBERTSON et al., 1999). O grupo O (outlier) diverge do grupo M em cerca de 50% das seqüências de aminoácidos do gene *env* (SUBBARAO; SCHOCHETMAN, 1996) e é prevalente na República dos Camarões, Gabão e Guiné Equatorial, na África (GÜRTLER, 1996). O grupo N

(non-M/non-O) apresenta a menor dispersão, tendo sido documentado em poucos indivíduos da República dos Camarões (SIMON et al., 1998) e relacionado com o vírus da imunodeficiência símia deste país (CORBET et al., 2000).

A co-circulação de múltiplas variantes de HIV numa mesma região geográfica favorece episódios de co-infecção, os quais, por sua vez, podem levar à emergência de cepas virais recombinantes, que podem ser viáveis e transmissíveis (ALAEUS et al., 2000). Esta capacidade de recombinação das fitas RNA durante a síntese proviral tem sido demonstrada entre diferentes genomas de HIV do mesmo subtipo ou de subtipos distintos infectando um único indivíduo simultaneamente (SUBBARAO; SCHOCHETMAN, 1996). Quando os vírus recombinantes são transmitidos entre diferentes hospedeiros e originam novas infecções, são designados de formas recombinantes circulantes (“circulant recombinant forms” - CRFs). Para a classificação de uma CRF é necessária a sua identificação em pelo menos três indivíduos não relacionados epidemiologicamente. Atualmente são conhecidas pelo menos 20 CRFs (MCCUTCHAN et al., 2000; CASADO et al., 2005; THOMSON et al., 2005; DE SA FILHO et al., 2006), como, por exemplo, CRF12_BF, resultante da recombinação entre os subtipos B e F ou CRF02_AG resultante da recombinação entre os subtipos A e G, dentre outras. Essa propriedade do HIV representa mais um mecanismo que resulta no aumento de sua variabilidade genética.

A respeito de suas origens, sabe-se que uma grande subfamília de retrovírus relacionada ao HIV está presente em primatas não-humanos, na África sub-sahariana. Todos os membros dessa subfamília de retrovírus possuem estrutura genômica semelhante, apresentando identidade em torno de 50%, além de todos apresentarem a capacidade de infectar linfócitos através do receptor CD4 (HIRSCH et al., 1986). Numerosos retrovírus de primatas não-humanos encontrados na África têm apresentado grande similaridade com HIV-1 e HIV-2. O vírus da

imunodeficiência símia (“simian immunodeficiency vírus” - SIV), que infecta uma subespécie de chimpanzés africanos, apresenta uma estrutura genômica em torno de 98% similar ao HIV-1, sugerindo que ambos evoluíram de uma origem comum (HIRSCH et al., 1986; GAO et al., 1999). Muitas espécies de primatas estão infectadas com SIV na selva africana; entretanto, estes lentivírus de primatas não-humanos não são, em geral, patogênicos em seu reservatório natural (GAO et al., 1999). Observações de que contatos entre estes primatas e humanos são comuns na África, uma vez que estes animais são caçados para uso na alimentação ou criados como animais de estimação, somadas ao fato de que os primeiros casos documentados, tanto do HIV-1 em 1959, quanto de HIV-2, em 1986, ocorreram na África (ALAEUS et al., 2000), além da circulação de todos os tipos, grupos e subtipos do vírus neste continente, apontam para uma origem zoonótica do HIV ocorrida no continente africano.

A história evolutiva do HIV-1 e HIV-2 tem sido reconstruída em grandes detalhes através da inferência de árvores filogenéticas de lentivírus de primatas. Através destas análises, foi descoberto que os dois vírus humanos são relacionados a diferentes SIVs e, por isso, têm origens evolutivas diferentes (Figura 1.6.1). Especificamente, o HIV-1 é mais estreitamente relacionado ao SIV cpz, que é encontrado em algumas subespécies de chimpanzé (*Pan troglodytes*

troglydytes e *Pan troglodytes schweinfurthii*) que habitam partes do Oeste equatorial e África Central respectivamente (GAO et al., 1999). O SIV cpz isolado de *P. t. troglodytes* é de maior interesse, pois é o mais estreitamente relacionado com o abundante grupo M do HIV-1. A localização geográfica do *P. t. troglodytes* também compreende a região da África que apresenta a maior diversidade genética de HIV-1, contendo os grupos M, N e O (RAMBAUT et al., 2004). Em contraste, o HIV-2 é mais estreitamente relacionado com o SIV sm, que é encontrado em grande abundância em macacos “sooty mangabey” (*Cercocebus atys*), os quais são mais freqüentes em regiões do Oeste da África, aonde o HIV-2 provavelmente emergiu (RAMBAUT et al., 2004).

Estudos de filogenia molecular também demonstraram que aconteceram muitos eventos independentes de transmissões entre primatas e humanos, uma vez que uma mistura de linhagens de HIV e SIV foi observada (Figura 1.6.1). Embora seja difícil determinar exatamente quantos eventos de transmissão ocorreram, para o HIV-2 este número deve ter sido no mínimo de quatro (HAHN et al., 2000), enquanto três eventos de transferência do chimpanzé para a espécie humana são estimados para explicar a atual diversidade do HIV-1, tendo os grupos M, N e O origens independentes (GAO et al., 1999). Entretanto, eventos de recombinação interespecífica, os quais devem ser comuns entre os lentivírus de primatas, complicam enormemente esta análise. Por exemplo, o grupo N do HIV-1 parece ser um recombinante entre uma cepa do SIV cpz e um vírus relacionado ao ancestral do grupo M (GAO et al., 1999), mas este evento ocorreu antes do estabelecimento do grupo M e N em humanos (RAMBAUT et al., 2004).

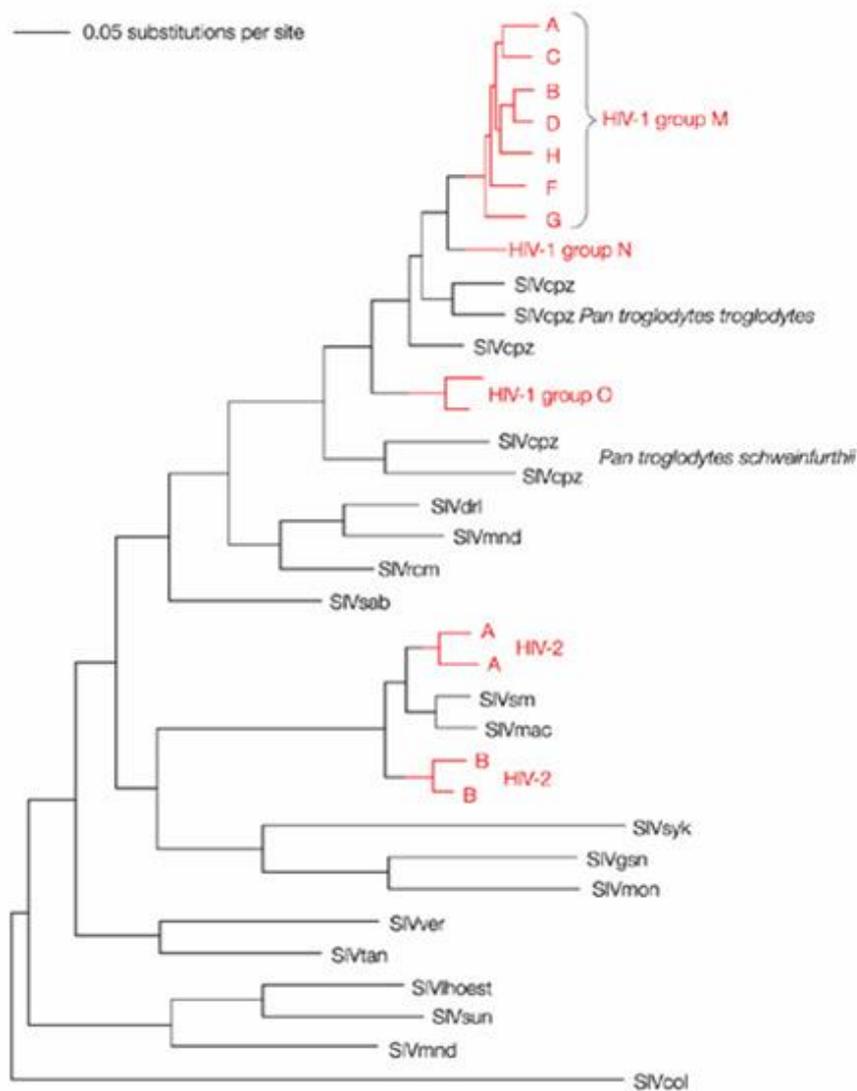


Figura 1.6.1: História evolutiva dos lentivírus de primatas. Adaptado a partir de Rambaut et al. (2004).

1.7 Epidemiologia Molecular do HIV-1

Uma característica relevante do HIV-1 é a forma particular de dispersão dos diferentes subtipos nas diversas regiões geográficas (Figura 1.7.1). O subtipo B é o mais estudado e isso deve-se ao fato deste subtipo predominar nas epidemias da América do Norte, Europa e Austrália. Na África Central, todos os vírus do grupo M são encontrados, bem como os grupos O e N. No oeste da África predominam o subtipo A e a CRF02_AG, enquanto que nos países do leste, como Uganda, predominam os subtipos A e D. No sudeste e sul da África, como na África do Sul, Etiópia, Tanzânia, Malawi, Botsuana, Eritrea, Zâmbia, Namíbia e Somália, predomina o subtipo C. A epidemia de AIDS na Índia, assim como em outros países do sudeste da Ásia, é caracterizada pela predominância do subtipo C, mas a CRF AE é também importante, especialmente na Tailândia, juntamente com o subtipo B. Na América do Sul, o subtipo B

predomina, mas o subtipo F, bem como esporádicos casos de subtipo C, também ocorrem (revisto por ALAEUS et al., 2000).

No Brasil, estudos da epidemiologia molecular do HIV-1 mostraram clara predominância do subtipo B, com a presença de subtipos adicionais, como o subtipo F (MORGADO et al., 1994), o subtipo C (WHO, 1994), o subtipo D (MORGADO et al., 1998a), o subtipo A (CARIDE et al., 2001), e dos recombinantes B/F e B/C (SABINO et al., 1994; GAO et al., 1996b; GUIMARÃES et al., 2001). Além destes genótipos, trabalhos de caracterização genotípica de isolados do subtipo B no Brasil descrevem uma variação na alça V3 do gene *env*, caracterizada por uma substituição do aminoácido prolina por triptofano (GPGR→GWGR), discriminando uma variante chamada de B^B (B brasileiro) (MORGADO et al., 1996). Dos vírus do subtipo B circulantes na região Sudeste, aproximadamente 40% foram descritos como correspondentes a variante B^B (MORGADO et al., 1998a,b; COVAS et al., 1998).

Os subtipos do HIV-1 também apresentam dispersão diferenciada entre os diferentes grupos de risco e/ou modos de transmissão. Por exemplo, o subtipo B é predominantemente associado com as epidemias ligadas a usuários de drogas injetáveis e pessoas com comportamento homossexual no mundo Ocidental, enquanto a CRF01_AE e o subtipo C estão relacionados com a transmissão heterossexual na Tailândia, Índia e África subsaariana (WENIGER et al., 1994; KUNANUSONT *et al.*, 1995; BURKE; MCCUTCHAN, 1996). Uma observação que possivelmente está relacionada com estas características da epidemiologia molecular do HIV-1 é a replicação mais eficiente do subtipo C e da CRF AE em células de Langerhans, importantes na transmissão heterossexual, comparados com o subtipo B (SOTO-RAMIREZ et al., 1996). Entretanto, esta associação não foi confirmada em estudos posteriores (BALL et al., 2003; ARIEN et al., 2005). Por outro lado, a disseminação global dos subtipos de HIV-1 é um processo dinâmico, e associações entre modos de transmissão e subtipos são provavelmente devido a eventos históricos, como migrações, fatores sociais, comportamentais e econômicos associados provavelmente a fatores biológicos do hospedeiro e virais.

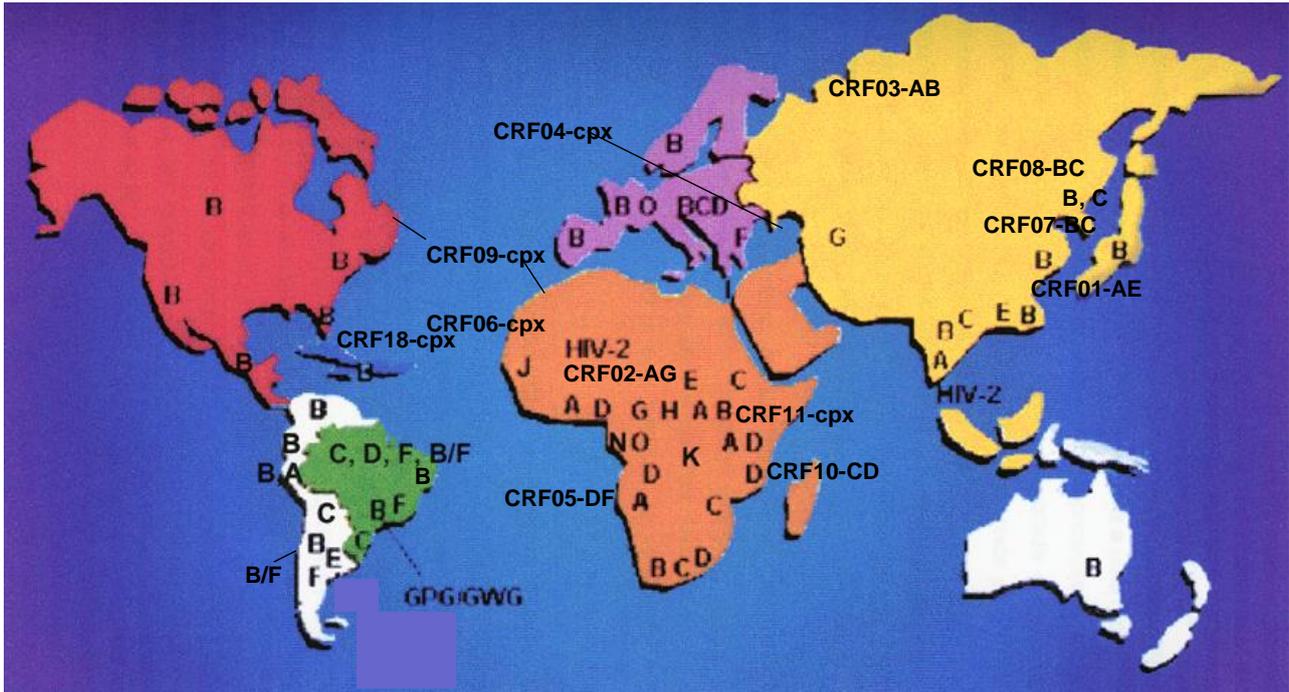


Figura 1.7.1: Distribuição mundial dos diferentes subtipos de HIV-1 do grupo M, grupo O e HIV-2. Adaptado a partir de Morgado et al. (2002) – revisado em fevereiro de 2006).

1.8 Variabilidade Fenotípica do HIV-1

As glicoproteínas do envelope do HIV medeiam a entrada do vírus na célula através da interação com os receptores celulares. Variações no gene que codifica estas proteínas resultam em interações diferenciadas entre as diversas cepas virais e os receptores nesta etapa do ciclo biológico do HIV. Em outras palavras, o alto grau de polimorfismo no gene *env*, resultante em grande parte de pressões seletivas exercidas pelo sistema imune (RICHMAN et al., 2003; WEI et al., 2003), está relacionado com diferentes comportamentos biológicos dos isolados virais.

Algumas características relacionadas com o perfil biológico do vírus têm sido estudadas *in vitro* permitindo classificar os isolados virais de acordo com a cinética de replicação, tropismo celular, indução da formação de sincícios e uso preferencial dos receptores de quimiocinas. Foram observados dois comportamentos distintos de isolados virais cultivados quanto à taxa de replicação por período de tempo, sendo que alguns deles atingem altos títulos de replicação em curto período de tempo (vírus rápido/alto), enquanto outros se replicam de forma lenta, com baixa produção de títulos de p24 (vírus lento/baixo) (FENYO et al., 1988). Quanto ao tropismo celular, os vírus podem ser trópicos para células de linhagem T CD4⁺ (vírus linfocitotrópicos – TL) ou trópicos para monócitos/macrófagos (vírus monocitotrópicos – TM), não tendo sido observada nestes últimos replicação e efeito citopático *in vitro* em células tumorais T CD4⁺. Inúmeros isolados virais, entretanto, podem ser duplo-trópicos, com capacidade de replicar-se tanto em células tumorais de linhagem TCD4⁺ como também em macrófagos (BERGER et al., 1999) (vírus duplo-trópicos – DT), mas com eficiências de replicação diversas, dependendo do isolado em particular e do tipo de doador das células

(VALENTIN et al., 1994). Um terceiro sistema de classificação é baseado na habilidade do vírus em induzir a formação de sincícios (células gigantes) ao infectar células MT-2, podendo os isolados ser classificados como indutores (IS) ou não-indutores de sincício (NIS). Além disso, de acordo com o receptor de quimiocina utilizado, os isolados virais são classificados como vírus R5 para aqueles com capacidade de utilização do correceptor CCR5, X4 para aqueles que utilizam o CXCR4 e aqueles com capacidade de utilizar ambos os correceptores CXCR4 e CCR5 são denominados vírus R5X4 (BERGER et al., 1999). Em geral, existe uma associação entre estes diferentes sistemas de classificação das propriedades fenotípicas do HIV, na qual dois perfis principais são observados: isolados R5 são geralmente trópicos para macrófagos, não indutores de sincícios e se replicam mais lentamente do que os isolados X4, que são geralmente trópicos para células de linhagem T CD4+, levando à formação de sincícios em cultura nestas células (BERGER, 1997).

Outra associação que tem sido demonstrada é a relação do fenótipo viral com a fase clínica da infecção, na qual, isolados R5 estão associados com a fase inicial assintomática, enquanto, cepas X4 são isoladas normalmente de indivíduos em fase avançada de AIDS (CONNOR et al., 1997). Os vários mecanismos envolvidos nesta seleção diferenciada de cepas virais em fase distintas da infecção ainda não são totalmente entendidos. A transmissão de vírus de um indivíduo para outro tende a resultar no estabelecimento de uma linhagem de vírus que utiliza preferencialmente o correceptor CCR5, a despeito de algumas vezes o transmissor estar caracterizado pela predominância da variante X4 (CORNELISSEN et al., 1995; TSHERNING et al., 1998; CASPER et al., 2002). De fato, estudos indicam que a seleção de certas variantes do envelope pode ocorrer durante a transmissão sexual (SHIODA et al., 1991; ZHU et al., 1996). Esta seleção das cepas R5 em detrimento das variantes X4 pode estar em parte relacionada com o fato de células cervicais e do cólon apresentarem uma maior expressão de receptores CCR5 em relação à CXCR4 (ZHANG et al., 1998). Além disso, o fenótipo CCR5+/CXCR4- das células de Langerhans, presentes no trato genital feminino, deve contribuir para este gargalo evolutivo (ZAITSEVA et al., 1997). O aumento da cinética de replicação viral que ocorre com o tempo de infecção, propicia o aparecimento de variantes virais com configurações genéticas distintas (quasispécies) que podem ser eventualmente capazes de utilizar diferentes correceptores (XIAO et al., 1998). Diversos estudos mostram que o declínio do número de células T CD4+ e a conseqüente progressão para a fase de AIDS estão relacionados com a emergência e predomínio de cepas capazes de utilizar o correceptor CXCR4 (SCHELLEKENS et al., 1992; SCHUITEMAKER et al., 1992; CONNOR et al., 1993). A mudança na utilização do correceptor, inicialmente descrita como mudança de um fenótipo não indutor de sincícios para um fenótipo indutor de sincícios, ocorre em pelo menos 50% dos indivíduos infectados com o subtipo B (KARLSSON et al., 1994), foi também descrita em indivíduos infectados com os subtipos A, D e CRF AE (BJORNDAL et al., 1997) e se correlaciona com uma taxa mais rápida de progressão para doença. Essa mudança provavelmente ocorre como conseqüência de pressões seletivas do ambiente hospedeiro. Entre estas possíveis forças ambientais estão prevalência de células com maior expressão da molécula CXCR4 em relação à CCR5 (VALENTIN et al., 1998), aumento dos níveis de β -quimiocinas bloqueando a entrada via correceptor CCR5 (MARGOLIS et al., 1998), susceptibilidade à anticorpos neutralizantes e ao ataque de CTLs e/ou propriedades intrínsecas dos isolados virais (PASTORE et al., 2004).

As alterações moleculares associadas com a mudança R5 para X4 *in vivo* não são totalmente conhecidas, embora muitos trabalhos venham demonstrando forte relação entre o fenótipo viral *in vitro* e a seqüência genômica da terceira região variável (V3) do gene *env* (DE JONG et al., 1992; IVANOFF et al., 1992; CHAN et al., 1999; SHIMIZU et al., 1999) (Figura 1.3.3). O fragmento de 35 aminoácidos correspondente à alça V3 relaciona-se diretamente com o processo de ligação do vírus aos receptores celulares. Assim, variações genéticas nesta região, particularmente o

aumento da carga total de aminoácidos, estão associadas com a emergência do fenótipo IS e com a utilização do correceptor CXCR4 (DE JONG et al., 1992; SHIMIZU et al., 1999). Mais especificamente, a presença de um aminoácido neutro (frequentemente uma serina (S)) na posição 11 e um aminoácido negativo (aspartato (D) ou glutamato (E)) nas posições 25 ou 29 relacionam-se com o fenótipo NIS, enquanto, contrariamente, a presença de um resíduo básico em uma destas posições, levando ao aumento da carga positiva da alça V3, pode mudar o fenótipo para IS (HOFFMAN et al., 2002). Além disto, esta região está relacionada com o escape à resposta imune humoral e é de particular importância para estudos de vacinas, uma vez que representa um dos principais epítomos de reconhecimento de anticorpos neutralizantes (GOUDSMIT et al., 1988). Foi demonstrado que a presença de açúcares na glicoproteína gp120 alterando a sua conformação tridimensional exerce um papel importante no escape do vírus à neutralização por anticorpos (BACK et al., 1994; WEI et al., 2003). Assim, outra característica da alça V3 relacionada com o fenótipo viral IS é a perda de um sítio de N-glicosilação (NXS/NXT) nas posições 6 a 8 (LI et al., 2001; POLLAKIS et al., 2001), o que pode estar relacionado com o aumento da sensibilidade destes isolados à ação dos anticorpos neutralizantes. Ainda, o papel de outras regiões genômicas na determinação do fenótipo viral vem sendo também investigado, com alguns estudos demonstrando associação entre o comprimento e/ou a carga das regiões V1 e V2 com a utilização do correceptor e que estes fatores em cooperação com as características determinantes da alça V3 teriam influência também na capacidade de replicação do vírus (POLLAKIS et al., 2001).

Até o momento, não está claro se os diferentes genótipos de HIV possuem características fenotípicas distintas que levem a diferenças na transmissibilidade, infectividade e potencial patogênico. Entretanto, atualmente, inúmeros estudos vêm sendo feitos no intuito de se relacionar a variabilidade genotípica do HIV com suas propriedades biológicas. Entre as diferenças encontradas, está o uso quase exclusivo do receptor CXCR4 pelos vírus do subtipo D e contrariamente, a rara utilização deste correceptor pelas cepas do subtipo C, assim como o tropismo deste subtipo por células MT-2 (TSHERNING et al., 1998). Associado a utilização preferencial pelo CXCR4, um estudo demonstrou um aumento da taxa de declínio do número de células T CD4+ em indivíduos infectados com o subtipo D em comparação com o subtipo A (KALEEBU et al., 2001). Também tem sido descrito que os vírus do subtipo E são mais virulentos que os demais e que apresentam maior capacidade replicativa junto com o subtipo C em células de Langerhans comparados com o subtipo B (SOTO-RAMIREZ et al., 1996). Outros estudos mostram uma progressão para doença mais lenta em indivíduos infectados com vírus do subtipo A (KANKI et al., 1999; KALEEBU et al., 2001) e que pode haver diferenças significativas na carga viral no pico de viremia logo após a infecção em comparações entre os subtipos B e C (RINKE DE WIT et al., 2002) e entre os subtipos B e E (HU et al., 2001). Quanto à transmissibilidade, alguns estudos demonstraram diferenças na eficiência de transmissão perinatal, nos quais os subtipos A e C foram cerca de 4 e 6 vezes mais transmissíveis do que o subtipo D respectivamente (BLACKARD et al., 2001; RENJIFO et al., 2001). Além destas, foram também relatadas diferenças fenotípicas claras entre vírus dos grupos M e O. Por exemplo, enquanto a incorporação da isomerase celular ciclofilina A durante a formação dos vírions é necessária para a replicação de vírus do grupo M do HIV-1 e para o SIV_{CPZ}, não o é para isolados do grupo O (BRAATEN et al., 1996). Além desta diferença, um estudo demonstrou que um subgrupo filogeneticamente distinto de vírus do grupo O é resistente aos inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa enquanto que os vírus do grupo M isolados de pacientes virgens de tratamento são normalmente susceptíveis a estes inibidores (DESCAMPS et al., 1995).

1.9 O Subtipo C do HIV-1

Entre as diversas formas genéticas de HIV, o subtipo C do grupo M é atualmente a mais disseminada mundialmente, contribuindo com cerca de 56% de todas as infecções pelo vírus (ESPARZA; BHAMARAPRAVATI, 2000). Assim, este subtipo tem se tornado um dos principais alvos para o desenvolvimento de vacinas. O subtipo C foi primeiramente detectado na África do Sul e na Etiópia em amostras analisadas retrospectivamente de 1984 e 1986, respectivamente (JOHANSSON et al., 1995; ZACHAROVA et al., 1997) e especula-se que tenha se espalhado pelo sul do continente africano no final dos anos 1980 (DE OLIVEIRA et al., 2001). Atualmente, este subtipo está presente em todos os países do sul da África como África do Sul, Botsuana, Malawi, Zâmbia, Namíbia entre outros e também em alguns países do leste, como Tanzânia, Quênia e Etiópia, com algumas regiões apresentando taxas de prevalência acima de 40% da população adulta (RENJIFO et al., 1998; NEILSON et al., 1999; NOVITSKY et al., 1999; VAN HARMELEN *et al.*, 2001). Além da África, o subtipo C vem aumentando a sua participação no continente asiático, tendo dominado as epidemias da Índia (SHANKARAPPA et al., 2001), China e Israel (RODENBURG et al., 2001) e, na América do Sul, apresenta taxas crescentes no sul do Brasil (SOARES M. et al., 2003). Foi também demonstrado, em algumas destas regiões, o estabelecimento de cepas virais recombinantes envolvendo o subtipo C como variantes A/C na Zâmbia (SALMINEN et al., 1997), recombinantes C/D na Tanzânia (KOULINSKA et al., 2001) e recombinantes C/B na China (YANG et al., 2002) e no Brasil (GUIMARAES et al., 2002; BRINDEIRO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005). Em muitas destas regiões, a epidemia, hoje dominada pelo subtipo C, foi caracterizada previamente pela presença de outro subtipo (GAO et al., 1998; RODENBURG et al., 2001; DE MARTINEZ et al., 2002). Assim, a rápida expansão e predomínio do subtipo C apontam para a hipótese de que os vírus deste subtipo devem apresentar vantagens adaptativas em relação aos vírus dos demais subtipos. Entretanto, provavelmente, a dispersão global do subtipo C é consequência de uma série de fatores virais associados a fatores do hospedeiro e socioeconômicos.

Dada a sua importância no contexto da epidemia mundial de AIDS, diversos estudos envolvendo cepas do subtipo C vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, no intuito de investigar as possíveis diferenças entre esta e as outras formas genéticas de HIV e como estas diferenças poderiam se refletir em alterações na transmissão e patogênese. Existem evidências de que alterações genéticas específicas no promotor LTR do HIV-1 estão associadas a diferentes subtipos. Estudos de seqüências do genoma de espécimens do subtipo C mostraram a presença de um sítio adicional de ligação para o fator transcricional NF- κ B na região LTR (SALMINEN et al., 1996; CARR et al., 1996). Apenas dois sítios de ligação para NF- κ B foram identificados na maioria dos

subtipos, exceto para representantes do subtipo A e CRF AE, nos quais apenas um sítio para NF- κ B é geralmente observado (RODENBURG et al., 2001). Em contraste, quase todos os representantes do subtipo C que foram caracterizados possuíam três sítios de ligação para o NF- κ B (RODENBURG et al., 2001). Com base nesse achado, e em estudos de expressão de gene, os quais demonstraram aumento na atividade transcricional da região LTR de espécimens contendo três sítios para NF- κ B (MONTANO et al., 1997; NAGHAVI et al., 1999), têm sido especulado que a presença do terceiro sítio de ligação para este fator pode ser responsável por um aumento na taxa de transcrição gênica dos vírus do subtipo C e, conseqüentemente, estaria influenciando em uma vantagem replicativa destes vírus (BLACKARD et al., 1999; POLLAKIS et al., 2004). De fato, outros estudos descreveram aumento na transcrição induzida por *tat* e também na taxa de replicação viral relacionados com o sítio adicional de ligação para NF- κ B (MONTANO et al., 1997; JEENINGA et al., 2000; MONTANO et al., 2000). Em um destes estudos, Montano e colaboradores (2000) sugeriram que a aquisição deste sítio pode representar uma vantagem adaptativa em determinadas condições fisiológicas e potencialmente em regiões geográficas onde doenças sexualmente transmissíveis pró-inflamatórias que estimulam a via NF- κ B são prevalentes. De fato, as regiões geográficas dominadas pela epidemia do subtipo C correspondem, na maioria dos casos, a países em desenvolvimento caracterizados pela co-circulação de diversos patógenos humanos. Ainda, associado com a presença deste sítio adicional, foi demonstrado que vírus do subtipo C apresentaram uma resposta aumentada ao fator α de necrose tumoral (TNF- α) levando ao aumento da transcrição viral em relação à isolados do subtipo B contendo dois sítios para NF- κ B (MONTANO et al., 2000). O TNF- α parece desempenhar um papel importante como mediador crítico para expressão gênica do HIV-1 (MATSUYAMA et al., 1991) e provavelmente exerce influência na severidade da doença uma vez que tem sido reportado que pacientes em estágio avançado de AIDS apresentam níveis altos desta citocina (LAHDEVIRTA et al., 1988). Além disso, foi sugerido que TNF- α está relacionado com a transmissão viral, uma vez que, foi observado em altos níveis no fluido cervicovaginal de mulheres infetadas pelo HIV-1, especialmente quando outras doenças sexualmente transmissíveis estavam também presentes (SHA et al., 1997; ANDERSON et al., 1998; PLUMMER, 1998).

Além disso, têm sido relatadas diferenças em algumas propriedades biológicas entre o subtipo C e os demais subtipos, como por exemplo, o uso preferencial do correceptor CCR5 (PEETERS et al., 1999; CECILIA et al., 2000) mesmo em vírus isolados de pacientes em estágio de AIDS (ABEBE et al., 1999; BJORNDAL et al., 1999; MORRIS et al., 2001). Outros estudos têm demonstrado que, assim como o uso do correceptor CXCR4, o tropismo para células de linhagem

MT-2 parece raro entre amostras de subtipo C (TSHERNING et al., 1998). Esses dados sustentam as observações de que variantes indutoras de sincício (IS) não são geralmente encontradas entre indivíduos infectados com o subtipo C (PEETERS et al., 1999). Por outro lado, estudos mais recentes demonstraram a capacidade de alguns isolados do subtipo C de utilizar tanto o CCR5 como o CXCR4, assim como a capacidade desses isolados de induzir sincícios (JOHNSTON et al., 2003; CILLIERS et al., 2003). Ainda assim, um estudo molecular com base na região V3 da gp120 mostrou que, comparando-se com os outros subtipos, esta região genômica tende a ser mais conservada e a ter menores cargas nos vírus do subtipo C, o que é consistente com o fenótipo R5/NIS (GASCHEN et al., 1999; POLLAKIS et al., 2004).

Contradizendo os dados obtidos com os estudos do promotor LTR, diversos trabalhos recentes indicam que independentemente da etnicidade humana da célula hospedeira, isolados do subtipo C do HIV-1 possuem eficiência de replicação relativa (referido como “fitness” viral) significativamente menor (de 10 a 100 vezes) do que qualquer outro isolado do grupo M (BALL et al., 2003; POLLAKIS et al., 2004; ARIEN et al., 2005; MAROZSAN et al., 2005) tanto em PBMCs, como em linfócitos T CD4+ e em macrófagos. Por outro lado, como já foi mencionado, isolados do subtipos C demonstraram maior capacidade replicativa (SOTO-RAMIREZ et al., 1996) ou, pelo menos, valores de “fitness” semelhantes aos apresentados por isolados do subtipo B (BALL et al., 2003) em células de Langerhans. O “fitness” de um organismo é definido por sua capacidade replicativa em um dado ambiente (DOMINGO; HOLLAND, 1997). Quando o tamanho, a densidade e as taxas reprodutivas de uma população hospedeira são limitados, um parasita mais bem adaptado (com maior “fitness”) deve ser aquele que apresente virulência reduzida para assegurar a sobrevivência do seu hospedeiro e, conseqüentemente, a sua própria (ARIEN et al., 2005). Um método para medir o “fitness” viral relativo *ex vivo* que tem sido utilizado em vários estudos envolve competição entre duas ou mais linhagens virais em uma cultura de células, no qual o vírus com o maior “fitness” relativo seria aquele em maior abundância no final do experimento (NOVELLA et al., 1995; DOMINGO; HOLLAND, 1997; BALL et al., 2003; ARIEN et al., 2005; MAROZSAN et al., 2005). Diversos estudos mostram que mutações relacionadas com resistência a drogas reduzem a eficiência de replicação do HIV (HARRIGAN et al., 1998) e que o “fitness” *ex vivo* do HIV está diretamente relacionado com a taxa de progressão para doença (QUINONES-MATEU et al., 2000). Análises detalhadas das diversas etapas do ciclo de vida dos vírus durante os vários ensaios de competição entre isolados de HIV indicaram que o “vencedor” é geralmente determinado dentro de 8 a 24 horas após a exposição das células com os isolados e, portanto, sugerem que a competição entre pares de HIV-1 ocorre ao nível da eficiência de entrada na célula tendo as outras etapas do ciclo (transcrição reversa, integração e transcrição do RNAm viral) impactos menores no “fitness” dos isolados (BALL et al., 2003). Além disso, Marozsan e colaboradores (2005) argumentam que os estudos indicando um aumento na taxa replicativa de vírus do subtipo C relacionado com a LTR viral foram realizados através da inserção do fragmento LTR desses vírus em um esqueleto viral do subtipo B (MONTANO et al., 1997; NAGHAVI et al., 1999; JEENINGA et al., 2000; MONTANO et al., 2000) e que assim, diferentes LTRs não são suficientes para determinar diferenças no “fitness” viral (MAROZSAN et al., 2005).

Entretanto, a relação entre o “fitness” *ex vivo* do HIV e a distribuição dos isolados na população humana é definitivamente mais complexa do que a simples correlação direta entre o fitness do vírus e a taxa de progressão para doença. O “fitness” *in vivo* de um vírus dentro da população humana é provavelmente relacionado tanto com a

eficiência como com a oportunidade de transmissão. Oportunidade é mais um fator do comportamento humano enquanto a eficiência pode ser afetada por atributos virais (ARIEN et al., 2005).

O fato de isolados virais apresentarem diferentes eficiências de entrada a depender do tipo celular suporta a idéia de que a eficiência de entrada, fator determinante da eficiência replicativa, dos diferentes subtipos virais é modulada pela interação entre suas diferentes gp120 e os receptores presentes nas membranas celulares e que esta interação pode ser diferencialmente modulada em diferentes tipos de células. Por que um subtipo dominante possuiria um gene *env* que medeia uma entrada com baixa eficiência não está claro, mas, um fato interessante é que o gene *env* do subtipo C está retido em quase todas as CRF que envolvem este subtipo, isoladas em diferentes partes do mundo (PEETERS, 2000). Por exemplo, é encontrado na CRF07_BC e CRF08_BC da Índia, e na CRF10_CD da Tanzânia (KOULINSKA et al., 2001; YANG et al., 2002). Uma hipótese que tem sido sugerida a partir destes dados é que o subtipo C pode apresentar uma vantagem na capacidade de transmissão através de uma infecção eficiente nas células de Langerhans (BALL et al., 2003; ARIEN et al., 2005), mas que, seguindo-se à infecção inicial, teria uma capacidade replicativa diminuída nos linfócitos T CD4+ e assim levaria à uma progressão para doença mais lenta (BALL et al., 2003), o que corresponde à maior sobrevivência do hospedeiro humano e assim mais tempo para transmissão (BALL et al., 2003; QUINONES-MATEU et al., 2000). Dentro deste contexto, a seleção de cepas com menores cargas elétricas na alça V3 poderia estar representando a seleção de variantes virais com menor capacidade replicativa em linfócitos T CD4+ mas que apresentam maior probabilidade de serem transmitidas (POLLAKIS et al., 2004).

Outras características peculiares dos vírus do subtipo C que têm sido correlacionadas com a maior disseminação desta em comparação com as demais formas genéticas do HIV são: cargas virais mais elevadas em determinados compartimentos, o que pode estar relacionado com o maior nível de transmissão deste subtipo (JOHN et al., 1998); associado à isto foi relatado um aparente aumento na transmissão *in útero* de vírus do subtipo C (ZIJENAH et al., 1998); uma enzima protease com maior atividade catalítica em comparação com os demais subtipos (VELAZQUEZ-CAMPOY et al., 2001); uma inserção de 5 aminoácidos no domínio transmembrana da proteína Vpu (McCORMICK-DAVIS et al., 2000); e uma proteína Rev prematuramente truncada (GAO et al., 1998; RODENBURG et al., 2001).

1.10 O Subtipo C no Brasil

Devido à grande extensão do território brasileiro, têm sido identificadas diferenças no padrão de distribuição dos subtipos entre as regiões geográficas. Na região Norte, foram observadas proporções equivalentes dos subtipos B e F (VICENTE et al., 2000) enquanto na região Sudeste o subtipo B predomina (aproximadamente 85%), seguido pelo subtipo F (cerca de 10% a 15%) (MORGADO et al., 1998a, 2002; TANURI et al., 1999) além de registros de casos isolados de subtipo C (DUMANS et al., 2002; TURCHI et al., 2002; COUTO-FERNANDEZ et al., 2005). Nas regiões Nordeste (COUTO-FERNANDEZ et al., 1999; GADELHA et al., 2003) e Centro-Oeste (STEFANI et al., 2000), foi observada uma clara predominância do subtipo B (acima de 90%), com limitados casos dos subtipos F e C respectivamente. Entretanto, estudos recentes da epidemiologia molecular da região Sul do país, têm demonstrado um padrão de distribuição dos subtipos de HIV-1 contrastante com aquele verificado para as outras regiões geográficas do Brasil, os quais relatam a diminuição da prevalência do subtipo B (cerca de 50% a 60%) acompanhada do aumento de subtipos não-B, particularmente do subtipo C, que apresenta frequência de cerca de 30%, bem como de subtipos recombinantes (BRINDEIRO et al., 2003). Considerando-se isoladamente o estado do Rio Grande do Sul, o contraste é ainda maior e a prevalência encontrada para o subtipo C é de cerca de 45% a 58% (SOARES M. et al., 2003), ou seja, as prevalências dos subtipos B e C vêm igualando-se nesta região do Brasil.

Estima-se que o subtipo C tenha sido introduzido no Brasil por volta de 1990 (SALEMI et al., 2005). Este subtipo foi primeiramente detectado em amostras de indivíduos infectados pelo HIV-1 oriundas das cidades de São Paulo e Porto Alegre obtidas entre 1991 e 1992. Soares M. e colaboradores (2003), com base no estudo de seqüências da polimerase, sugeriram que a entrada do subtipo C no país ocorreu através de uma única linhagem viral. Desde então o número de casos envolvendo este subtipo vem aumentando, principalmente na região sul aonde as taxas de prevalência são crescentes. Entretanto, estudos envolvendo a caracterização de cepas do subtipo C circulantes no Brasil são escassos e limitados principalmente à região sul do genoma viral. Até agora, nenhum estudo envolvendo caracterização biológica de isolados brasileiros do subtipo C foi realizado.

1.11 Racional

A grande variabilidade genética do HIV-1 levando à uma intensa diversidade de

comportamentos biológicos dos isolados virais se constitui como o principal obstáculo para a eficiência do funcionamento do sistema imune do hospedeiro bem como para o desenvolvimento de vacinas e terapias universais. Infelizmente, até o momento, não está claro como alterações genéticas virais se traduzem em alterações comportamentais, mas provavelmente, através desta busca, muitas respostas a respeito da patogenia da infecção pelo HIV poderão ser alcançadas. Dentro deste contexto, o isolamento de vírus com diferentes genótipos pode contribuir para estudos futuros a respeito do funcionamento biológico do vírus além de representar matéria-prima para testes de vacinas e terapias e para uma variedade de tópicos ainda não endereçados. Estudos de caracterização biológica de isolados de HIV-1 podem se constituir como ferramenta importante para a identificação de respostas imune subtipo-específicas e para a adoção de métodos terapêuticos adequados. Por exemplo, a classificação do fenótipo viral é importante para o prognóstico de progressão para

doença, para a avaliação de drogas antivirais, e para estudos de transmissão (TERSMETTE et al., 1989; KOOT et al., 1993; KARLSSON et al., 1994). A mudança de um fenótipo R5/NIS para um fenótipo X4/IS tem sido descrita como um marcador de doença em indivíduos infectados pelo HIV-1 (GLUSHAKOVA et al., 1998). Entretanto, a maioria destes estudos envolveu isolados do subtipo B e assim não está esclarecido até que ponto características biológicas tem o mesmo valor prognóstico em pacientes infectados com subtipos não-B. Somando-se à estes obstáculos, os padrões diferenciados de disseminação geográfica dos diversos subtipos, pode-se notar a relevância do estudo molecular e biológico do HIV-1 para o melhor entendimento a respeito de suas propriedades, como transmissibilidade, infectividade, velocidade de progressão para a AIDS, além da geração de conhecimento que contribua para apoiar a escolha adequada de futuros produtos vacinais anti-HIV/AIDS.

Estudos recentes de caracterização molecular do HIV-1

demonstraram que a epidemia no Brasil vem sofrendo mudanças no padrão de distribuição geográfica dos subtipos, com o subtipo C assumindo taxas de prevalência cada vez maiores, principalmente na região Sul, onde varia entre 25% e 45% nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente (BRINDEIRO et al., 2003). Apesar de sua recente expansão no Brasil, as altas taxas de prevalência do subtipo C do no sul do país fazem com que a população desta região, com epidemiologia molecular peculiar, se torne um importante alvo para o programa de vacinas do Ministério da Saúde. A região Sul é responsável por aproximadamente 20% das infecções do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) e a cidade de Porto Alegre apresenta o maior número de infecções pelo subtipo C do país, com cerca de 45% de prevalência (BRINDEIRO et al., 2003). Esta cidade é o principal sítio no Brasil, e talvez um dos poucos no mundo, onde um grande número de indivíduos infectados pelo subtipo C do HIV-1 é tratado e acompanhado (SOARES E. et al., 2003). No entanto, o número de estudos envolvendo o subtipo C é ainda muito limitado

quando se considera este perfil epidemiológico atual. Até o momento, esforços envolvendo a geração de seqüências brasileiras do subtipo C se basearam principalmente no gene da polimerase (BRINDEIRO et al., 2003; SOARES M. et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005). Levando-se em conta a importância do subtipo C na epidemia mundial de AIDS, e ainda, seu papel cada vez mais notório na epidemia do Brasil, tornam-se de extrema relevância estudos mais detalhados a respeito das propriedades biológicas e moleculares deste subtipo, para elucidar se este realmente difere dos demais subtipos do grupo M.

Além disso, o aumento na participação de diferentes subtipos de HIV-1 na epidemia de AIDS do país aumenta a probabilidade de ocorrência de co-infecção com vírus geneticamente diversos e assim contribui de forma significativa para o surgimento de vírus recombinantes que podem eventualmente ser resistentes às terapias atualmente no mercado e/ou escapar aos testes sorológicos para a detecção do vírus. Os métodos de classificação do subtipo

de HIV-1 que utilizam a caracterização genética de um único fragmento genômico como, por exemplo, a região do envelope viral, não permitem a detecção de genomas mosaicos do HIV e podem, desta forma, estar representando um perfil epidemiológico não totalmente fidedigno. Portanto, a identificação destas variantes virais, através de caracterização molecular de mais de uma região genômica, se torna igualmente importante para a manutenção da vigilância da epidemia no país, bem como para a reavaliação de medidas imunoproláticas e terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais:

- a) Investigar o comportamento biológico e características moleculares de isolados do subtipo C do HIV-1 circulantes no Brasil.

2.2 Específicos:

- a) Determinar os subtipos de HIV-1 em um grupo de indivíduos infectados, acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- b) Investigar a origem e a relação filogenética das amostras com base nas seqüências nucleotídicas dos genes *gag* e *env*.

- c) Realizar a caracterização biológica de isolados contendo seqüências do subtipo C, através da avaliação da capacidade de infectar células de linhagem T CD4+, da capacidade de replicação em macrófagos primários e da utilização dos receptores de quimiocinas, e comparar com o polimorfismo genético viral.
- d) Investigar a ocorrência de vírus recombinantes na população estudada e comparar esta variabilidade genotípica com o comportamento biológico.
- e) Efetuar a identificação de características moleculares nos genes *gag* e *env* de vírus do subtipo C circulantes no Brasil, comparando com seqüências do subtipo C de diversas regiões geográficas do mundo e com seqüências de vírus do subtipo B circulantes no Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras clínicas

Uma amostra de conveniência foi obtida a partir do sangue proveniente de 22 indivíduos infectados pelo HIV-1, atendidos no Serviço da Unidade de Doenças Infecciosas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - POA, com consentimento informado, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) local, e enviadas para o Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP)/CPqGM/FIOCRUZ - Salvador-BA, para processamento. Foram colhidos cerca de 20ml de sangue de cada paciente, coletado por punção venosa a vácuo (Vacuntainer) com EDTA, para isolamento viral, extração do DNA e determinação do subtipo viral através de seqüenciamento dos genes *gag* e *env*.

3.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico – PBMCs

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores normais foram obtidas a partir de bolsas de sangue frustras ou concentrados de células (“buffy coat”) doados pelo

Hemocentro da Bahia – HEMOBA. Durante a triagem dos doadores, o sangue doado foi testado para a presença de HIV-1 (ELISA), HTLV-I/II (ELISA), sífilis (ELISA e VDRL), doença de chagas (ELISA) e hepatites (ELISA). As PBMCs foram purificadas através de centrifugação em gradiente de histopaque (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) e ressuspensas para uma concentração entre $1,5$ a 2×10^6 células/ml, em garrafas plásticas de 25cm^2 (Costar Co, Cambridge, MA, USA) em meio RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT, USA), HEPES (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), penicilina-estreptomicina (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) e $2\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em cultura em estufa úmida a 37°C , 5% de CO_2 durante 2 dias para a ativação inespecífica dos linfócitos. Após este período as células foram então lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS – “Phosphate Buffered Saline”) e adicionadas a novo meio de cultura RPMI (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT, USA), HEPES (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), penicilina-estreptomicina (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) e 5U/ml de IL-2 recombinante (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), incubando-se a 5% de CO_2 e 37°C . Durante a separação das PBMC dos pacientes HIV-1⁺, obtidas pelo mesmo método, foram também coletadas frações importantes do sangue tais como plasma e células criopreservadas.

3.3 Isolamento e expansão viral

O isolamento viral foi realizado de acordo com o método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO guideline 1994). Cerca de 2×10^6 PBMCs de cada paciente foram co-cultivadas com 8×10^6 PBMCs de 2 doadores normais, previamente estimuladas com PHA (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) (PHA-PBMC) em garrafas plásticas de 25cm^2 (Costar Co, Cambridge, MA, USA) em meio RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT, USA), HEPES (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA), penicilina-estreptomicina (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) e 5U/ml de IL-2 recombinante (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA). As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C , 5% de CO_2 . A cada sete dias, PHA-PBMCs de doador normal foram adicionadas às culturas. A replicação viral foi avaliada nos sobrenadantes de cultura, a cada sete dias, pela dosagem de antígeno p24 (Ag p24) em ensaio imunoenzimático comercial (ELISA; ZeptoMetrix Corporation, NY, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os sobrenadantes positivos foram aliqüotados e estocados a -70°C .

Para a obtenção de uma maior concentração viral, 10^7 PHA-PBMCs de doadores normais foram infectados com 1ml de cada sobrenadante positivo de HIV e incubados por 3 horas a 37°C , 5% de CO_2 . Em seguida as células foram ressuspensas em meio de cultura, como descrito anteriormente, e cultivadas em placas de 24 poços,

dispensando-se 2ml (cerca de 1ng/ml de Ag p24) da suspensão celular em cada poço. A cada 7 dias, durante 2 semanas, os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -70°C e as culturas re-alimentadas com 1ml de meio fresco e $0,5 \times 10^6$ de PHA-PBMCs de doador normal. A replicação viral foi avaliada como descrito anteriormente.

3.4 Avaliação da capacidade replicativa em macrófagos humanos primários

Macrófagos humanos derivados de monócitos foram obtidos por aderência em plástico, a partir de PBMC de doador normal. Três a 4×10^6 PBMCs foram dispensadas em poços de placas de 24 poços (Falcon) em 1ml de meio RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT, USA) sem soro e incubadas durante 60 minutos a 37°C e 5% de CO₂. A seguir, as células foram lavadas vigorosamente por 4 vezes com PBS à 37°C. As células em suspensão foram desprezadas, e os monócitos aderentes foram mantidos em cultura com meio RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT, USA), HEPES e penicilina-estreptomicina, durante 6 a 7 dias para diferenciação em macrófagos. A pureza da população de macrófagos foi avaliada pela medida do número de células positivas para o marcador CD16. Para isto, as células aderentes foram destacadas e incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD3 (Caltag, Burlingame, CA) e anti-CD16 (SouthernBiotech, Birmingham, AL) marcados com fluoresceína isotiocianato (FITC) e flicocitina (PE) respectivamente. A pureza de macrófagos nas culturas, avaliada por citometria de fluxo em aparelho EPICS ALTRA (Beckman Coulter, Hialeah, FL), foi superior a 90%. Para verificar a capacidade dos isolados virais em replicar em macrófagos humanos, estas células foram expostas aos sobrenadantes positivos para HIV-1 (5 a 10ng/ml de Ag p24), nas placas de 24 poços durante 8 a 12 horas, num volume final de 500µl a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com RPMI ou PBS a 37°C para remoção do vírus residual, e mantidas em meio como descrito. Sobrenadantes de cada poço foram coletados a cada 7 dias, durante 3 a 4 semanas e estocados a -70°C para posterior análise da replicação viral. Os isolados Ba-L (trópico para CCR5) e III-B (trópico para CXCR4) (doações de Michael A. Norcross (CBER/FDA, Bethesda, MDO) e de Eva Maria Fenyö (Universidade de Lund, Suécia), respectivamente) foram utilizados como controles positivo e negativo para o crescimento viral, respectivamente. A replicação viral foi medida nos sobrenadantes de cultura pela detecção dos níveis de Ag p24 através de teste imunoenzimático comercial (ELISA; ZeptoMetrix Corporation, NY, USA) de acordo com instruções do fabricante. Os vírus foram testados em células de pelo menos 3 doadores diferentes.

3.5 Avaliação da capacidade replicativa em células de linhagem T CD4+

Células de linhagem T CD4⁺ MT-2, SUPT-1 e PM-1 foram mantidas com RPMI 1640 (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT, USA), HEPES (Sigma) e penicilina-estreptomicina (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi renovado 2 a 3 vezes por semana. Com o objetivo de analisar se os isolados virais eram formadores ou não de sincícios nas células MT-2, SUPT-1 e PM-1, as mesmas foram expostas aos sobrenadantes positivos para HIV-1. 5×10^4 células foram dispensadas em cada poço de placas de 96 poços (Falcon), observando-se um volume final de 200µl/poço e uma concentração entre 5 a 10ng/ml de Ag p24. A formação de sincícios foi examinada por observação microscópica, após 2 a 3 dias de infecção. Os isolados Ba-L e III-B (não indutor de sincícios e indutor de sincícios respectivamente) foram

utilizados como vírus-controle para a formação ou não de sincícios. Cada isolado foi testado em triplicata em três ensaios distintos. As células MT-2 e SUPT-1 expressam nas suas membranas celulares a molécula CXCR4, mas não expressam a molécula CCR5, enquanto as células PM-1 são positivas para ambos os receptores. Assim, os dois primeiros tipos celulares são permissivos apenas à infecção por vírus trópicos para CXCR4 enquanto as células PM-1 podem ser infectadas por vírus trópicos para qualquer dos dois receptores.

3.6 Análise da utilização do receptor de quimiocina

As células astrocíticas de mega-glioblastoma U87MG, transfectadas para a expressão de CD4 e de um dos receptores de alfa e beta-quimiocinas simultaneamente (U87-CD4-CXCR4 ou U87-CD4-CCR5, respectivamente) foram cultivadas com meio Dulbecco's (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina-estreptomicina em garrafas plásticas de 25cm², a 37°C e 5% de CO₂. As células positivas apenas para a expressão de CD4 foram tratadas com o antibiótico de seleção geneticina (G418) e aquelas positivas para a expressão simultânea de CD4 e receptor de quimiocina foram tratadas adicionalmente com o antibiótico de seleção puromicina. Duas a três vezes por semana, de acordo com o crescimento celular, 50% das células eram congeladas e estocadas à -70°C e as demais, realimentadas com meio fresco como descrito. Para investigar o tropismo dos isolados virais para os receptores de quimiocinas, estas células foram removidas através do contato das garrafas com gelo, seguido de remoção mecânica, sendo então transferidas para placas de 96 poços (Falcon) numa concentração de 2x10⁴ células em 200µl de meio por poço e mantidas em repouso durante 12 horas. Em seguida, os sobrenadantes positivos para HIV-1 foram adicionados às células (10ng/ml de Ag p24). Após 8 a 12 horas as células foram lavadas com PBS à 37°C para a remoção do vírus residual, e realimentadas com meio fresco como descrito. O uso dos correceptores foi identificado após 7 a 10 dias de infecção, através de observação microscópica do efeito citopático. Os isolados Ba-L (trópico para CCR5) e III-B (trópico para CXCR4) foram utilizados como vírus-controle. Cada isolado foi testado em triplicata em três ensaios distintos.

3.7 Extração de DNA genômico

A extração do DNA das PBMCs foi realizada através do método de extração da Qiagen (QIAamp DNA minikit, Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Alemanha) conforme instruções do fabricante. Em resumo, esse método de extração do DNA envolve primeiramente a lise das membranas celulares através de centrifugação em tampão apropriado e a adsorção das moléculas de DNA através de uma coluna contendo membrana de sílica-gel com propriedades seletivas. As condições de salinidade e pH no lisado asseguram que moléculas de proteína e outros contaminantes e impurezas, que podem inibir a reação em cadeia da polimerase (PCR), não fiquem retidas na membrana da coluna.

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação de fragmentos dos genes *gag* e *env* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações foram realizadas em duas etapas (PCR “nested”). Para a região *gag*, foram utilizados os inicializadores H1G777 (5'-TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG-3') e H1P202 (5'-CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT-3') na primeira etapa e H1Gag1584 (5'-AAAGATGGATAATCCTGGG-3') e G17 (5'-TCCACATTTCCAACAGCCCTTTT-3') na segunda etapa (HEYNDRIKX et al., 2000), resultando na amplificação de um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb) que compreende a porção final da proteína p24 e a porção inicial da proteína p7 (Figura 3.8.1). Os inicializadores da primeira etapa na PCR *env* foram os ED5 (5'-ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG-3') e ED12 (5'-AGTGCCTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG-3') que amplificam 1200 pb da região V1-V5 do envelope do HIV-1. Para a segunda etapa, foram utilizados os inicializadores ED31 (5'-CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG-3') e ED33 (5'-TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC-3') que amplificam cerca de 550 pb da C2-C3 e alternativamente, para aquelas amostras que não puderam ser amplificadas com ED31/ED33, foram utilizados os inicializadores ES7 (5'-TGTA AACGACGGCCAGTCTGT TAAATGGCAGTCTAGC-3') e ES8 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCCACTTCTCCAATTGTCCCTCA-3') que amplificam cerca de 700 pb da região V3-V5 (DELWART et al., 1993) (Figura 3.8.1). Cada reação foi realizada num volume de 50µl contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 10 mM de cada deoxinucleosídeo-trifosfato (dNTPs) (Promega, Madison, WI, USA), 10 pmol de cada inicializador, 62,5 mM MgCl₂ e 2,5 U de Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA). O volume de DNA utilizado foi estabelecido de acordo com a concentração de cada amostra, de forma a utilizar-se cerca de 1µg na primeira etapa da reação. Para a segunda etapa, foram utilizados de 2 a 5µl do produto da primeira etapa da reação. Foram utilizados, na primeira e na segunda fase da PCR, um tubo como controle negativo para verificar o aparecimento de possíveis contaminações e um tubo como controle positivo contendo DNA extraído a partir de células tumorais PM-1 cronicamente infectadas com o vírus de laboratório Ba-L. As reações foram realizadas no termociclador Perkin-Elmer 9600 e consistiram, para *gag*, de um ciclo de 94°C (2min), seguido de 35 ciclos de 94°C (30seg), 50°C (30seg), 72°C (90seg), com 7 minutos de extensão a 72°C no último ciclo e para *env* de três ciclos de 94°C (1min), 55°C (1min), 72°C (1min), seguido de 32 ciclos de 94°C (15seg), 55°C (45seg), 72°C (1min), com 10 min. de extensão a 72°C no último ciclo. Para verificar o sucesso da amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE e corado com brometo de etídio.

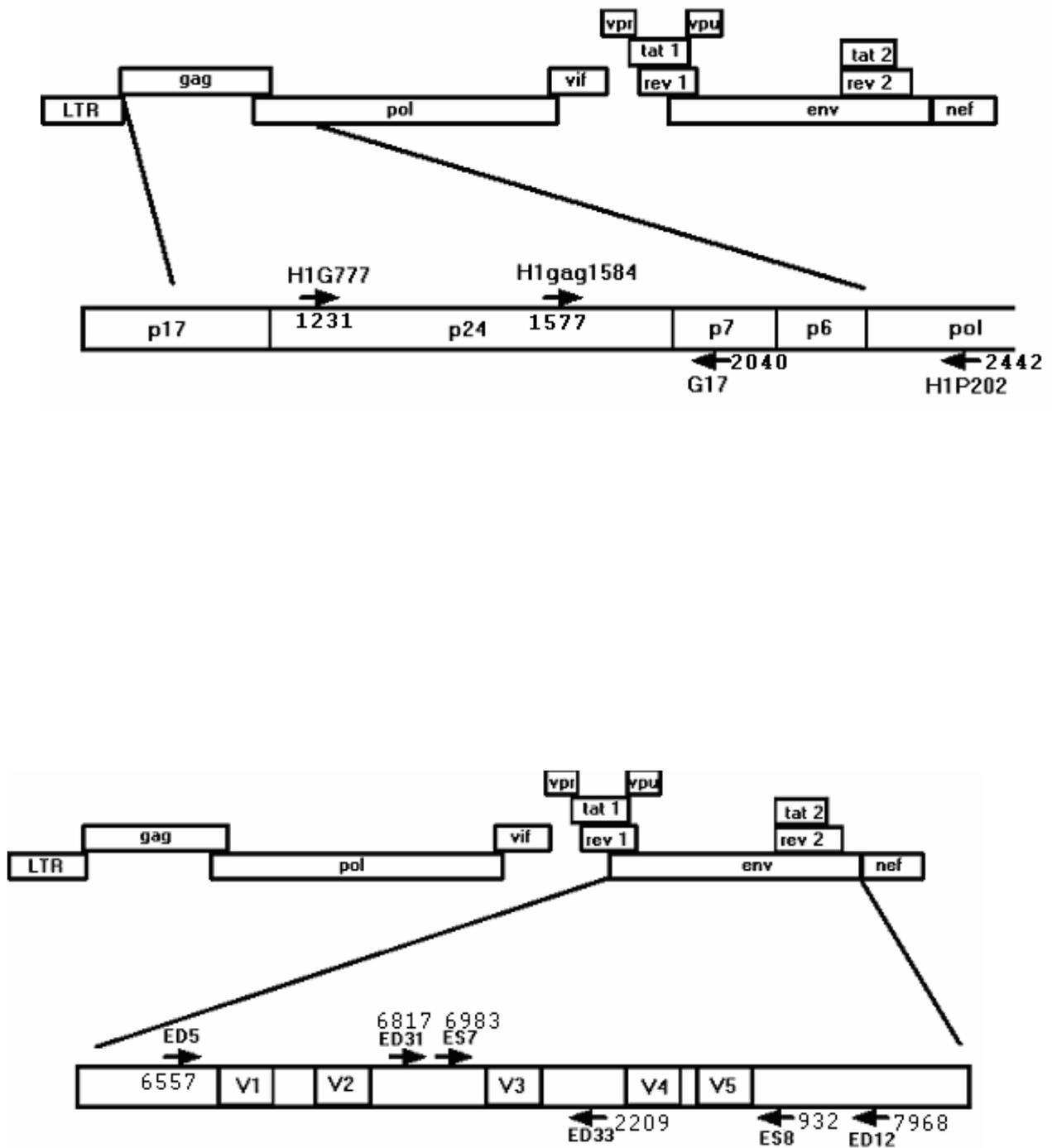


Figura 3.8.1: Esquema dos fragmentos dos genes *gag* e *env* amplificados na PCR.

3.9 Purificação e Sequenciamento

Os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando-se o kit de purificação da Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, o sistema de purificação é feito através de uma coluna contendo membrana de sílica-gel com propriedades seletivas, as quais promovem a adsorção das moléculas de DNA e a remoção de contaminantes e

impurezas. Para verificar o sucesso da purificação e a quantificação do produto amplificado, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE e corados com brometo de etídio. Após a purificação, estes fragmentos foram submetidos à reação de sequenciamento no termociclador Perkin-Elmer 9600, utilizando-se o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA), que consta de dNTPs, além de dideoxynucleosídeos-trifosfato (ddNTP) marcados com fluorescência de diferentes padrões de cor e da enzima Taq polimerase. Foram utilizados os mesmos inicializadores da segunda etapa da PCR (H1Gag1584/G17 para *gag* e ED31/ED33 ou ES7/ES8 para *env*). Duas reações foram realizadas para cada amostra, cada uma contendo 1 µl (5 pmoles/µl) de um dos inicializadores, 2 µl de BigDye, 3 µl do tampão do kit (80 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂), 3 µl da amostra purificada (50 a 100ng/µl) e 11 µl de água destilada. A termociclagem consistiu de 25 ciclos de 96°C (10seg), 50°C (5seg), e 60°C (4min). Os produtos foram precipitados com etanol (70%) e posteriormente desnaturados a 96°C por 2 minutos, sendo então, sequenciados no sequenciador automático Perkin-Elmer/ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Análises Filogenéticas

3.10.1 Determinação do subtipo das amostras

As seqüências geradas foram submetidas à análise filogenética para a determinação do subtipo de HIV-1. Uma seqüência consenso de cada amostra foi obtida, através do alinhamento das duas seqüências complementares geradas, através do software DNASTAR (BURLAND, 2000) e manualmente editada de acordo com os seus eletroferogramas. Estas seqüências consenso foram alinhadas junto com amostras de referência de todos os subtipos e principais formas recombinantes do grupo M do HIV-1 obtidas no banco de dados de Los Alamos (PEETERS, 2000; <http://hiv-web.lanl.gov>) utilizando-se o programa CLUSTAL-X (THOMPSON et al., 1997). Seqüências genômicas do vírus da imunodeficiência símia (CIVCG) foram utilizadas como grupo externo. O alinhamento gerado foi manualmente editado utilizando o programa GENEDOC (NICHOLAS et al., 1997). As inferências filogenéticas foram realizadas pelos métodos “neighbor-joining” (NJ) e máxima verossimilhança (“Maximum Likelihood”-ML), utilizando-se como modelo de substituição de nucleotídeos o GTR + proporção de sítios invariáveis (I) + distribuição gama (G) para *gag* e o TVM+I+G para *env* implementados no programa PAUP* versão 4.02a (SWOFFORD, 1999). A sustentação dos agrupamentos nas árvores foi determinada através do cálculo de “bootstrap” baseado em 1000 reamostragens. As árvores foram visualizadas utilizando-se o programa TreeView (PAGE, 1996). Os resultados de subtipo das amostras foram confirmados utilizando-se a ferramenta de subtipagem “on line” REGA HIV-1 (<http://lasp.cpqgm.fiocruz.br/subtypetool/html/subtyping.html>) (DE OLIVEIRA et al., 2005). As seqüências geradas neste trabalho foram enviadas ao banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) onde foram registradas sob os números de acesso DQ358756 a DQ358798 e DQ394366.

3.10.2 Análise intra-subtipo C

Posteriormente, foi realizada uma análise das relações filogenéticas intra-subtipo C através da montagem de um banco de dados formado exclusivamente por amostras do subtipo C, incluindo as seqüências obtidas neste estudo, além de seqüências previamente caracterizadas do Brasil e de diversos países da Ásia e da África como Índia, China, Israel, Tanzânia, Zâmbia,

Etiópia, África do Sul, Quênia, Botsuana e Malawi (GAO et al., 1996a; BLACKARD et al., 1999; NEILSON et al., 1999; NOVITSKY et al., 1999; RODENBURG et al., 2001; VAN HARMELEN et al., 2001; SANABANI et al., 2006). Sequências do grupo O do HIV-1 foram utilizadas como grupo externo. As sequências foram alinhadas e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se a mesma metodologia descrita acima, tendo o modelo de substituição de nucleotídeos TVM+I+G sido escolhido tanto para as inferências filogenéticas da região *gag* como para as análises da região *env*.

3.10.3 Determinação da diversidade genética

As distâncias genéticas médias (estimativa do número real de substituições entre táxons) entre as sequências dentro dos diferentes grupos geográficos do subtipo C e de um grupo formado por sequências brasileiras do subtipo B foram calculadas utilizando-se o método de distância Kimura-2-parâmetros (considera frequência igual de bases e que a taxa de transições é diferente da taxa de transversões) (KIMURA, 1980) implementado no programa MEGA versão 2.0 (KUMAR et al., 2001).

3.10.4 Análise das sequências de aminoácidos

As sequências nucleotídicas foram traduzidas em sequências de aminoácidos através do programa GENEDOC (NICHOLAS et al., 1997), e estas foram analisadas no programa BIOEDIT (HALL 1999) quanto a presença de assinaturas e comparadas a sequências consenso mundiais dos subtipos B e C obtidas no banco de dados de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). A presença de sítios com funções biológicas importantes como os de N-glicosilação, de ligação para glicosaminoglicanas, de fosforilação da proteína quinase C (PKC), de fosforilação da caseína quinase II e de amidação foi investigada através da ferramenta Prosite implementada no GENEDOC (NICHOLAS et al., 1997). Sequências consenso de cada grupo geográfico do subtipo C e dos grupos de sequências dos subtipos B e F foram obtidas através do programa BIOEDIT (HALL, 1999).

3.10.5 Análise de recombinação

Amostras que foram classificadas em subtipos diferentes nas duas regiões genômicas tiveram suas sequências *gag* e *env* reunidas em um único arquivo no formato fasta, resultando em um fragmento de cerca de 1000 pb. Este fragmento foi então submetido à análise de recombinação através do método “Bootscanning” implementado no programa SIMPLOT (SALMINEN et al., 1995). Este método consiste na aplicação de técnica de “bootstrap” (reamostragem aleatória) em segmentos consecutivos do genoma [por exemplo, segmentos de 300 pb a cada 20 pb (valor do passo)]. Cada amostra-teste é analisada individualmente através da comparação do grau de relação (expresso como valor de bootstrap) com amostras de referência de todos os subtipos e principais CRFs do grupo M. O resultado é um gráfico onde o eixo X significa posição na sequência, e o eixo Y significa valores de “bootstrap” para cada segmento. Cada ponto significa um novo segmento que é movido pelo valor do passo. Em cada segmento, a amostra de referência mais relacionada com a amostra analisada tem seu valor de “bootstrap” plotado no eixo Y. Paralelamente, uma árvore filogenética foi construída com base no fragmento de 1000 pb formado pela união das sequências *gag* e *env* das 22 amostras e das amostras de referência, utilizando-se a mesma metodologia descrita acima, tendo o modelo de

substituição de nucleotídeos TVM+I+G sido o escolhido. Finalmente para uma caracterização mais detalhada dos vírus recombinantes e com o objetivo de verificar o padrão de recombinação entre os subtipos B e C, os 1000 pb de cada recombinante foram submetidos novamente à análise de “Bootscanning”, utilizando-se seqüências de referencia de todos os subtipos e adicionalmente a seqüência de outro recombinante da amostra. Esse procedimento foi repetido com cada um dos outros recombinantes, de modo que possibilitou analisar comparativamente o grau de relação entre as suas seqüências.

4. RESULTADOS

4.1 Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes

As informações clínicas e epidemiológicas dos 22 indivíduos infectados pelo HIV-1 incluídos neste estudo estão sumarizadas na Tabela 4.1.1. Entre estes indivíduos, 13 (59%) eram homens e 9 (41%) eram mulheres (razão homem/mulher igual a 1,44:1). Entre as diferentes categorias de exposição, o comportamento heterossexual teve a maior representatividade com 68,2% dos casos, enquanto as categorias “homossexual” e “bissexual” corresponderam a 18,2% e 9,1% dos indivíduos respectivamente. Um paciente (4,5%) não informou seu comportamento sexual. Nove indivíduos (41%) relataram ser usuário de drogas injetáveis e doze (54,5%) relataram 3 anos ou menos de escolaridade. A idade média dos pacientes foi 36 anos (desvio padrão igual a 11,8) (variando entre 21 e 70 anos) e a renda mensal mediana dos mesmos foi de R\$400,00 reais (variando de nenhuma a R\$3.750,00). A maioria deles era de raça/cor

branca (77,3%) e apresentava doenças oportunistas e/ou contagem de linfócitos T CD4+ típicos da fase de AIDS (72,7%), de acordo com a classificação do CDC (“Centers of Disease Control and Prevention”) (National Center for Infectious Diseases Division of HIV/AIDS, 1992). Os indivíduos RS021 e RS022 eram irmãos gêmeos e usuários de drogas injetáveis, mas os demais pacientes não tinham relações epidemiológicas conhecidas.

Tabela 4.1.1: Dados clínicos e epidemiológicos dos 22 pacientes infectados pelo HIV-1.

M, masculino; F, feminino; HET, heterossexual; HOM, homossexual; BI, bissexual; UDI, usuário de drogas injetáveis; B, branca; N, negra; ^a, anos de escolaridade; NI, não informado; *, óbito.

Amostra	Sexo	Fator de Risco	Idade (anos)	Raça/ Cor	Grau de instrução ^a	Profissão	Renda mensal (R\$)	Contagem de células CD4/ mm ³	Estágio clínico
RS001	M	HET/UDI	33	B	1-3	Camelô	400,00	NI	AIDS*
RS002	F	HET	70	B	1-3	Aposentada	250,00	63	AIDS*
RS003	M	HET	41	B	5-12	Eletricista	700,00	437	Assintomático
RS004	F	HET	24	B	4-7	Estagiária	400,00	32	AIDS*
RS005	M	BI/UDI	38	B	4-7	Artesão	700,00	NI	Assintomático
RS006	F	HET/UDI	28	N	1-3	Doméstica	400,00	NI	AIDS*
RS007	M	HOM/UDI	41	B	1-3	Pintor	500,00	32	AIDS*
RS008	M	NI	43	B	1-3	Pedreiro	350,00	NI	AIDS
RS009	F	HET	46	B	1-3	Pensionista	350,00	NI	AIDS
RS010	F	HET/UDI	38	N	1-3	Doméstica	200,00	350	Assintomático
RS011	M	HOM/UDI	36	B	1-3	“motoboy”	300,00	NI	AIDS*
RS012	F	HET	53	B	4-7	Secretária	600,00	933	Assintomático
RS013	M	BI	21	B	1-3	Carpinteiro	650,00	NI	AIDS
RS014	M	HET	42	B	1-3	Estudante	nenhuma	213	Assintomático
RS015	M	HET/UDI	23	B	1-3	Pedreiro	600,00	NI	AIDS*
RS016	F	HET	39	N	4-7	Doméstica	450,00	NI	AIDS
RS017	M	HOM	42	B	13-15	Empresário	3.750,00	294	Assintomático
RS018	M	HOM	38	N	8-11	Funcionário público	2.500,00	75	AIDS
RS019	F	HET	23	N	0	Doméstica	300,00	NI	AIDS
RS020	F	HET	29	B	13-15	Estudante	1.500,00	371	Assintomático
RS021	M	HET/UDI	22	B	4-7	Nenhuma	nenhuma	322	AIDS*
RS022	M	HET/UDI	22	B	4-7	Nenhuma	nenhuma	NI	AIDS*

4.2 Identificação dos subtipos de HIV-1

A região C2-V3 do envelope viral do HIV-1 foi amplificada através de PCR a partir do DNA das PBMC de todas as 22 amostras estudadas e utilizada para a classificação dos subtipos genéticos do HIV-1 por meio de análises filogenéticas (Figura 4.2.1). Duas amostras (RS012 e RS015) não puderam ser amplificadas com os inicializadores ED31/ED33, entretanto, foram classificadas com base no fragmento amplificado pelos inicializadores ES7/ES8 na segunda etapa da PCR (Figura 3.8.1). Três diferentes subtipos genéticos foram detectados: 14 amostras (63,6%) foram classificadas como subtipo B, 6 amostras (27,3%) foram classificadas como subtipo C e 2 amostras (9,1%) foram classificadas como subtipo F. O motivo GWGR que caracteriza a variante B” (B brasileiro) não foi encontrada na região V3 entre as seqüências do subtipo B analisadas. Adicionalmente, as amostras foram submetidas a PCR para determinação do subtipo com base no gene *gag*. As análises filogenéticas desta região genômica (Figura 4.2.2) resultaram na classificação de 9 (41%) amostras como subtipo B e 12 (54,5%) amostras como subtipo C. Uma (4,5%) amostra (RS019) não agrupou com nenhuma amostra de referência utilizada, ficando isolada na árvore. Para esta amostra foi realizada uma análise filogenética separada (dados não mostrado) na qual ela agrupou junto com seqüências de referência do subtipo F1, sendo portanto classificada como subtipo F. Além disso, o subtipo desta, bem como o de todas as outras seqüências analisadas foi confirmado através da ferramenta de subtipagem “on line” REGA HIV-1.

A combinação dos resultados das regiões *env* e *gag* mostra que 15 amostras (68%) possuem subtipo concordante em ambas as regiões genômicas: 8 amostras (36,4%) foram classificadas como subtipo B, 6 (27,3%) foram classificadas como subtipo C e 1 amostra (4,5%) foi classificada como subtipo F. Em contraste, 7 amostras (32%) apresentaram subtipo discordante entre as regiões *gag* e *env*, apontando para a existência de possíveis vírus recombinantes, os quais encontram-se sublinhados nas Figuras 4.2.1 e 4.2.2 e na Tabela 4.2.1. As seqüências *gag* e *env* desses vírus mosaicos potenciais foram submetidas à análise de recombinação através do método “Bootscanning” implementado no programa SIMPLOT (SALMINEN et al., 1995). Através desta análise, 6 (27,3%) destes vírus variantes foram classificados como subtipo C em *gag* e como subtipo B em *env*, enquanto o outro vírus (4,5%) foi classificado como subtipo B em *gag* e como subtipo F em *env* (Figura 4.2.3). Adicionalmente, realizamos a análise “Bootscanning” para a amostra RS019 (Figura 4.2.3 (c)) uma vez que esta agrupou em um ramo separado das referências do subtipo F na análise de *gag*. Esta amostra foi mais relacionada com a referência do subtipo F em ambas regiões genômicas, confirmando a sua classificação como subtipo F.

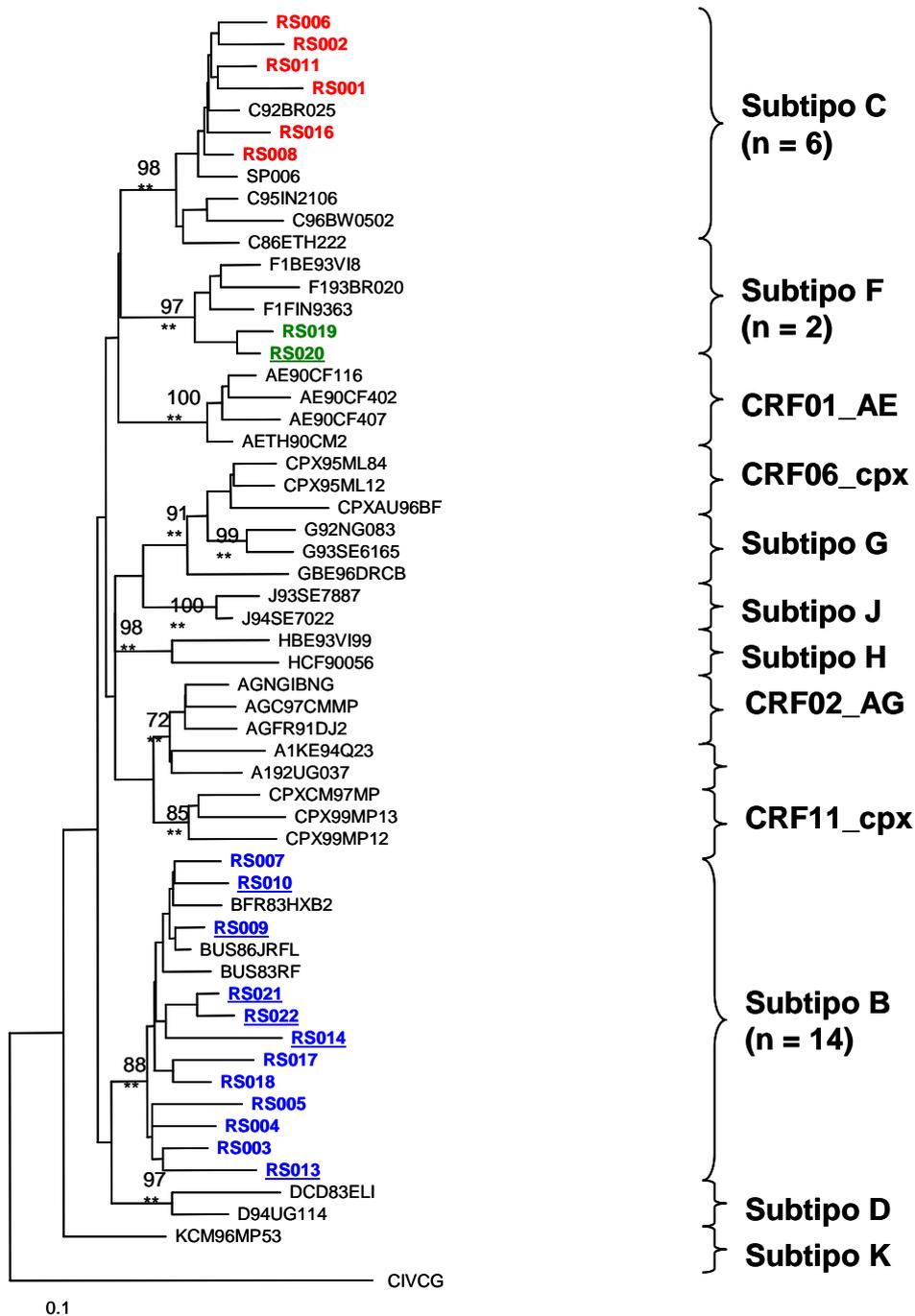


Figura 4.2.1: Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação filogenética das seqüências de *env* das amostras com seqüências de referência de todos os subtipos e CRFs 01, 02, 06 e 11. A seqüência CIVCG do vírus da imunodeficiência símia (SIV) foi usada como grupo externo. Os valores de “bootstrap” para 1000 réplicas estão indicados nos ramos. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de $p < 0,001$. As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: azul = subtipo B, vermelho = subtipo C e verde = subtipo F. As seqüências com subtipo discordante em relação à *gag* estão sublinhadas.

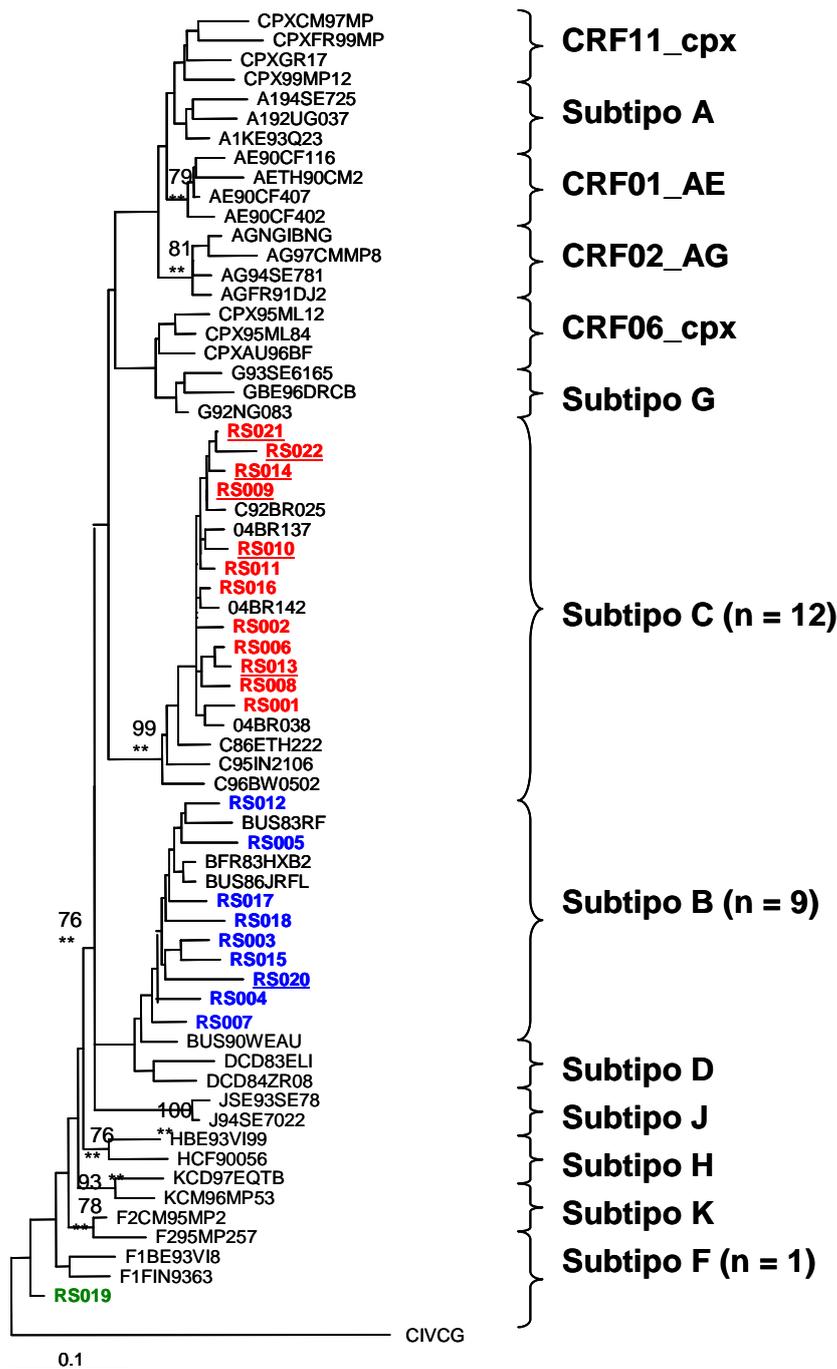


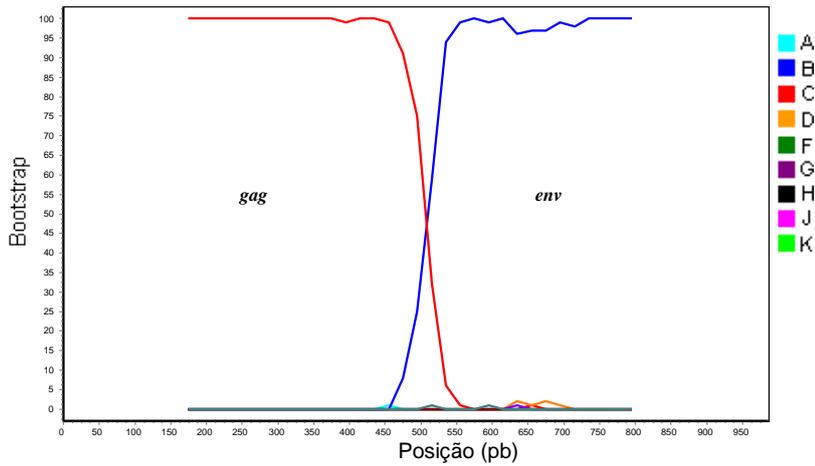
Figura 4.2.2: Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação filogenética das seqüências de *gag* das amostras com seqüências de referência de todos os subtipos e CRFs 01, 02, 06 e 11. A seqüência CIVCG do vírus da imunodeficiência símia (SIV) foi usada como grupo externo. Os valores de “bootstrap” para 1000 réplicas estão indicados nos ramos. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de $p < 0,001$. As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: azul = subtipo B, vermelho = subtipo C e verde = subtipo F. As seqüências com subtipo discordante em relação a *env* estão sublinhadas.

Tabela 4.2.1: Classificação dos subtipos de HIV-1 com base nas regiões genômicas *gag* e *env*.

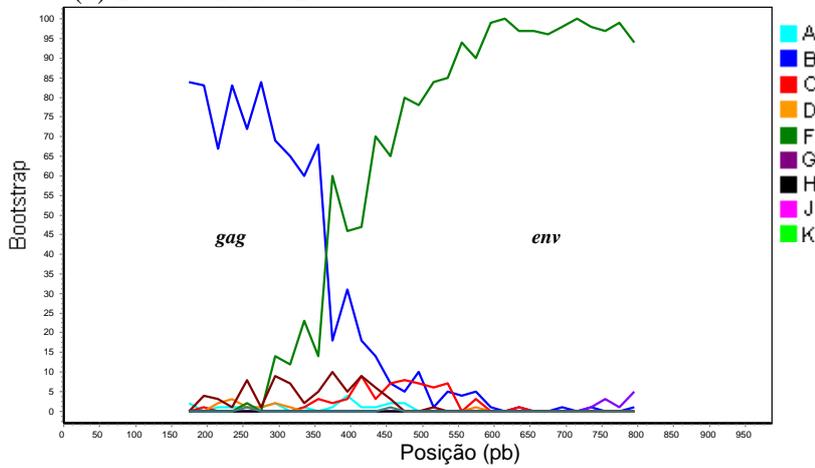
Amostra	Subtipo genético	
	<i>Gag</i>	<i>Env</i>
<i>RS001</i>	C	C
RS002	C	C
RS003	B	B
RS004	B	B
RS005	B	B
RS006	C	C
RS007	B	B
RS008	C	C
<u>RS009</u>	C	B
<u>RS010</u>	C	B
RS011	C	C
RS012	B	B
<u>RS013</u>	C	B
<u>RS014</u>	C	B
RS015	B	B
RS016	C	C
RS017	B	B
RS018	B	B
RS019	F	F
<u>RS020</u>	B	F
<u>RS021</u>	C	B
<u>RS022</u>	C	B

gag, grupo antígeno; *env*, envelope

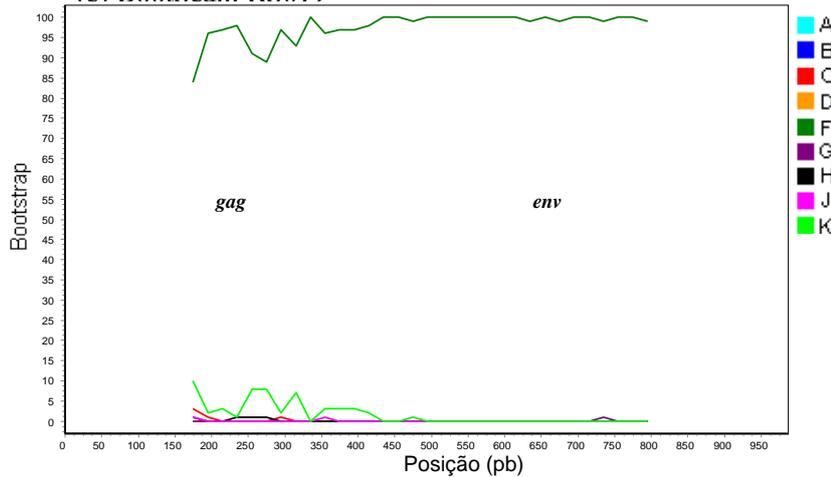
(a) BootScan: RS009



(b) BootScan: RS020



(c) BootScan: RS019



Segmento: 350 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining

Figura 4.2.3: Gráficos gerados através do método “Bootscanning” implementado no programa Simplot (Salminen et al., 1995) com base nos 1000 pb formados pela união das seqüências *gag* e *env* das amostras que agruparam com subtipos divergentes nas árvores filogenéticas. Nesta análise, compara-se a relação da amostra teste com seqüências de cada subtipo.(a) RS009; (b) RS020; (c) RS019. Assim como a

amostra RS009, as amostras RS010, RS013, RS014, RS021 e RS022 (não mostradas) foram mais relacionadas com a sequência de referência do subtipo C em *gag* e com a sequência de referência do subtipo B em *env*, enquanto a amostra RS020 foi mais relacionada com o subtipo B em *gag* e com o subtipo F em *env*. A amostra RS019 foi mais relacionada com a referência do subtipo F em ambas regiões genômicas. Segmento de 350 pares de bases; passo de 20 pb; “bootstrap” com 100 réplicas. As árvores foram construídas com base no método Neighbor-Joining utilizando-se o modelo de distância Kimura 2-parâmetros com taxa de transição/transversão (T/t) igual a 2.0.

4.3 Análise Filogenética Intra-Subtipo C

Com o objetivo de investigar a origem e a história evolutiva molecular dos vírus do subtipo C circulantes no Brasil, árvores filogenéticas foram construídas como base nas seqüências deste subtipo do Brasil (as obtidas neste estudo e outras previamente caracterizadas) e de diferentes regiões geográficas do mundo aonde este subtipo tem prevalência ou representatividade. As análises mostraram que todas as seqüências do subtipo C do Brasil, incluindo as obtidas neste estudo, formam um único grupo monofilético tanto em *env* (Figura 4.3.1) como em *gag* (Figura 4.3.2). Consistentemente com a análise Neighbor-Joining (NJ), todas as seqüências do Brasil também formaram um agrupamento monofilético quando analisadas pelo método da máxima verossimilhança (“Maximum Likelihood” - ML) (Anexos A e B). Em contraste, as seqüências de todos os outros países ficaram amplamente dispersas em múltiplos agrupamentos, inclusive as seqüências da Índia, as quais foram também, recentemente, classificadas como um grupo monofilético do subtipo C do HIV-1 (SHANKARAPPA et al., 2001).

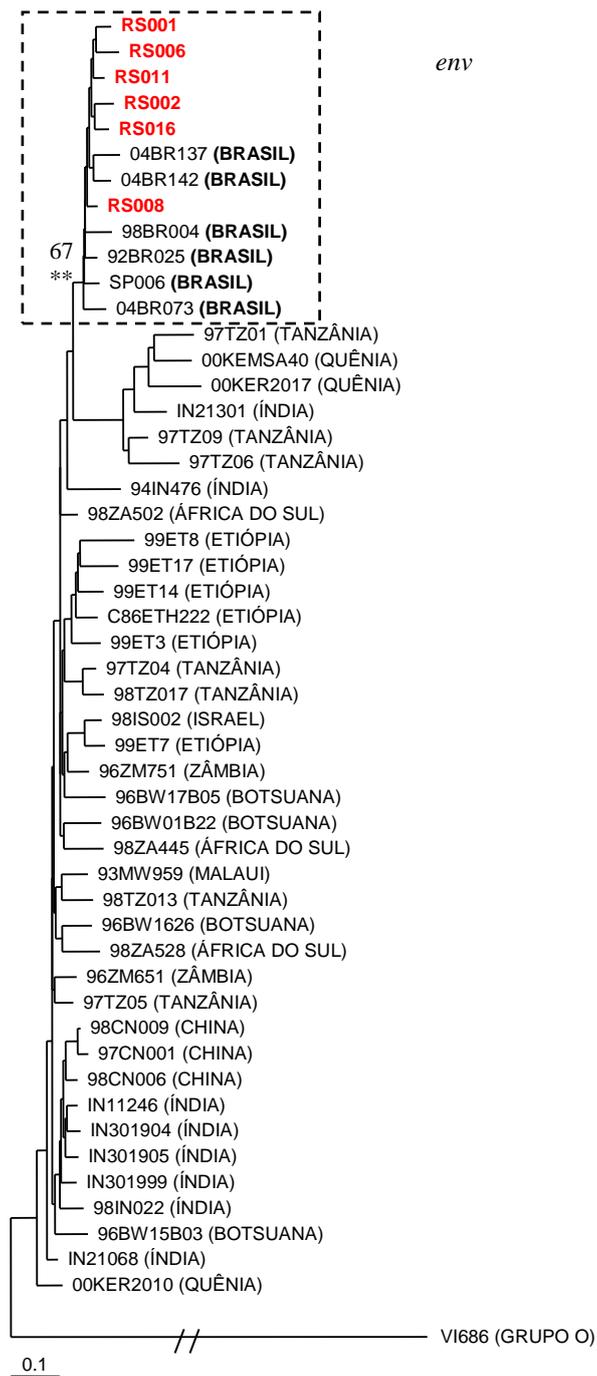
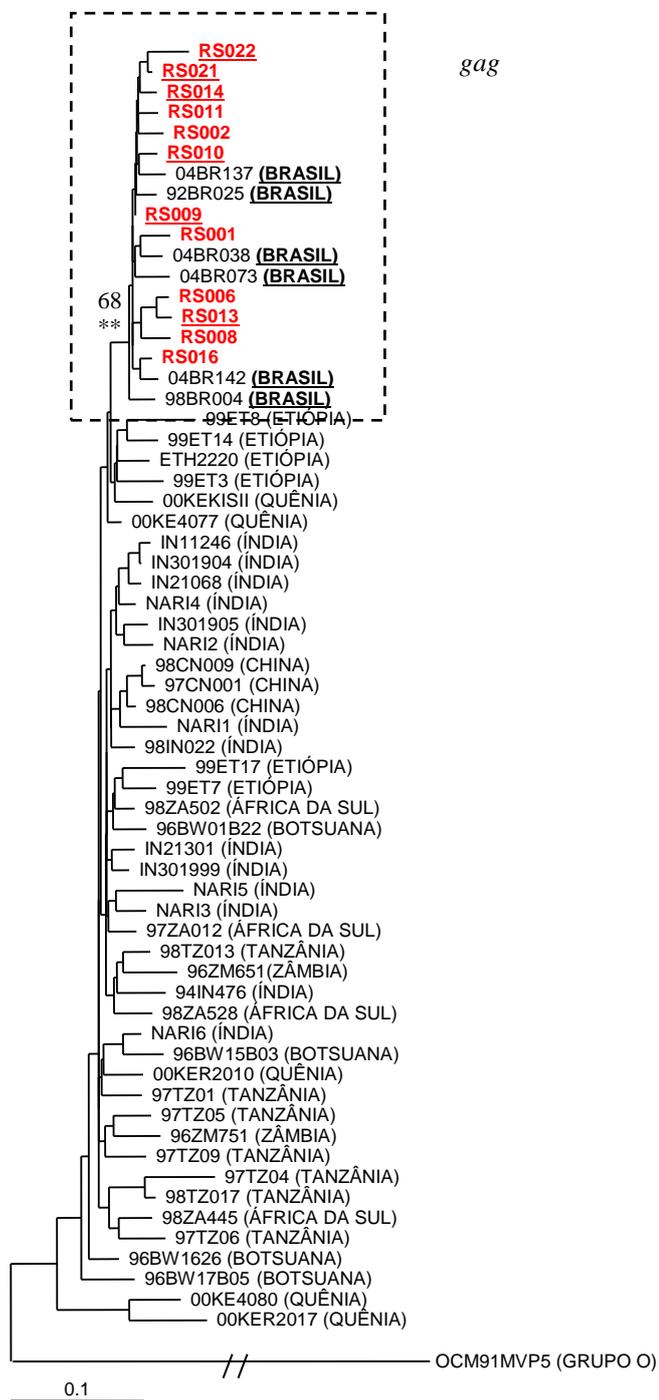


Figura 4.3.1: Análise filogenética Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação dos vírus do Brasil do subtipo C do HIV-1 com isolados do subtipo C de diferentes regiões geográficas com base nas seqüências do envelope. A seqüência VI686 do grupo O do HIV-1 foi utilizada como grupo externo. O valor de “bootstrap” (1000 réplicas) para o agrupamento está indicado. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de $p < 0,001$. As seqüências geradas neste estudo estão representadas em vermelho.



gag

Figura 4.3.2: Análise filogenética Neighbor-Joining (NJ) mostrando a relação dos vírus do Brasil do subtipo C do HIV-1 com isolados do subtipo C de diferentes regiões geográficas com base nas seqüências de *gag*. A seqüência VI686 do grupo O do HIV-1 foi utilizada como grupo externo. As seqüências geradas neste estudo estão representadas em vermelho e aquelas com subtipo discordante em relação à *env* estão sublinhadas.

4.4 Determinação da diversidade genética

Com o objetivo de uma caracterização mais detalhada das relações filogenéticas entre isolados de HIV-1 do subtipo C, os níveis de diversidade viral foram calculados dentro de cada grupo geográfico, com base nas distâncias entre as seqüências nucleotídicas das amostras. Os resultados desta análise estão sumarizados na Tabela 4.4.1. As seqüências brasileiras do subtipo C exibiram o menor nível de divergência intra-regional (distâncias médias de 3,8% e 7,5% em *gag* e em *env*, respectivamente) em ambas as regiões genômicas analisadas quando comparadas com as seqüências do subtipo C de outros países. Além disto, comparando-se as seqüências brasileiras dos subtipos B e C, as seqüências classificadas como subtipo B apresentaram a maior diversidade intra-subtipo tanto em *gag* como em *env* (8% e 14,4% respectivamente).

Tabela 4.4.1: Diversidade genética das seqüências do subtipo C do HIV-1 de diferentes regiões geográficas e das seqüências do Brasil do subtipo B.

País	Subtipo	Distância média % (nº de seqüências) [variação]		
		<i>env</i> (C2-C3)	<i>env</i> V3	<i>Gag</i>
Brasil	C	7,5 (12) [4,7-10,1]	4,7 (12) [1,0-9,2]	3,8 (18) [1,4-5,9]
Índia	C	9,9 (12) [4,5-20,6]	8,3 (12) [2,0-16,8]	5,3 (14) [1,0-9,0]
Botsuana	C	13,0 (13) [7,5-16,6]	11,7 (13) [5,1-19,1]	6,9 (15) [4,5-10,1]
África do Sul	C	12,9 (15) [6,9-18,0]	13,9 (15) [6,2-31-6]	5,9 (14) [3,2-10,3]
Tanzânia	C	16,9 (7) [6,3-24,1]	13,0 (7) [5,3-18,9]	7,3 (7) [5,5-10,3]
Etiópia	C	12,8 (8) [8,0-16,6]	13,5 (8) [5,0-26,3]	6,9 (7) [1,9-10,8]
Brasil	B	14,4 (14) [9,3-20,8]	15,3 (14) [3,0-40,7]	8,0 (10) [4,8-10,9]

4.5 Análise das seqüências de aminoácidos

Com o objetivo de avaliar a sustentação do monofiletismo e da estreita relação entre os vírus brasileiros do subtipo C, as seqüências de aminoácidos traduzidas a partir das seqüências nucleotídicas das amostras foram investigadas quanto à presença de substituições de aminoácidos características, através da comparação com a seqüência consenso mundial do subtipo C (4.5.1). Foram consideradas apenas as substituições com freqüência igual ou maior do que 50%. No fragmento de 180 aminoácidos do envelope viral (posições 202 a 382 no vírus de referência HXB2), as seqüências brasileiras do subtipo C (n=12) divergem em 18 posições da seqüência consenso mundial (Figura 4.5.1a), o que corresponde a uma distância média de 13,65% (variando de 10,7% a 17,8%) da seqüência protéica. Das 18 substituições de aminoácidos, 11 são exclusivas das seqüências do subtipo C do Brasil: V255I (50%), E275K (92%), L277I (58%), E334K (58%), D335T (58%), K336A (83%), K343E (75%), K358N (50%), E360T (75%), P361K (58%), S362H (92%). Entre as outras 7 assinaturas de aminoácidos, 3 (A281V com 67%, S345G com 50% e K349A com 100% de freqüência) são compartilhadas pelas seqüências do subtipo C da Índia (67%, 50% e 67% de freqüência, respectivamente), 3 (N289K com 50%, S291P com 67% e V295N com 100% de freqüência) são compartilhadas pelas seqüências do subtipo C da Etiópia (62,5%, 58% e 62,5% de freqüência, respectivamente), sendo que uma delas (V295N) é compartilhada também pelas seqüências da Tanzânia (71%) e 1 substituição (N279D com 100% de freqüência) é compartilhada pelas seqüências do subtipo C da África do Sul (60%) e da Tanzânia (57%). No fragmento analisado da região *gag*, de 141 aminoácidos (posições 276 a 417 no HXB2), as seqüências brasileiras do subtipo C (n=18) apresentam 6 mudanças quando comparadas com a seqüência consenso mundial (Figura 4.5.1b), com uma distância média de 6,5% (variando de 4,3% a 8,9%) ao nível da seqüência protéica. Das seis substituições em *gag*, 2 (A370V com 89% e I388T com 83% de freqüência) não estão presentes em nenhum outro grupo geográfico do subtipo C analisado, representando desta forma, assinaturas exclusivas das seqüências brasileiras. As outras 4 substituições são: T342S (67%) apresentadas também pelas seqüências do subtipo C da Índia (67%) e da Etiópia (86%); S357G (100%) compartilhada por todas as seqüências africanas (freqüências variando de 57% a 86%); V389I (100%) e I400L (89%) ambas presentes também nas seqüências da Etiópia (71% e 57% de freqüência, respectivamente).

Para avaliar se o padrão de substituições de aminoácidos observado nas seqüências brasileiras do subtipo C era restrito às seqüências brasileiras deste subtipo, estas assinaturas foram investigadas no grupo de seqüências brasileiras do subtipo B. Na região *env* (n=13), apenas a substituição V295N está presente (92%), enquanto que, na região *gag* (n=10), três assinaturas estão também presentes nas seqüências do subtipo B do Brasil: S357G (80%), A370V (70%) e I388T

(50%) (Figura 4.5.1). As seqüências brasileiras do subtipo B foram também comparadas com a seqüência consenso mundial do subtipo B, com o intuito de investigar um possível padrão de assinaturas. Quatro substituições significativas foram encontradas em *env*: L202T (85%), D279N (61%), S291T (54%) e T317A (77%), enquanto uma assinatura específica (R380K com 50% de freqüência) foi observada na região *gag* das seqüências brasileiras do subtipo B (Figura 4.5.1).

O significado biológico das assinaturas de aminoácidos presentes nas seqüências brasileiras do subtipo C foi avaliado através do seu impacto em motivos funcionais. Na seqüência consenso mundial do subtipo C, nove sítios potenciais de N-glicosilação foram encontrados no fragmento caracterizado de *env*, dos quais, 8 foram conservados entre as seqüências brasileiras do subtipo C. As substituições N289K e S291P estiveram associadas com a eliminação de um sítio de N-glicosilação nas posições 289 a 293. Entretanto, a mudança de aminoácido V295N deu origem a um novo sítio imediatamente adjacente nas posições 295 a 298. Este sítio, localizado na posição -1 em relação ao início da alça V3, é exclusivo das seqüências brasileiras. Outro sítio alternativo de N-glicosilação nas posições 358 a 361 foi originado como consequência das substituições K358N, E360T e P361K. Com relação aos sítios potenciais de fosforilação da proteína quinase C (PKC), a seqüência consenso mundial do subtipo C apresenta, originalmente, três deles na região *env* estudada, dos quais, dois são perdidos nas seqüências brasileiras do subtipo C como consequência das substituições S345G e K358N: o primeiro nas posições 345 a 347 e o segundo nas posições 356 a 358. Adicionalmente, na região *env*, as assinaturas K343E e S345G estiveram associadas com a emergência de um novo sítio potencial de fosforilação da caseína quinase II (CKII) nas posições 340 a 343 e um novo sítio potencial de amidação nas posições 344 a 347 respectivamente. Na região *gag* estudada, duas assinaturas de aminoácidos específicas das seqüências do Brasil do subtipo C estiveram associadas com mudanças em motivos funcionais: S357G está relacionada com a perda e I388T está associada com a emergência de um sítio potencial de fosforilação da PKC nas posições 357 a 359 e nas posições 388 a 390 respectivamente.

(a) *env*

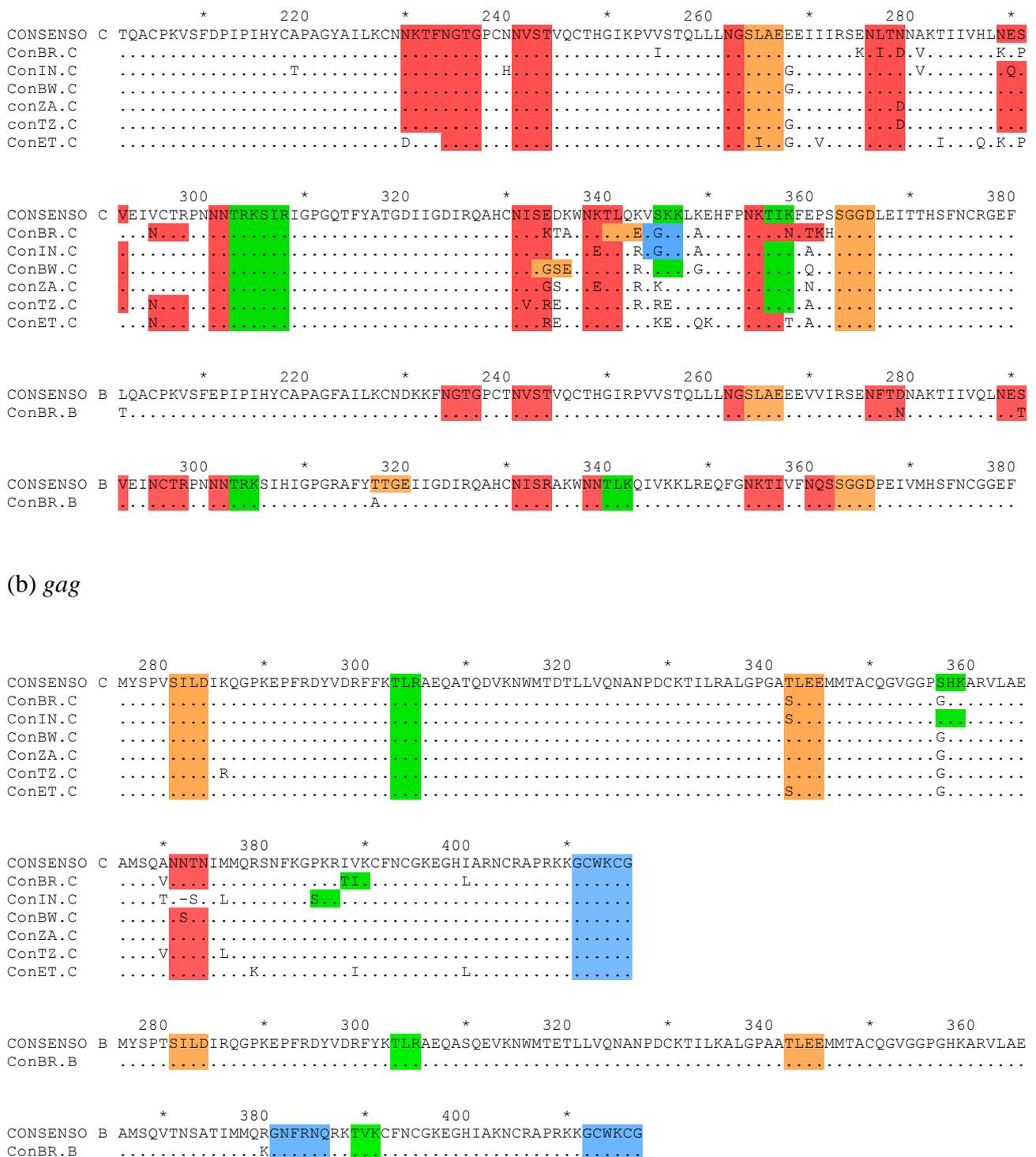


Figura 4.5.1: Alinhamento das seqüências consenso de aminoácidos do subtipo C de diferentes países comparadas com a seqüência consenso mundial deste subtipo, revelando a presença de assinaturas de aminoácidos em *env* (a) e em *gag* (b). Uma seqüência consenso do Brasil do subtipo B foi também alinhada com a seqüência consenso mundial do mesmo subtipo. Os pontos significam identidade com a seqüência consenso. Os sítios potenciais estão representados por cores: N-glicosilação, vermelho; fosforilação da PKC, verde; fosforilação da CKII, laranja; amidação, azul.

4.6 Análise de recombinação

Uma vez que foi observada uma proporção significativa de vírus recombinantes C/B (27,3%) no presente estudo, nós investigamos a origem e a relação filogenética entre estes vírus variantes. Uma árvore filogenética foi construída com base em uma única seqüência nucleotídica de cada vírus, formada pela união das seqüências de *gag* e de *env* dos mesmos (aproximadamente 1000 pb) (Figura 4.6.1). Nesta análise, todos os seis recombinantes C/B formaram um grupo monofilético único e separado (“bootstrap” igual a 92) localizado entre os agrupamentos dos subtipos B e C. Ainda com relação à esta árvore, as amostras RS019 (subtipo F) e RS20 (recombinante BF) agruparam juntas em um grupo irmão das seqüências de referência do subtipo F1 (“bootstrap” igual a 75).

Em seguida, com o objetivo de investigar a existência de um ou mais padrões de recombinação entre estes mosaicos virais, os 1000 pb formados pelas seqüências de *gag* e *env* de cada recombinante foram submetidos à análise de “Bootscreening” (SALMINEN et al., 1995), na qual este fragmento nucleotídico foi comparado individualmente com seqüências de referência dos subtipos de A a K e com a seqüência de outro vírus recombinante da nossa amostra. Cinco análises foram feitas para cada vírus, cada uma realizada com um dos outros recombinantes (Figura 4.6.2). De uma forma geral, a região classificada como subtipo C (*gag*) de todos os recombinantes foi mais similar à seqüência de outro recombinante da amostra do que à qualquer outra seqüência de referência, o que nem sempre ocorreu para a região classificada como subtipo B (*env*) dos mesmos. Entretanto, os vírus RS014, RS021 e RS022 foram mais similares uns aos outros em ambas regiões genômicas do que às outras seqüências de referência, o mesmo tendo acontecido para os recombinantes RS009 e RS010. Em contraste, o isolado RS013 foi mais similar à seqüência de referência do subtipo B na sua região classificada como subtipo B do que à outra seqüência recombinante.

Ainda com o objetivo de investigar a origem dos eventos de recombinação, as substituições de aminoácidos encontradas nas seqüências brasileiras foram investigadas nas seqüências dos vírus variantes. As substituições L202T (83% de frequência), D279N (67% de frequência) e T317A (67% de frequência) encontradas nas seqüências *env* das seqüências brasileiras do subtipo B, assim como a substituição V295N (83% de frequência), característica das seqüências brasileiras dos subtipos B e C, estavam presentes nas seqüências *env* dos recombinantes C/B. Todos os seis recombinantes possuíam as seis assinaturas em *gag* observadas nas seqüências brasileiras do subtipo C, exceto o vírus RS013, o qual não apresentou a substituição T342S (Figura 4.6.3).

Uma vez que os vírus recombinantes RS021 e RS022 foram obtidos a partir de indivíduos epidemiologicamente relacionados, suas seqüências foram comparadas em uma análise mais detalhada. Suas seqüências *env* foram caracterizadas por 29 mutações, sendo 14 transições e 15 transversões (5,6% de distância genética), o que resultou em 16 substituições de aminoácidos. Suas seqüências *gag* apresentaram 13 pontos de divergência, sendo 8 transições e 5 transversões (3,1% de distância genética), o que resultou em 5 substituições de aminoácidos. Considerando-se as regiões *gag* e *env* juntas, a distância entre os vírus RS021 e RS022 foi de 4,5%.

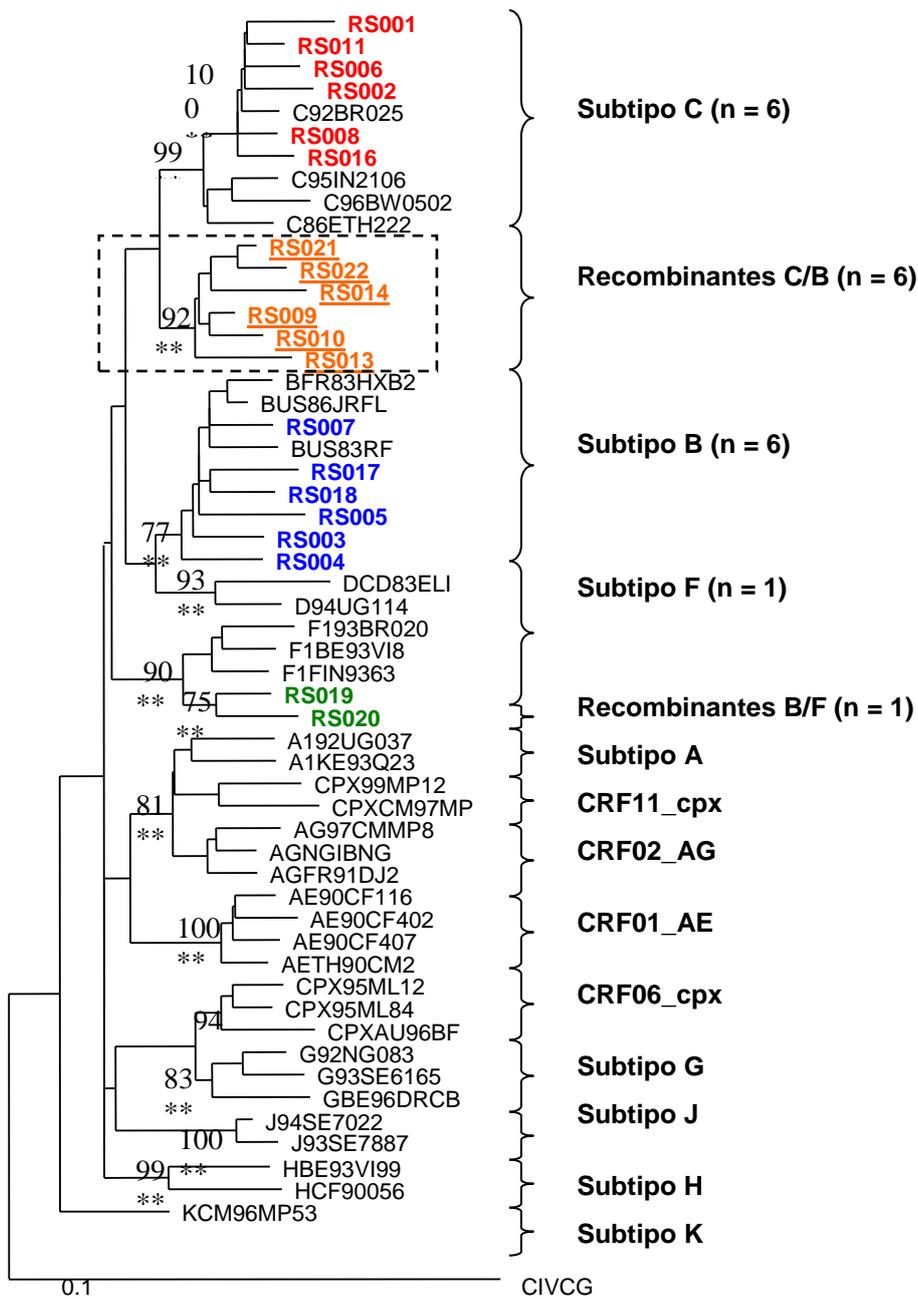
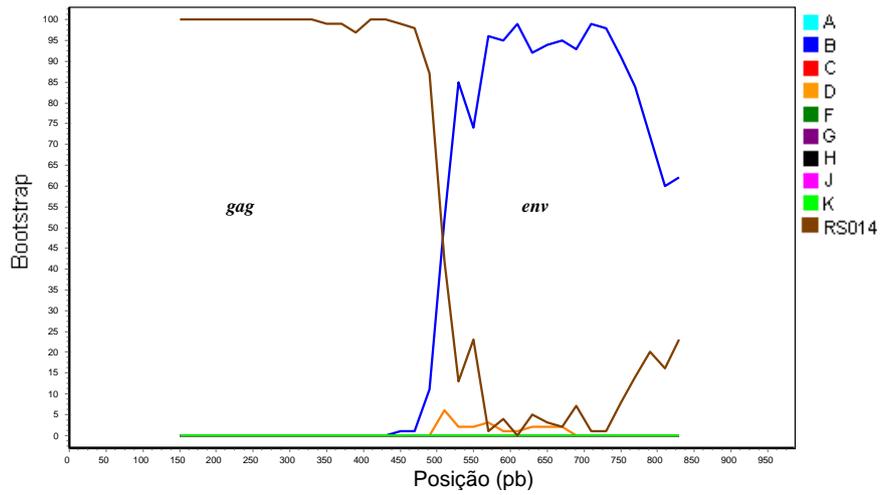
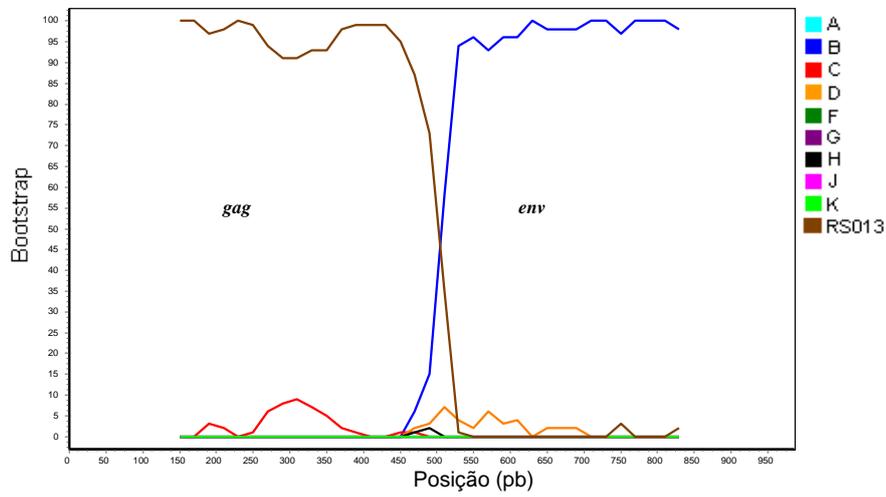
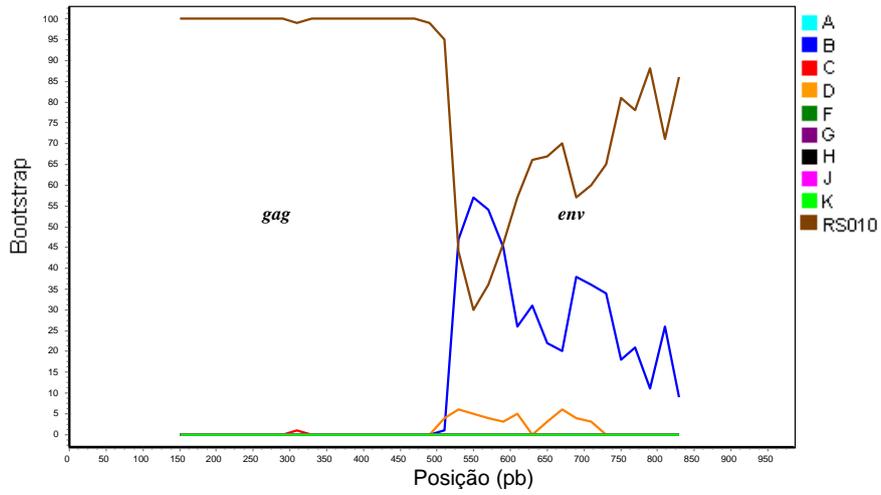
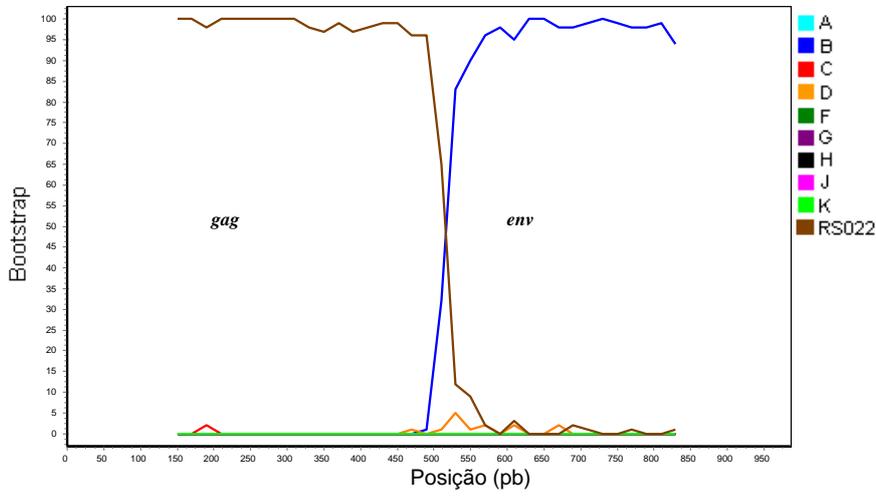
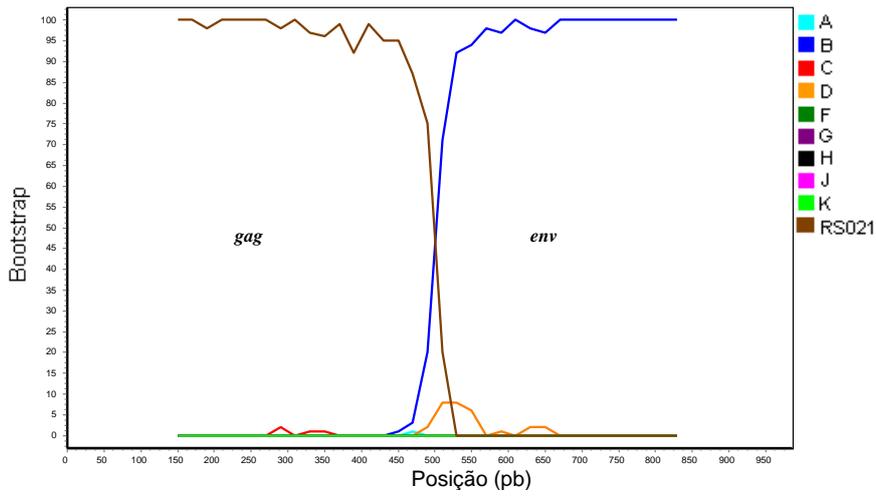


Figura 4.6.1: Árvore filogenética Neighbor-Joining (NJ) construída com base na junção dos fragmentos de *gag* e *env* mostrando as relações filogenéticas dos vírus recombinantes C/B do Brasil com seqüências de todos os subtipos e principais formas recombinantes do grupo M. Os valores de “bootstrap” para 1000 réplicas estão indicados nos ramos. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de $p < 0,001$. As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: azul = subtipo C, verde = subtipo F, vermelho = subtipo B e laranja = recombinates C/B.

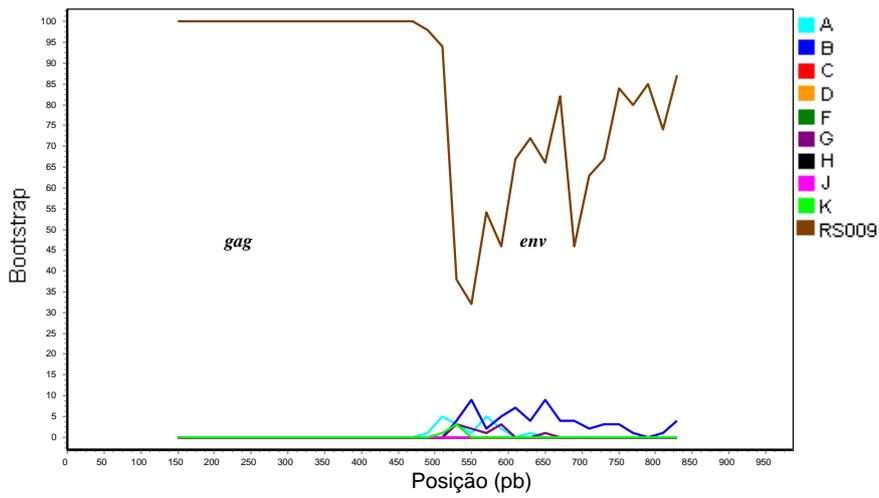
(a) BootScan: RS009



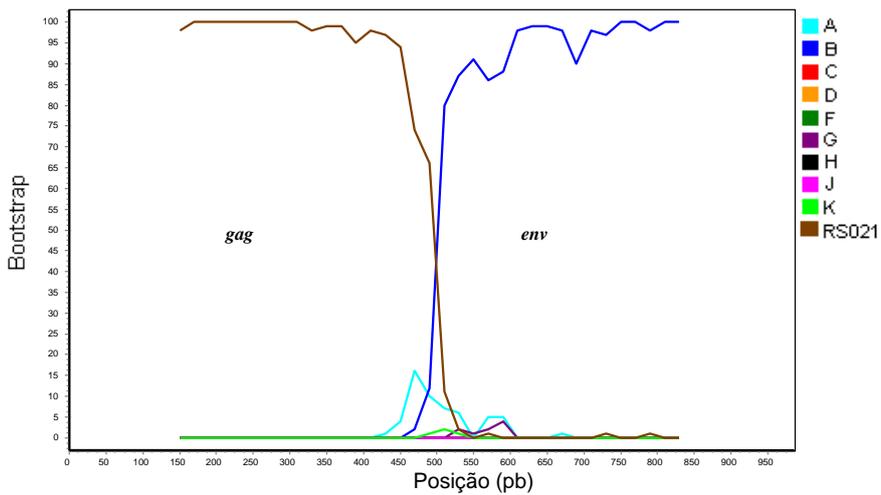
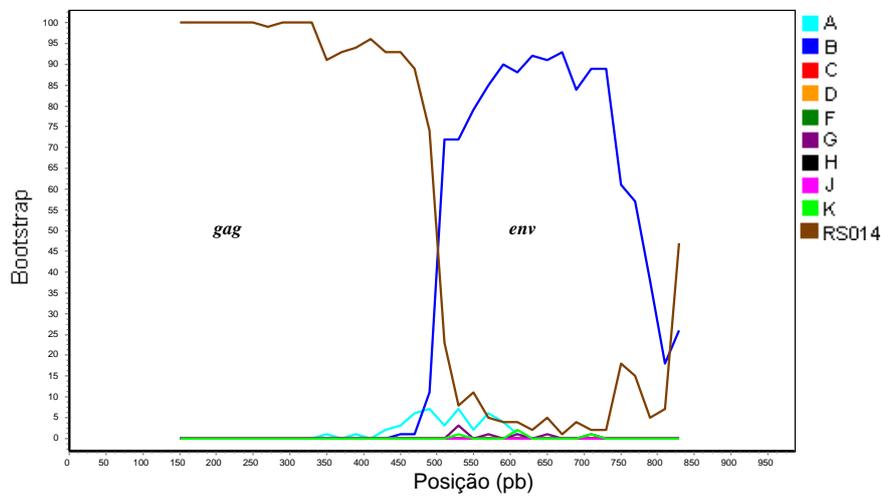
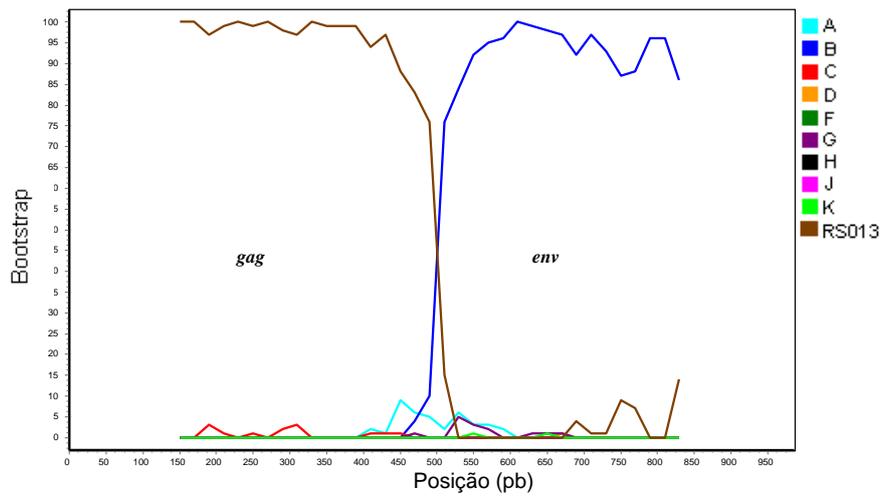
Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining



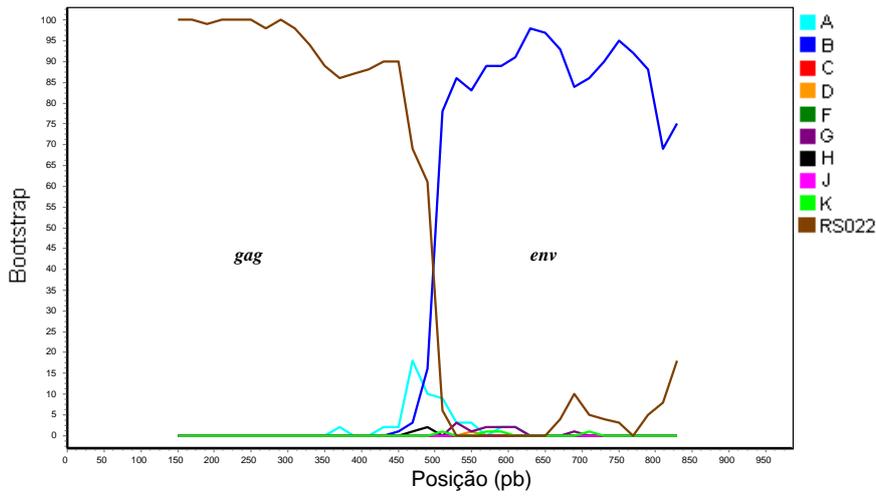
(b) BootScan: RS010



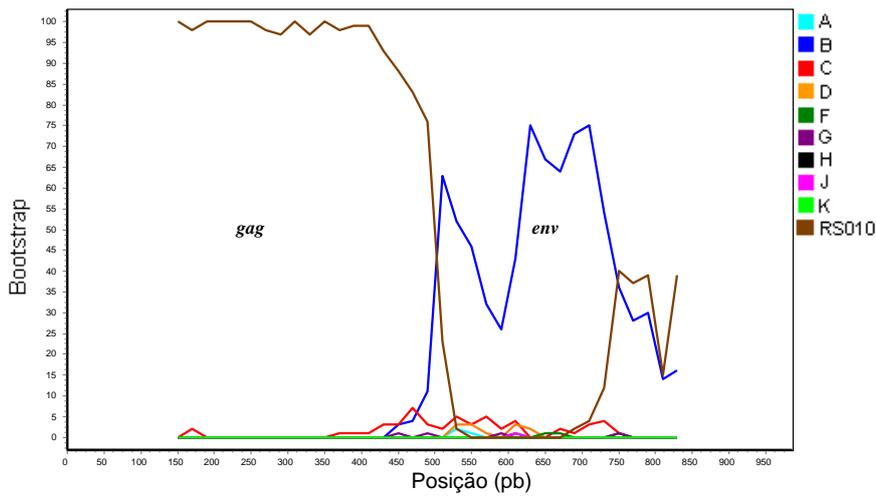
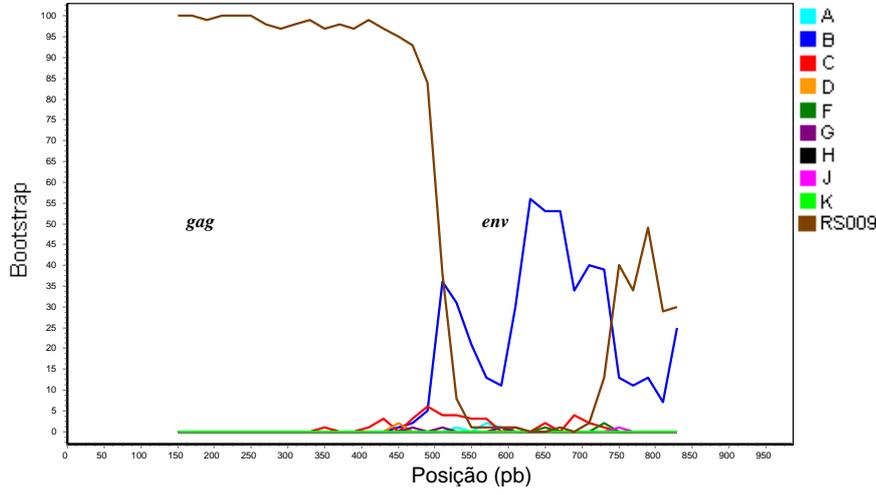
Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining



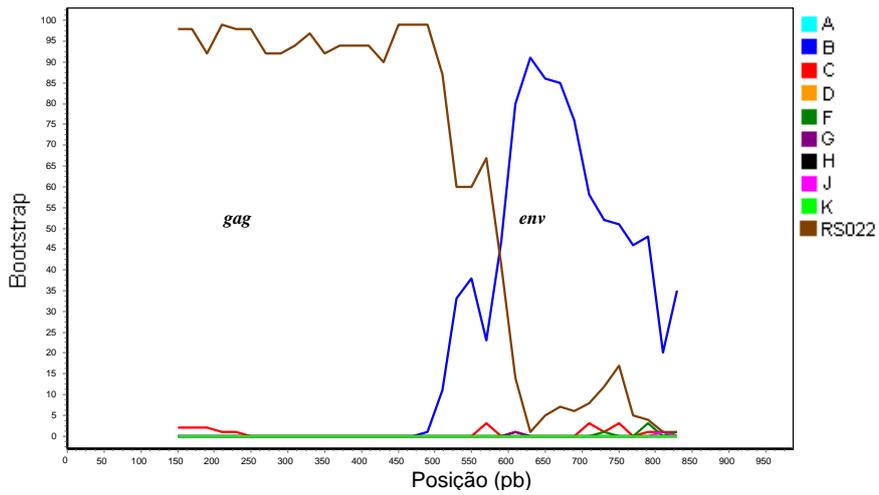
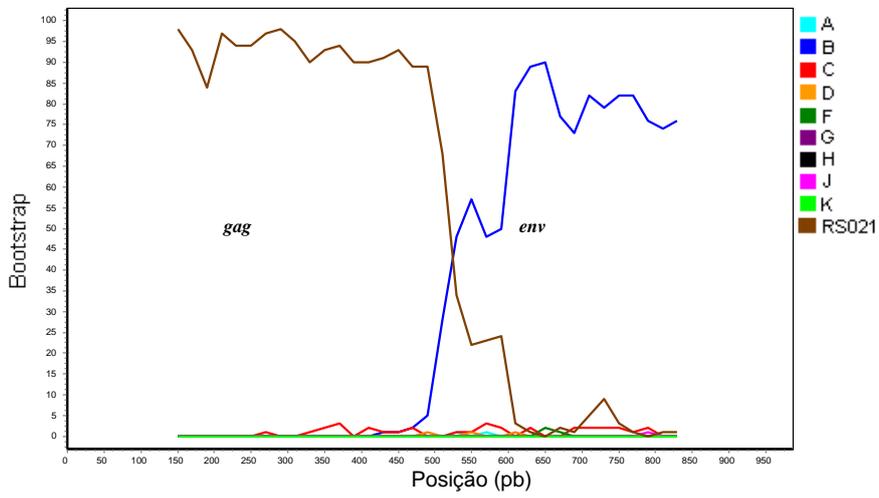
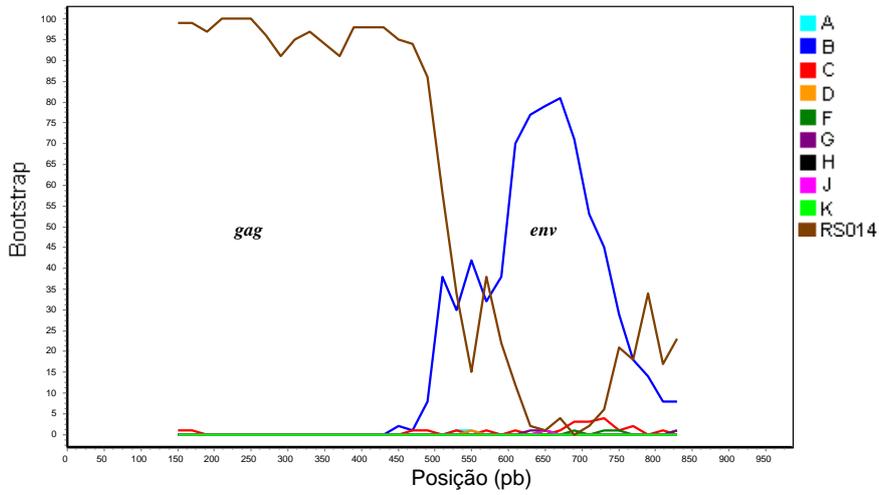
Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining



(c) BootScan: RS013

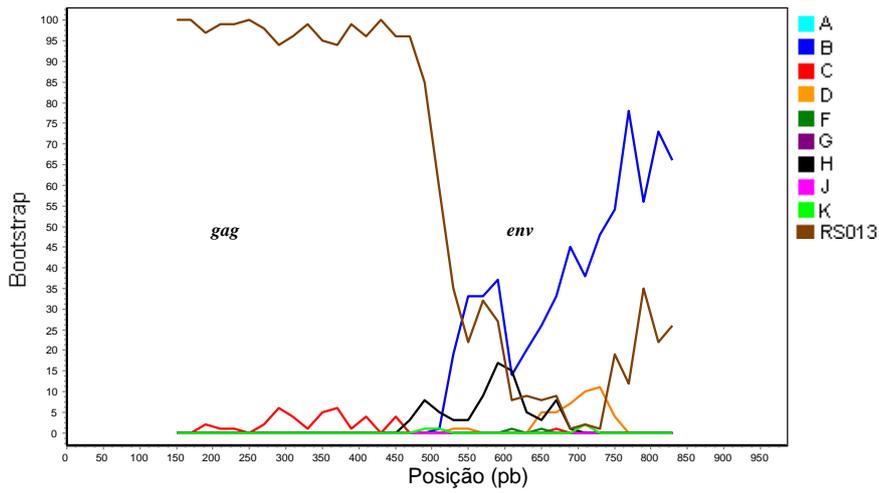
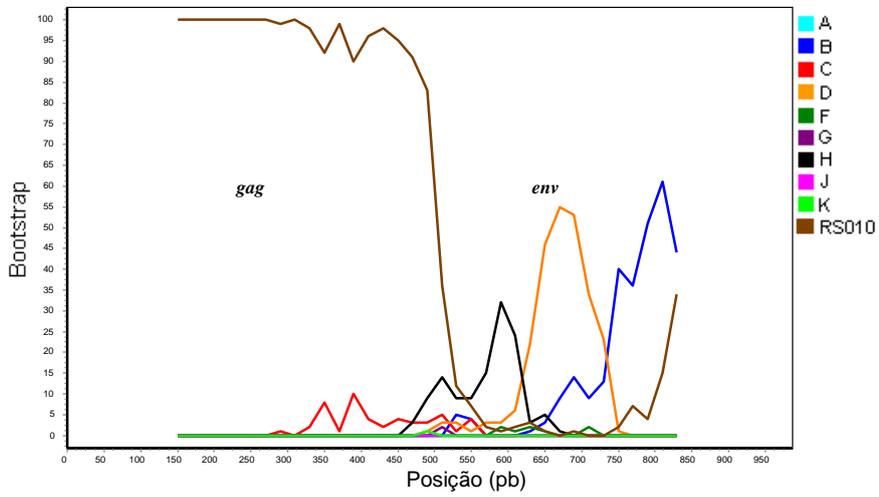
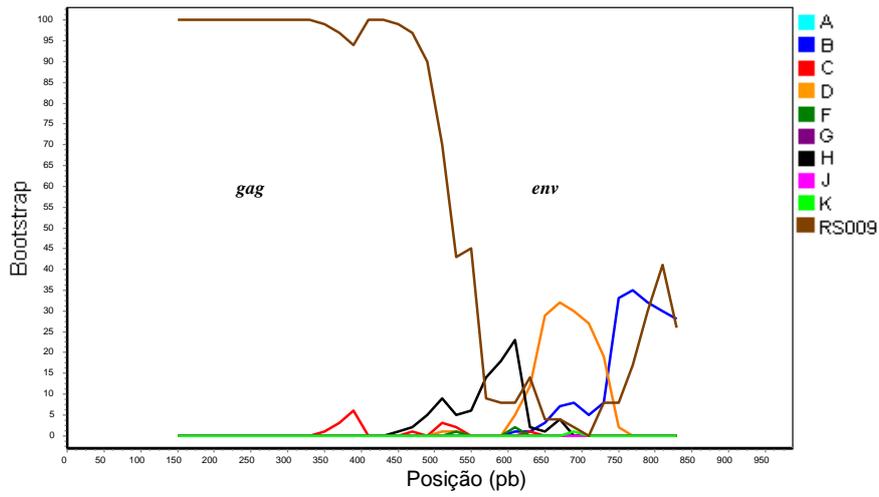


Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining

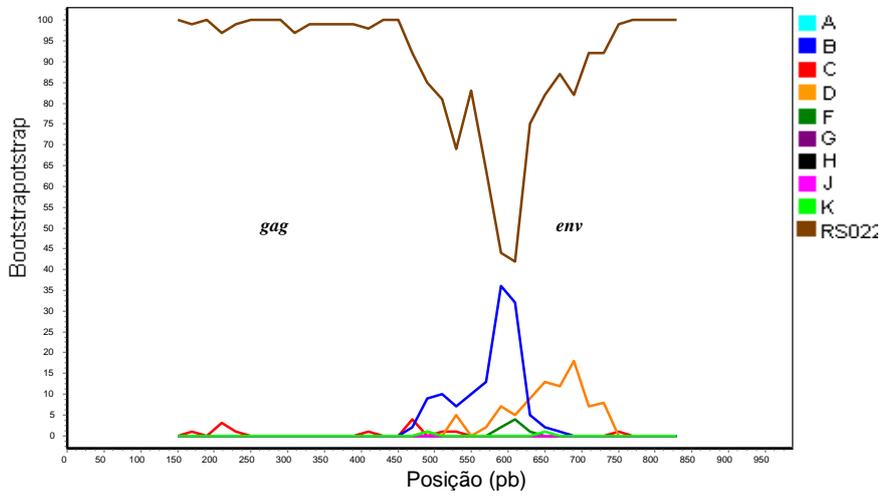
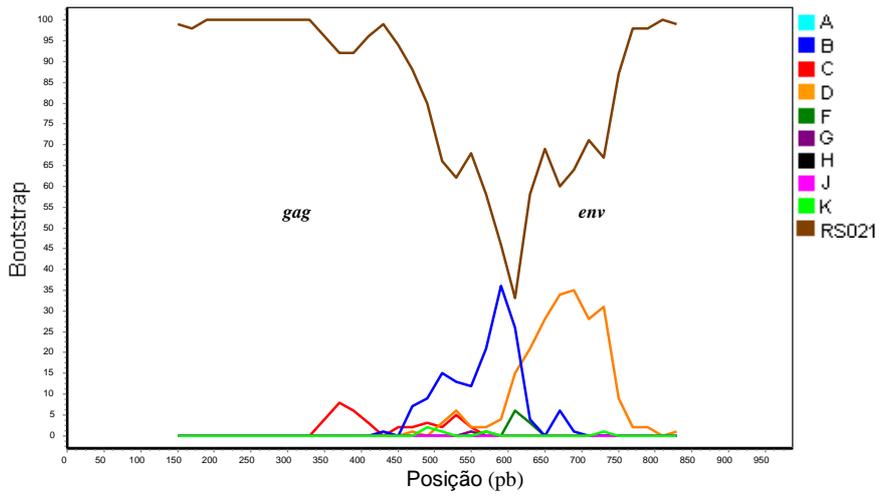


Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining

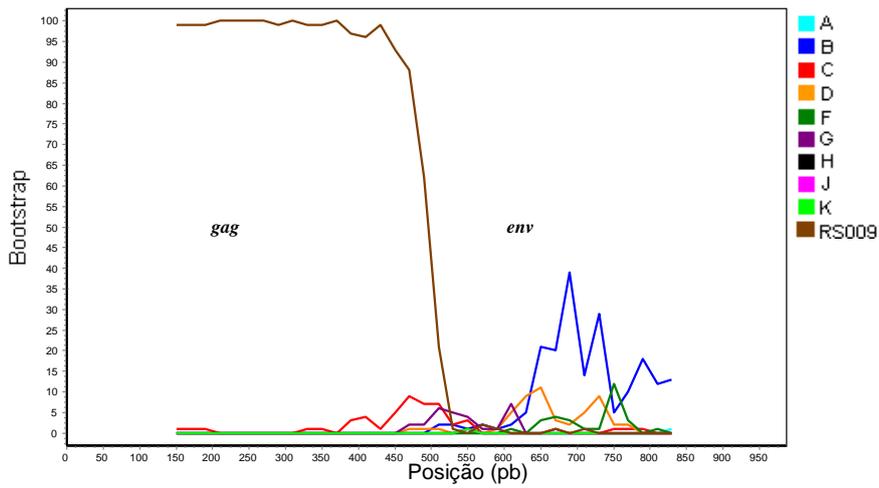
(d) BootScan: RS014



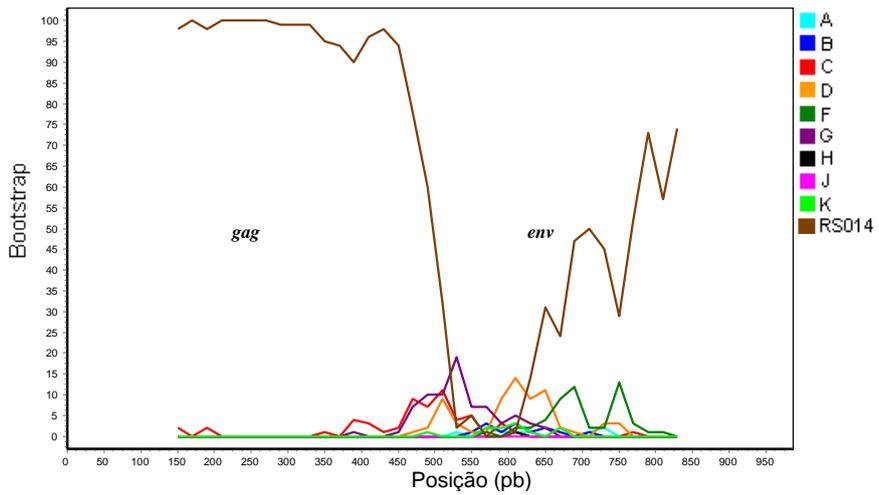
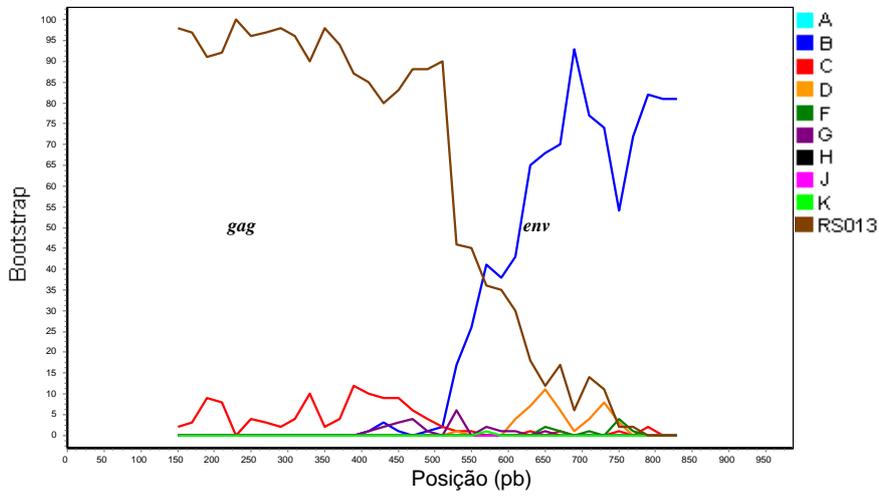
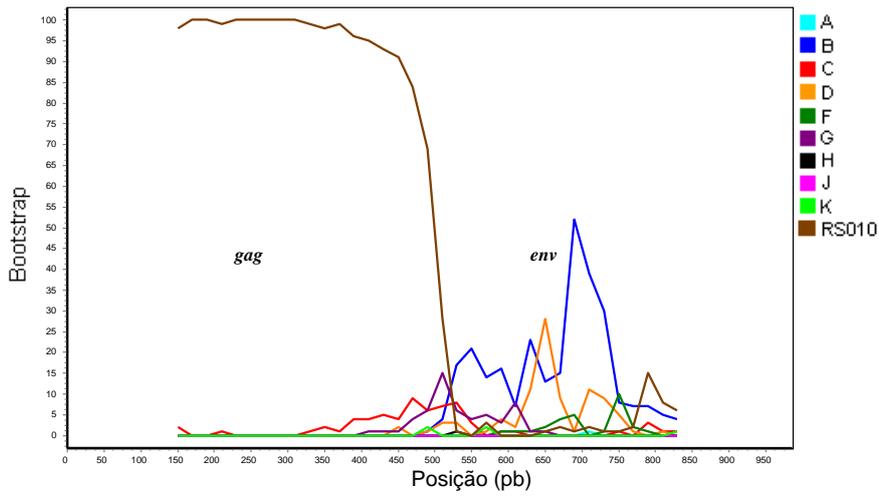
Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining



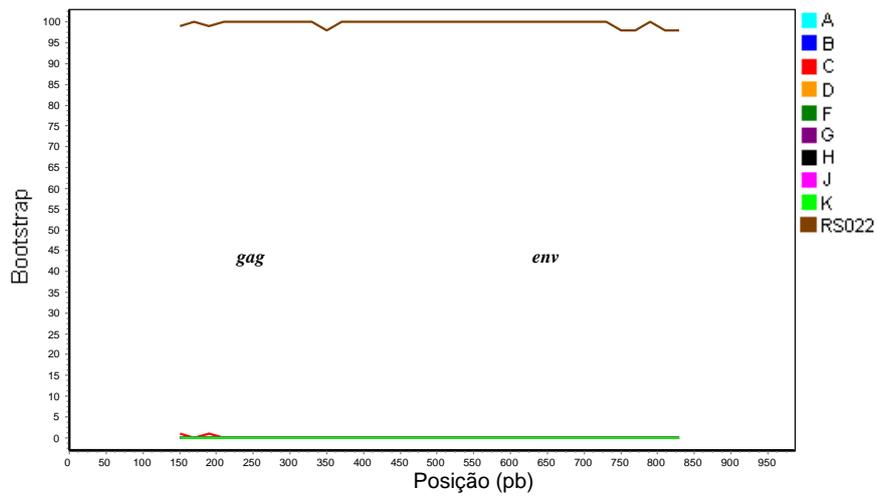
(e) BootScan: RS021



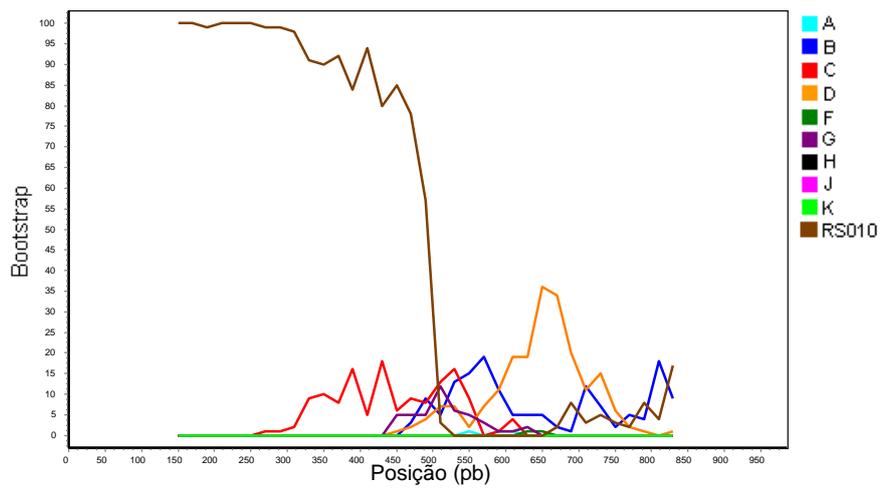
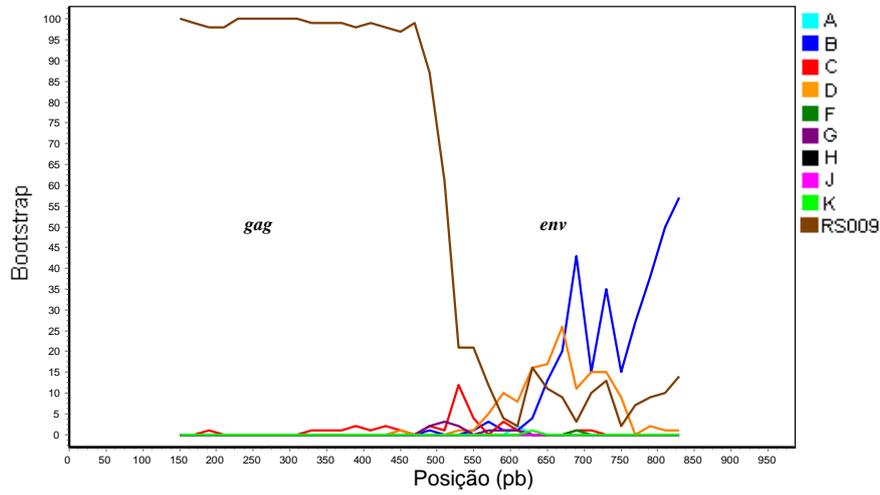
Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining



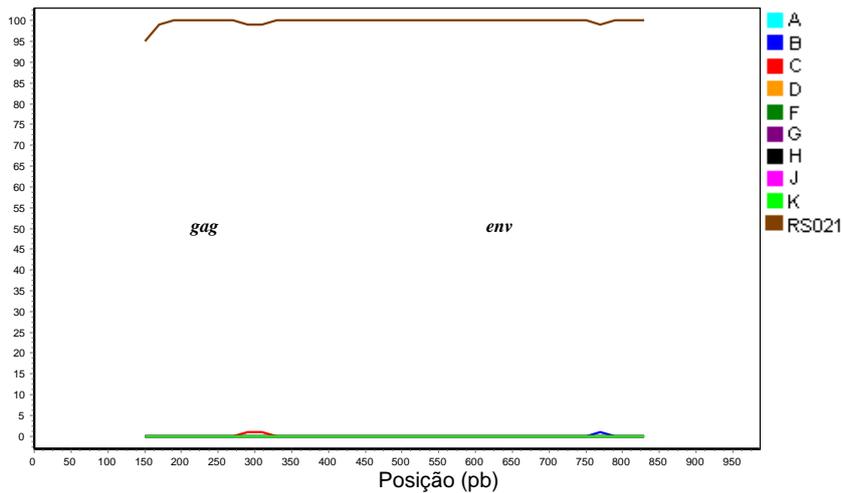
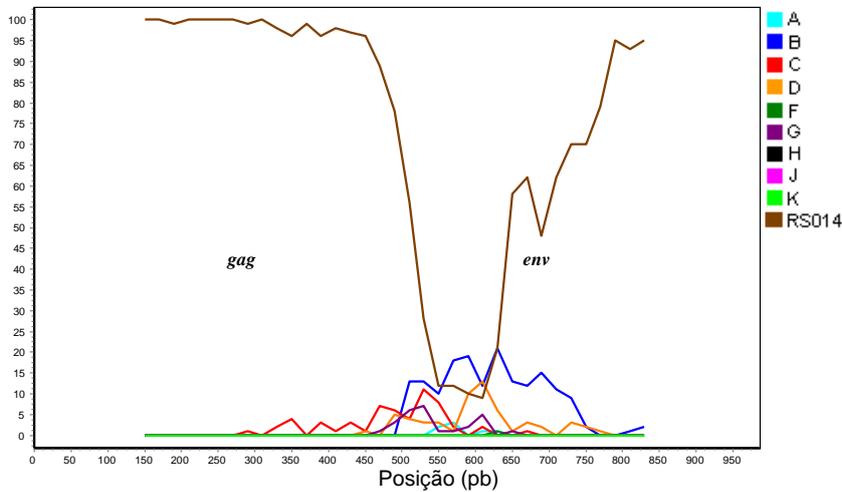
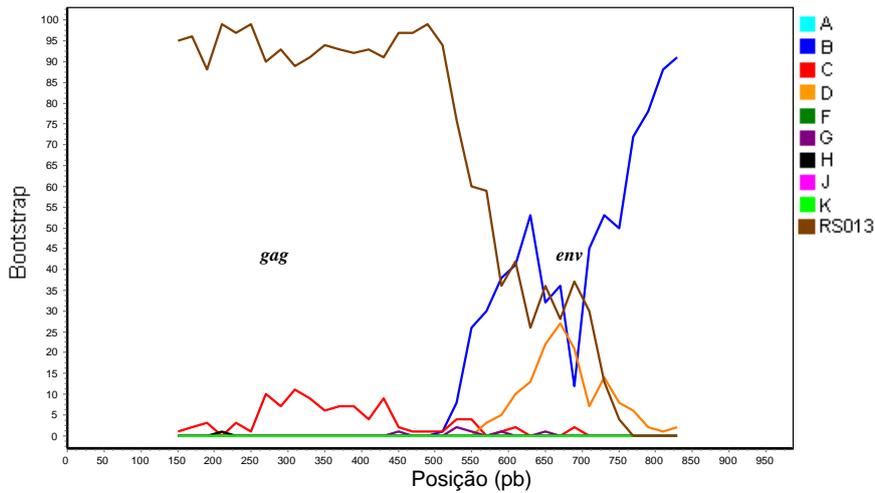
Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining



(f) BootScan: RS022



Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining



Segmento: 300 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining

Figura 4.6.2: Gráficos gerados através do método “Bootscanning”, implementado no programa Simplot (Salminen et al., 1995), com base método nos 1000 pb formados pela união das seqüências *gag* e *env* dos recombinantes C/B e das amostras de referência de todos os subtipos. Nesta análise, compara-se a relação da amostra teste com seqüências de cada subtipo e com a seqüência de um outro recombinante.(a) RS009; (b) RS010; (c) RS013; (d) RS014; (e) RS021; (f) RS022. Os vírus (RS009 e RS010) (RS014, RS021 e RS022)

foram mais relacionados uns com os outros em ambas regiões genômicas, enquanto a amostra RS013 foi mais relacionada com a sequência de referência do subtipo B em *env* do que com qualquer dos outros recombinantes. Segmento de 300 pares de bases; passo de 20 pb; “bootstrap” com 100 réplicas. As árvores foram construídas com base no método Neighbor-Joining utilizando-se o modelo de distância Kimura 2-parâmetros com taxa de transição/transversão (T/t) igual a 2.0. As amostras de referência utilizadas foram: A192UG037, A1KE93Q23, BUS83RF, BUS86JRF, BFR83HXB2, C8ETH222, C96BW0502, DCD83ELI, D94UG114, F193BR020, F1BE93VI850, G92NG083, G93SE6165, HBE93VI991, HCF90056, J94SE7022, J93SE7887, KCD97EQTB11C, KCM96MP535

(a) *env*

```

*      220      *      240      *      260      *      280      *
CONSENSO B LQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKDFNGTGPCTNVSTVQCETHGIRPVVSTQLLLNGSLAEVEEVVIRSENFDTNNAKTIIVQLNESV
RS009      T.....K.....K.....N.....
RS010      T.....L.....R.....R.....S.....V.....Q...
RS013      T.....T.....N.....S.....N.....S.G...V.....N...L.....T.
RS014      S.....T.....L.....S.....I.L.K...N.....T.
RS021      T.....R.....T.....A.....K.....G.....
RS022      T.....P.C.....R.....K.....A.....K.....G.....N...I.....

```

```

*      300      *      320      *      340      *      360      *      380
CONSENSO B EINCTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHCNISRAKWNNTLKQIVKKLREQFG-NKTIVF-NQSSGGDPEIVMHSFNCGGEF
RS009      .....L.....L.....D..NK..I.....-.....-KH.....T.....
RS010      V.....S.....A.....N.....KTQ..D.....E.....-.....
RS013      K.I.....R.TM...VI.A...V.....R.....K...S..EK..V.....N...I.EKPAP...Q.VT..T.
RS014      K.....D.TQ..R.QLRF..TM.V.RT.T.NT...R..L.G.D.K..R.....-.....-H.....
RS021      .....PV.F..VL.A..N.....L.TT..EK..Q.VAE..P.H.P-...-AH.....AT.
RS022      .....PV.F..VL.A..K...N.....L.TT..EE...AT..K...N-.....-.....

```

(b) *gag*

```

*      280      *      300      *      320      *      340      *      360
CONSENSO C MYSFVPSILDIKQGPKEPFRDYVDRFFKTLRAEQATQDVKNWMTDPLLQVQANPDCCKTILRALGPGATLEEMMTACQGVGGPSSHKARVLAE
RS009      .....S.....S.....S.....S.....S.....S.....G.....G.....
RS010      .....A.....S.....S.....S.....S.....S.....G.....G.....
RS013      .DI.G.....S.....S.....S.....S.....S.....G.....G.....
RS014      .C.....S.....S.....S.....S.....S.....G.....G.....
RS021      .....S.....S.....S.....S.....S.....G.....G.....
RS022      .....L.....V.....S.....S.....S.....G.....G.....

```

```

*      380      *      400      *
CONSENSO C AMSQANNTNIMMQRSNFKGPKRIVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCG
RS009      V.....TI.....L.....
RS010      V.....TI.....L.....
RS013      V.....K.....TI.....L.....W.
RS014      V..P.....TI.....L.....
RS021      V..A.....TI.....L.....W.
RS022      V..G.....TI.....L.....WE

```

Figura 4.6.3: Alinhamento das sequências *env* (a) e *gag* (b) dos vírus recombinantes com a sequência consenso mundial dos subtipos B e C respectivamente, mostrando a presença das assinaturas de aminoácidos características das sequências brasileiras (caixas vermelhas). Os pontos significam identidade com a sequência consenso.

4.7 Caracterização Biológica

Foram isolados e caracterizados quanto às suas propriedades biológicas, sete isolados primários de HIV-1 da nossa amostra, cinco deles classificados como subtipo C em *gag* e em *env* e dois deles classificados como subtipo B em *env* e como subtipo C em *gag* (Tabela 4.7.1). Todos os isolados testados foram capazes de se replicar em culturas de macrófagos humanos derivados de monócitos. Entre os cinco isolados do subtipo C que foram caracterizados, quatro não foram capazes de induzir a formação de sincícios (NIS) em células de linhagem MT-2 e SUPT-1, enquanto o outro vírus classificado como subtipo C (RS001), assim como, os dois isolados recombinantes, foram capazes de induzir a formação destas células gigantes (IS). Como esperado, todos os sete isolados primários foram capazes de induzir a formação de sincícios em células de linhagem PM-1. Foi observada uma forte correlação entre a habilidade dos isolados em induzir sincícios em células tumorais T CD4+ e a utilização do receptor de quimiocina. Assim, todos os isolados do subtipo C analisados foram capazes de utilizar o correceptor CCR5 para infecção celular. Não obstante, os quatro isolados do subtipo C classificados como NIS foram capazes de infectar apenas células U87 CCR5+ (vírus R5), enquanto o outro isolado do subtipo C classificado como IS foi capaz de infectar alternativamente células U87 CXCR4+, embora o efeito citopático observado nestas células tenha sido menor em relação ao observado nas células U87 CCR5+. Os dois recombinantes C/B foram capazes de utilizar tanto o CCR5 como o CXCR4 como correceptores (vírus R5X4).

Tabela 4.7.1: Caracterização molecular e biológica de isolados de HIV-1 circulantes no Brasil

Isolado	Subtipo		Peptídeo V3	Carga V3	Caracterização biológica					
	<i>gag</i>	<i>env</i>			Crescimento em macrófagos	Indução de sincícios			Uso do correceptor	
						MT-2	SUPT-1	PM-1	U87 CCR5+	U87 CXCR4+
RS001	C	C	GPGQ	+3	+	+	+/-	+	+	+
RS002	C	C	GPGR	+5	+	-	-	+	+	-
RS006	C	C	GPGQ	+1	+	-	-	+	+	-
RS008	C	C	GPGQ	+3	+	-	-	+	+	-
RS016	C	C	GPGQ	+2	+	-	-	+	+	-
RS021	C	B	GFGR	+4	+	+	+	+	+	+
RS022	C	B	GFGR	+6	+	+	+	+	+	+

gag, grupo antígeno; *env*, envelope; G, glicina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; F, fenilalanina.

4.8 Caracterização Molecular da alça V3 dos isolados

Características biológicas de isolados de HIV-1 como a utilização do receptor de quimiocina e tropismo para células de linhagem T CD4+ estão associadas com a presença de aminoácidos básicos nas posições 11, 25 e 29 da alça V3 do envelope viral em vírus do subtipo B (FOUCHIER et al., 1992; SHIODA et al., 1992; HOFFMAN et al., 2002) e nas posições 8, 11 e 18 em vírus recombinantes da CRF01_AE (KATO et al., 1999). Por isso, nós caracterizamos a região de 35 aminoácidos da alça V3 das seqüências obtidas (Figura 4.8.1). A carga total da região de cada vírus foi calculada através do programa DNASTAR (BURLAND, 2000) e confirmada através do cálculo manual da soma das cargas positivas diminuída da soma das cargas negativas (Tabela 4.7.1). Nenhum dos isolados do subtipo C tiveram aminoácidos positivamente carregados (lisina ou arginina) nas posições 11, 25 e 29. Entretanto, o isolado RS002 apresentou uma arginina na posição 18 e uma lisina na posição 32, o que resultou em uma carga total dessa região igual à +5. Todos os isolados do subtipo C possuíam um resíduo neutro (serina) na posição 11 e um resíduo negativamente carregado (glutamato ou aspartato) na posição 25. O tetrapeptídeo GPGQ no topo da alça, característico dos vírus do subtipo C esteve conservado em todos os isolados deste subtipo, exceto em um (RS002) (Tabela 4.7.1). Contrariamente aos vírus do subtipo C, os dois isolados recombinantes C/B tiveram aminoácidos básicos na posição 18 (arginina, característica dos vírus do subtipo B) e o isolado RS022 apresentou também um outro resíduo positivo (lisina) na posição 25, resultando em uma carga total igual à +6, característica dos vírus indutores de sincícios. O sítio potencial de N-glicosilação NXT nas posições 6 a 8, o qual é altamente conservado na maioria dos isolados de HIV-1 (ZHANG et al., 2002), esteve presente não somente em todos os isolados analisados mas também em todas as outras seqüências brasileiras geradas neste estudo, exceto em uma (RS014). A predição do fenótipo foi também realizada com base na presença de um aminoácido lisina (K) ou arginina (R) nas posições 11 e/ou 25 da alça V3 (FOUCHIER et al., 1995; SHANKARAPPA et al., 1999; PHILPOTT et al., 2001; HOFFMAN et al., 2002). Segundo este método, as seqüências RS001, RS002, RS006, RS008, RS016 e RS021 correspondem ao fenótipo R5, enquanto a seqüência RS022 corresponde ao fenótipo X4. De uma forma geral, as seqüências V3 do subtipo C foram três vezes mais conservadas do que as seqüências do subtipo B (Tabela 4.4.1).

	11	18	25	29	<u>Fenótipo:</u>		
CONSENSO C	CTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHC						
CONSENSO BH....RA..T..E.....					<i>in vitro</i>	predição
RS001 (C)E.....				+3	R5X4	R5
RS002 (C)R.....K...				+5	R5	R5
RS006 (C)E.....E.....Y.				+1	R5	R5
RS008 (C)				+3	R5	R5
RS016 (C)E.....				+2	R5	R5
RS021 (C/B)P..F.RVL.....				+4	R5X4	R5
RS022 (C/B)P..F.RVL....K.....				+6	R5X4	X4

Figura 4.8.1: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da alça V3 dos 7 isolados virais caracterizados. A numeração acima das seqüências corresponde à posição do aminoácido em relação ao início da alça V3. Os subtipos das amostras com base em *gag* e *env* estão especificados entre parênteses. A carga total da região, o fenótipo observado *in vitro* e a predição do fenótipo dos isolados estão indicadas à direita das seqüências. R5, trópico para o receptor CCR5; R5X4, trópico para os receptores CCR5e CXCR4; X4, trópico para o receptor CXCR4.

5. DISCUSSÃO

Embora o Brasil seja responsável por mais de um terço do número total de pessoas vivendo atualmente com o HIV na América Latina (UNAIDS, 2005), o conhecimento sobre a diversidade molecular e biológica das cepas de HIV-1 circulantes no país é ainda escasso considerando-se o país como um todo. Estudos anteriores relataram a prevalência do subtipo B, seguido pelo subtipo F e esporádicos casos de outros subtipos, como C, D, e A (BONGERTZ et al., 2000; COUTO-FERNANDEZ et al., 1999; MORGADO et al., 2002). Mais recentemente, entretanto, mudanças no padrão de distribuição dos subtipos de HIV-1 têm sido relatadas, mostrando um aumento na prevalência do subtipo C na região Sul do país (DE MARTINEZ et al., 2002; BRINDEIRO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005). Com base nesta mudança na epidemiologia molecular do HIV-1 no país e na importância do subtipo C na epidemia global de HIV/AIDS, este estudo se empenhou na caracterização de vírus provenientes de uma população infectada pelo HIV-1 da cidade de Porto Alegre e representa o primeiro esforço no Brasil a descrever associação entre características moleculares e biológicas de um painel de isolados do subtipo C do HIV-1.

No presente estudo constatamos que os pacientes incluídos nesta coorte apresentam características concordantes com algumas das tendências atuais observadas na epidemia de HIV/AIDS do Brasil. Inicialmente observamos uma razão igual a 1,44 homens: 1 mulher, que difere da razão de 4:1 registrada em 1993 (10 anos antes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Secundariamente, detectamos uma participação majoritária de indivíduos com comportamento heterossexual (68,2%). Finalmente houve uma marcante participação de indivíduos com baixo poder aquisitivo. De fato, uma característica marcante das epidemias de HIV/AIDS causadas por vírus do subtipo C é a sua prevalência em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento como Índia, China, África subsaariana e Brasil, o que levanta a hipótese de que fatores ambientais do hospedeiro que são comuns a essas regiões (por exemplo, co-infecções com outros patógenos, más condições de higiene e saúde) podem estar indiretamente favorecendo a observada expansão deste subtipo. Outra característica que chama a atenção na nossa amostra é que os três genótipos prevalentes (subtipos B e C e recombinantes B/C) estão co-circulando entre usuários de drogas injetáveis de Porto Alegre. De fato, De Martinez e colaboradores (2002) relataram uma significativa proporção (46,7%) de infecções causadas pelo subtipo C entre usuários de drogas injetáveis na cidade de Rio Grande no Rio Grande do Sul e sugeriram uma participação importante deste grupo de risco na disseminação inicial deste subtipo no sul do Brasil. Entretanto, devido ao número limitado de amostras na nossa coorte, estes resultados não alcançaram significância estatística.

Com base na caracterização molecular das regiões *env* e *gag* do genoma viral, encontramos cinco estruturas genômicas distintas entre as amostras estudadas: os subtipos B, C e F e as potenciais formas recombinantes C/B e B/F. Apoiando os achados mais recentes a respeito da epidemiologia molecular do HIV-1 na região sul do país, foi observada uma alta frequência de vírus do subtipo C. A análise das seqüências do envelope demonstrou que 63,6% foram classificadas como subtipo B, 27,3% foram classificadas como C e 9,1 % foram classificadas como subtipo F. Os

resultados de prevalência de subtipos com base na região *env* foram concordantes com os de De Martinez e colaboradores (2002), que estudaram esta mesma região gênica e encontraram proporções semelhantes para estes três subtipos: 75% de subtipo B, 22% de subtipo C e 3% de subtipo F. Com relação à região do grupo antígeno (*gag*), observou-se uma maior prevalência do subtipo C (54,5%), comparando-se com a região do envelope. Este resultado baseado no gene *gag* é mais próximo aos encontrados por Brindeiro e colaboradores (2003) e Rodrigues colaboradores (2005) com base no gene *pol*: 45% e 58% de prevalência do subtipo C, respectivamente. Esses dados demonstram que diferentes regiões genômicas do HIV-1 podem apresentar diferentes prevalências de subtipos, o que reflete a importância da caracterização de mais de um gene para subtipagem e vigilância epidemiológica. Quando conjugamos os dados de *env* e de *gag*, a prevalência de vírus classificados como subtipo C foi de 27,3%, menor do que os 45% e 58% encontrados por estudos prévios (BRINDEIRO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005), os quais, entretanto, foram baseados em uma única região genômica (*pol*) e, por isso, podem estar incluindo vírus recombinantes. De fato, grande parte das seqüências envolvidas em tais estudos representa mosaicos intragênicos. Em nosso estudo, a prevalência de subtipo C aumenta para 54,5% quando os genótipos recombinantes contendo seqüências do subtipo C são incluídos.

Analisando-se as taxas de prevalência observadas para o subtipo C ao longo do curso da epidemia de AIDS na região Sul do Brasil, um claro aumento na participação deste subtipo foi observado: nenhuma antes de 1990; 39%, de 1991 a 1995; 38%, de 1996 a 2000, e 43%, de 2001 a 2002 (SOARES E. et al., 2003). Os resultados encontrados neste estudo apóiam fortemente as evidências de que a prevalência do subtipo C está aumentando desde sua introdução no Sul do Brasil, refletindo-se diretamente em mudanças cronológicas na epidemiologia dos subtipos de HIV-1 nesta região.

A análise das relações filogenéticas entre as seqüências do subtipo C do Brasil envolvidas neste estudo com seqüências de subtipo C de diversos países da África e da Ásia, onde este subtipo tem prevalência ou representatividade, mostrou a formação de um grupo monofilético pelas seqüências dos vírus do subtipo C do HIV-1 circulantes no Brasil tanto na região *gag* como na região *env*. Este resultado confirma a hipótese de uma introdução recente deste subtipo no Brasil, a partir de um único evento, ou, no mínimo, a partir de um grupo pequeno de vírus geneticamente relacionados, como sugerido por Soares M. e colaboradores (2003) com base na análise do gene *pol*. Essa hipótese é também sustentada pelos dados comparativos das distâncias genéticas entre as seqüências de uma mesma região geográfica, nos quais, os vírus do Brasil do subtipo C apresentaram as menores distâncias médias, tanto em *gag* como em *env*, quando comparados com

os vírus do subtipo C circulantes em países da África e com os vírus do subtipo B circulantes no Brasil, onde estes subtipos representam epidemias de longa duração causadas por múltiplas introduções (BRINDEIRO et al., 1999; SHANKARAPPA et al., 2001; GORDON et al., 2003). Por outro lado, as seqüências brasileiras do subtipo C tiveram distâncias médias mais semelhantes àquelas apresentadas pelos vírus do subtipo C da Índia (Tabela 4.4.1), os quais foram também sugeridos como representantes de uma introdução única e recente naquele país (SHANKARAPPA et al., 2001). Além disso, a baixa diversidade das seqüências do Brasil do subtipo C está refletida na curta extensão dos seus ramos nas árvores filogenéticas.

A forte relação entre os vírus do subtipo C circulantes no Brasil é ainda corroborada pela observação de um padrão de assinaturas de aminoácidos nas seqüências de ambas as regiões genômicas analisadas. Estas assinaturas de aminoácidos podem ter significado evolutivo, estrutural e fenotípico. Por exemplo, dos 18 sítios diferentemente conservados nas seqüências *env* das amostras brasileiras do subtipo C, quatro foram descritos como sendo positivamente selecionados (posições 281 e 291 na região C2 e 336 e 343 na região C3 da gp 120), enquanto, nenhuma das outras substituições foi descrita como sendo negativamente selecionada (YAMAGUCHI-KABATA; GOJOBORI, 2000). Todos os sítios positivamente selecionados encontram-se localizados na superfície da estrutura tridimensional da glicoproteína gp120 (YAMAGUCHI-KABATA; GOJOBORI, 2000) e estão envolvidos com a ligação à molécula CD4 (KWONG et al., 1998). Uma vez que, seleção positiva opera, no envelope viral, contra mudanças de aminoácidos que são responsáveis por variações antigênicas ou fenotípicas (YAMAGUCHI-KABATA; GOJOBORI, 2000) e considerando-se a importância funcional dessas posições, as assinaturas de aminoácidos observadas na linhagem brasileira de vírus do subtipo C podem estar relacionadas com aumento do “fitness” viral e com mecanismos virais de escape do sistema imune do hospedeiro. Uma outra característica observada nas seqüências de aminoácidos do subtipo C das nossas amostras foi a associação entre assinaturas específicas com a perda ou a emergência de novos sítios de N-glicosilação nas regiões C2 e C3 do envelope. Estudos prévios sugerem que a presença de carboidratos na gp120 contribui para a formação de uma barreira sobre a proteína viral que ajuda a “proteger” o vírus contra o reconhecimento pela resposta imune (CHACKERIAN et al., 1997; REITTER et al., 1998) e que a remoção dessas moléculas aumenta a resposta CTL ao envelope do HIV-1 (DOE et al., 1994). Um destes estudos demonstrou que a ausência de apenas dois sítios de N-glicosilação dentro e próximo da região V1 do envelope aumentou dramaticamente a resposta de anticorpos à estruturas específicas nesta região (REITTER et al., 1998). Uma das nossas observações que estaria sustentando a importância da glicosilação na gp 120 para o “fitness” viral é

o fato de que seqüências brasileiras do subtipo C perderam o sítio de N-glicosilação nas posições 289 a 293, entretanto, através de uma substituição específica, elas adquiriram um novo sítio imediatamente adjacente nas posições 295 a 298 (Figura 4.5.1). Uma observação similar foi feita por Reitter e colaboradores (1998) na região V1, indicando a existência de uma pressão seletiva para a manutenção destes sítios dentro da gp120. Uma outra observação interessante é que as seqüências do subtipo B e as do subtipo C apresentaram padrões diferenciados de localização dos sítios de N-glicosilação dentro do fragmento do envelope estudado (Figura 4.5.1). Neste mesmo sentido, Brown e colaboradores (2005) encontraram diferenças significativas com relação ao número e posicionamento de sítios de N-glicosilação entre o subtipo B e a CRF_AE. À luz destas informações, estudos futuros envolvendo ensaios de neutralização com isolados de diferentes subtipos caracterizados quanto aos sítios de glicosilação no envelope viral poderão contribuir para esclarecer o significado destas diferenças.

Entre as amostras estudadas, foi observada uma significativa proporção de 27,3% de vírus recombinantes entre os subtipos B e C. Este resultado é semelhante à proporção de 25% de recombinantes encontrada por Brindeiro et al. (2003) para as regiões genômicas da protease (PR) e da transcriptase reversa (TR). A possibilidade de que estes vírus mosaicos representem seqüências *gag* e *env* amplificadas de diferentes cepas co-infectando o mesmo indivíduo não pode ser completamente excluída, entretanto, como os métodos utilizados nesta análise amplificam a cepa predominante do indivíduo, linhagens de diferentes subtipos teriam que estar presentes em quantidades aproximadamente iguais para explicar os resultados obtidos. Estudos prévios reportaram a presença de formas recombinantes BC circulando no Brasil (CORNELISSEN et al., 1996; GUIMARAES et al., 2002; BRINDEIRO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005), contudo, apenas um destes estudos demonstrou evidências, com base na região *pol*, de que estes vírus mosaicos foram gerados no país. Em nossas análises, o agrupamento das seqüências *gag* e *env* dos vírus recombinantes em um grupo monofilético e separado e a observação da presença de assinaturas de aminoácidos características das seqüências brasileiras sugerem que estas formas recombinantes são resultantes de eventos locais de recombinação e não representam introduções por migração de vírus recombinantes externos. Quando comparamos as regiões *gag* e *env* dos seis vírus recombinantes, de uma forma geral, a seqüência de subtipo C (*gag*) de todos os recombinantes foi mais similar à seqüência de outro recombinante da amostra (vírus circulantes na mesma região) do que à qualquer outra seqüência de referência do subtipo C utilizada (C8ETH222 (da Etiópia) e C96BW0502 (da Botsuana)). Por outro lado, a seqüência de subtipo B (*env*) dos recombinantes foi, muitas vezes, mais relacionada com a seqüência de referência utilizada (BUS83RF (dos Estados Unidos), BUS86JRFL (dos Estados Unidos) e BFR83HXB2 (da França)). Ainda, em algumas análises, seqüências *env* dos recombinantes (por exemplo RS014, RS021 e RS022) apresentaram valores muito baixos de “bootstrap” tanto com as seqüências de referência como com outras seqüências da amostra (RS009 e RS010, por exemplo), indicando a baixa relação de ancestralidade entre estas seqüências. Ao contrário, os valores consistentes de “bootstrap” entre as seqüências de subtipo C dos recombinantes indicam uma forte relação de ancestralidade comum entre elas. Através desta análise, nós encontramos três padrões distintos de recombinação, indicando que os eventos de recombinação entre os subtipos B e C estão ocorrendo com alta freqüência no sul do Brasil. Esta elevada taxa de recombinação pode ser claramente

endereçada às altas taxas de prevalência destes dois subtipos nesta região geográfica. Considerando-se ainda que os indivíduos RS021 e RS022, infectados por vírus mosaicos C/B, estavam infectados desde 1998 (Tabela 4.1.1), e que o primeiro recombinante BC circulante no Brasil foi detectado entre 1992 e 1993 (CORNELISSEN et al., 1996), nós podemos especular que eventos de recombinação entre estes dois subtipos de HIV-1 estão ocorrendo no país há mais de 10 anos. Este achado contrasta com relatos anteriores os quais sugerem que estes eventos começaram a ocorrer mais recentemente (SOARES E. et al., 2003). Uma vez circulante na população, estas cepas recombinantes podem adquirir vantagens adaptativas com relação à transmissão e à disseminação, desta forma, o seu reconhecimento e caracterização devem ser encarados como medidas importantes para a manutenção da vigilância da epidemia no país. Apesar da alta frequência com que os eventos vêm ocorrendo, nenhuma forma recombinante circulante (CRF) envolvendo vírus brasileiros do subtipo C foi descrita até o momento. Para tanto, estudos mais complexos envolvendo a caracterização de genomas completos de cepas brasileiras deste subtipo são necessários. Os isolados obtidos neste trabalho podem vir a contribuir como matéria-prima para estes estudos futuros.

Ainda com relação à classificação dos subtipos das seqüências, na análise da região *env* (Figura 4.2.1), a amostra RS019 agrupou junto com as seqüências de referência do subtipo F1 (“bootstrap” igual 97), porém formando um grupo irmão junto com a RS020. Quando analisamos esta amostra na região *gag* (Figura 4.2.2), a mesma saiu separada de todas as outras seqüências. Entretanto, na análise de subtipagem pela ferramenta REGA HIV-1 (dados não mostrados), RS019 foi classificada como subtipo F1 (“bootstrap” igual a 70) em *gag* também. Além disso, a análise de “Bootscanning” desta amostra (Figura 4.2.3 (c)) mostrou que ela é mais relacionada com a seqüência de referência do subtipo F do que com qualquer outra seqüência em ambas as regiões genômicas. Assim, possivelmente esta amostra representa um vírus do subtipo F que sofreu um grau considerável de variação e, de fato, algumas mudanças notáveis foram observadas nas suas seqüências. Por exemplo, esta amostra apresentou duas inserções de aminoácidos na sua seqüência *gag*, o que poderia estar contribuindo para “tirá-la” do agrupamento na árvore. Finalmente, quando analisamos a reconstrução filogenética com base nas seqüências concatenadas de *env* e *gag* (Figura 4.6.1), a amostra RS019 agrupou junto com a RS020 em um grupo irmão das seqüências de referência do subtipo F1 (“bootstrap” igual a 75) em uma topologia bastante semelhante à da análise isolada da região *env* (Figura 4.2.1). Uma observação que poderia explicar, pelo menos em parte, a topologia na qual uma amostra classificada como F aparece mais relacionada com uma amostra BF do que com outras seqüências do subtipo F é o fato de que, neste fragmento analisado, a seqüência de *env*, em cuja análise as seqüências RS019 e RS020 foram classificadas muito próximas, corresponde a 55% do total do fragmento. Por outro lado, este resultado reforça a idéia de que a amostra RS019 apresenta um fragmento de *gag* bastante divergente.

No presente trabalho nós descrevemos propriedades fenotípicas de isolados brasileiros do subtipo C e recombinantes C/B. Embora a mudança do fenótipo viral R5 para o fenótipo X4 esteja associada com a fase avançada da doença nas infecções causadas pelos subtipos A, B, D e CRF_AE (DE WOLF et al., 1994; TSHERNING et al., 1998), e os cinco isolados do subtipo C caracterizados tenham sido obtidos a partir de pacientes apresentando sintomas de AIDS, estes isolados utilizaram preferencialmente o correceptor CCR5 para infecção celular. Mais especificamente, quatro deles foram capazes de infectar apenas as células U87-CCR5+ e não foram capazes de induzir sincícios em células das linhagens MT-2 e SUPT-1. Nossos resultados são

consistentes com outros relatos (CECILIA et al., 2000) mostrando que o subtipo C do HIV-1 é distinto dos demais subtipos com relação à evolução da utilização do receptor de quimiocina, com a rara utilização do CXCR4, mesmo de isolados obtidos de pacientes com AIDS. Contudo, um dos nossos isolados do subtipo C (RS001) foi capaz de infectar adicionalmente células U87-CXCR4+, embora o efeito citopático observado nestas células tenha sido menor, nos três experimentos realizados, em comparação com àquele verificado para as células U87-CCR5+. De forma semelhante, a indução da formação de sincícios em células T de linhagem por este isolado foi menor do que a induzida pelos isolados recombinantes C/B. Embora este isolado duplo trópico possa representar uma mistura de populações virais com fenótipos distintos, cada uma utilizando diferentes correceptores para a entrada na célula, a baixa eficiência na utilização do receptor CXCR4 indica que este isolado representa uma variante transitória entre os dois fenótipos (PASTORE et al., 2004). Um outro estudo recente relatou que de dez isolados do subtipo C capazes de utilizar o correceptor CXCR4, nove foram capazes de utilizar também o correceptor CCR5 (JOHNSTON et al., 2003). Assim, nós podemos especular que a mudança R5-para-X4 pode ocorrer em indivíduos infectados com vírus do subtipo C, mas dado o requerimento mínimo de uma ou duas mudanças de aminoácidos na região V3 para essa mudança da utilização do correceptor (BOYD et al., 1993; CHESEBRO et al., 1996), e a rara observação de variantes X4 entre os pacientes infectados com o subtipo C, nós acreditamos que deve haver pressão seletiva para a manutenção das cepas R5. Essa pressão seletiva pode está sendo gerada por fatores do hospedeiro como prevalência de tipos celulares (apresentando diferentes níveis de expressão das moléculas CCR5 e CXCR4), níveis de quimiocinas, eficiência da resposta imune humoral e CTL e/ou por propriedades intrínsecas do vírus (PASTORE et al., 2004).

Em associação com as características biológicas, a análise das seqüências de aminoácidos da alça V3 mostrou que esta região genômica está muito mais conservada (Tabela 4.4.1) e possui carga total menor nos vírus do subtipo C do que nos vírus do subtipo B, o que é consistente com o fenótipo NIS e R5 da maioria dos isolados do subtipo C. Outros estudos reportaram previamente uma maior conservação da alça V3 nos vírus do subtipo C comparados com vírus de outros subtipos (KORBER et al., 1994; GASCHEN et al., 1999). A manutenção de cepas com baixa carga positiva na alça V3 em indivíduos infectados com o subtipo C poderia estar favorecendo a presença de variantes virais com maiores chances de serem transmitidas do que os vírus com cargas maiores e apresentando fenótipo X4. A idéia da existência de uma pressão para a conservação da alça V3 nos isolados do subtipo C pode ser sustentada pelo fato de que, apesar da existência de 18 substituições de aminoácidos específicas das seqüências do Brasil do subtipo C no

fragmento estudado (o que representa 10% da seqüência), nenhuma delas ocorreu dentro desta região genômica. Entretanto, a substituição V295N das seqüências brasileiras (Figura 4.5.1) originou um novo sítio de N-glicosilação na posição -1 em relação ao início da V3 o qual encontra-se, em geral, ausente na maioria dos vírus do subtipo C (GORDON et al., 2003). Um estudo anterior sugeriu que a ausência deste sítio estaria associada com a presença de um sítio de fosforilação na posição 11 da alça V3 (determinado pela presença de um aminoácido serina nesta posição), e que esta associação estaria contribuindo para uma utilização eficiente do correceptor CCR5 pelos vírus do subtipo C (GORDON et al., 2003). Contudo, os isolados do subtipo C descritos neste estudo, efetivos na utilização do correceptor CCR5, apresentaram ambos os sítios de N-glicosilação e de fosforilação. Assim, estudos futuros poderão esclarecer melhor a real importância destes sítios no processo de entrada do vírus na célula. Uma outra observação com relação à alça V3 é que, com base na predição do fenótipo através da seqüência de aminoácidos, entre os três isolados capazes de utilizar o receptor CXCR4, somente o RS022 apresentou resultados concordantes entre estes dois métodos (caracterização biológica *in vitro* e predição através da seqüência). Os isolados R5X4 RS001 e RS021 não apresentaram aminoácidos básicos nas posições 11 e 25 e suas cargas totais foram +3 e +4, respectivamente, semelhante à carga dos vírus R5 e NIS. A ausência de correlação entre a seqüência de aminoácidos da alça V3 e a capacidade de induzir sincícios *in vitro* de isolados de diferentes subtipos genéticos, inclusive do subtipo B vem sendo relatada em outros trabalhos (HOLM-HANSEN et al., 1995; SABRI et al., 1996). Por exemplo, Peeters e colaboradores (1999) observaram que somente 4 de 12 (33,3%) isolados IS apresentaram aminoácidos básicos nas posições 11 e/ou 25 da alça V3. As características genéticas da alça V3 dos isolados duplo-trópicos RS001 e RS021 junto com estes relatos podem significar evidências de que outras regiões do gene *env*, além da V3, podem contribuir para o tropismo viral. De fato, outros estudos envolvendo caracterização de vírus duplo-trópicos demonstraram que resíduos dentro das alças V4 e V5 da glicoproteína gp120, assim como, resíduos dentro da gp41, contribuem para o fenótipo X4 (HU et al., 2000; SINGH et al., 2000). Por outro lado ainda, um dos nossos isolados do subtipo C R5/NIS apresentou carga total igual a +5 na região V3, enquanto que, o isolado recombinante C/B RS021, que foi classificado como R5X4/IS, apresentou carga total igual a +4 nesta região. Essas observações em conjunto sugerem que a classificação do fenótipo viral não deve se basear apenas na detecção através de métodos genéticos e que diferentes isolados de HIV-1 podem desenvolver estratégias moleculares distintas para a mudança da utilização do correceptor. Deve-se considerar ainda que estas diferenças podem ser alternativamente atribuídas à presença de populações distintas (quasispécies). Uma vez que os isolados obtidos não representam clones e que as seqüências das amostras foram obtidas a partir de PBMC, e considerando-se que estas técnicas (isolamento viral e

PCR/ sequenciamento) podem selecionar variantes virais, os dados moleculares da seqüência podem não refletir os dados da cultura.

Entre as nossas amostras, os eventos de recombinação detectados ocorreram sempre com o subtipo C na região *gag* e com o subtipo B na região *env*. Uma vez que estes vírus mosaicos foram provenientes de pacientes que se encontravam em estágios avançados da doença, e considerando-se que a mudança do fenótipo R5 para o fenótipo X4 ocorre em pelo menos 50% dos indivíduos infectados com o subtipo B que atingem a fase de AIDS (KARLSSON et al., 1994; CONNOR *et al.*, 1997), a seleção e expansão destas variantes pode estar relacionada a funções biológicas do envelope do subtipo B. De fato, os dois recombinantes C/B caracterizados quanto as suas propriedades biológicas foram classificados como vírus duplo-trópicos e indutores de sincícios, funções muito mais frequentemente observadas entre cepas do subtipo B.

Ainda em relação aos recombinantes RS021 e RS022, suas seqüências foram muito similares, apresentando 96.9% e 94.4% de identidade em *gag* e em *env* respectivamente. Uma vez que estes vírus foram isolados a partir de dois irmãos gêmeos, muito similares em suas características genéticas, a forte influência do ambiente hospedeiro (VAN OPIJNEN; BERKHOUT, 2005) pode ter atuado como agente modulador do genótipo e fenótipo viral. Por outro lado, ambos os pacientes devem ter sido infectados através do uso de drogas injetáveis, o que leva à possibilidade de que um deles tenha transmitido o vírus para o outro ou que eles tenham sido infectados a partir de uma mesma rota de transmissão.

Através deste estudo, nós identificamos características moleculares e biológicas de isolados de HIV-1 circulantes no Brasil. Apesar do número limitado da amostra, foi observada uma grande diversidade de genótipos virais, com participação marcante de vírus recombinantes. Vale a pena ressaltar que uma diversidade ainda maior é esperada dentro dessa população, uma vez que somente parte do genoma dos vírus foi caracterizada. A detecção destas variantes virais tem implicações para a vigilância da epidemia e para a reavaliação de medidas profiláticas e terapêuticas considerando-se que estes eventos de recombinação são resultantes de episódios de co-infecção. Além disso, nós observamos diferenças moleculares entre os subtipos B e C, bem como confirmamos a existência de diferenças biológicas entre estes dois subtipos, o que levanta a questão de como e se estas diferenças influenciam na determinação do curso da infecção pelo HIV-1.

6. CONCLUSÕES

Concluimos com nossos resultados que a epidemia de HIV/AIDS no sul do Brasil é caracterizada por uma grande diversidade de genótipos virais, onde os subtipos B, C e F e recombinantes BC e BF estão co-circulando.

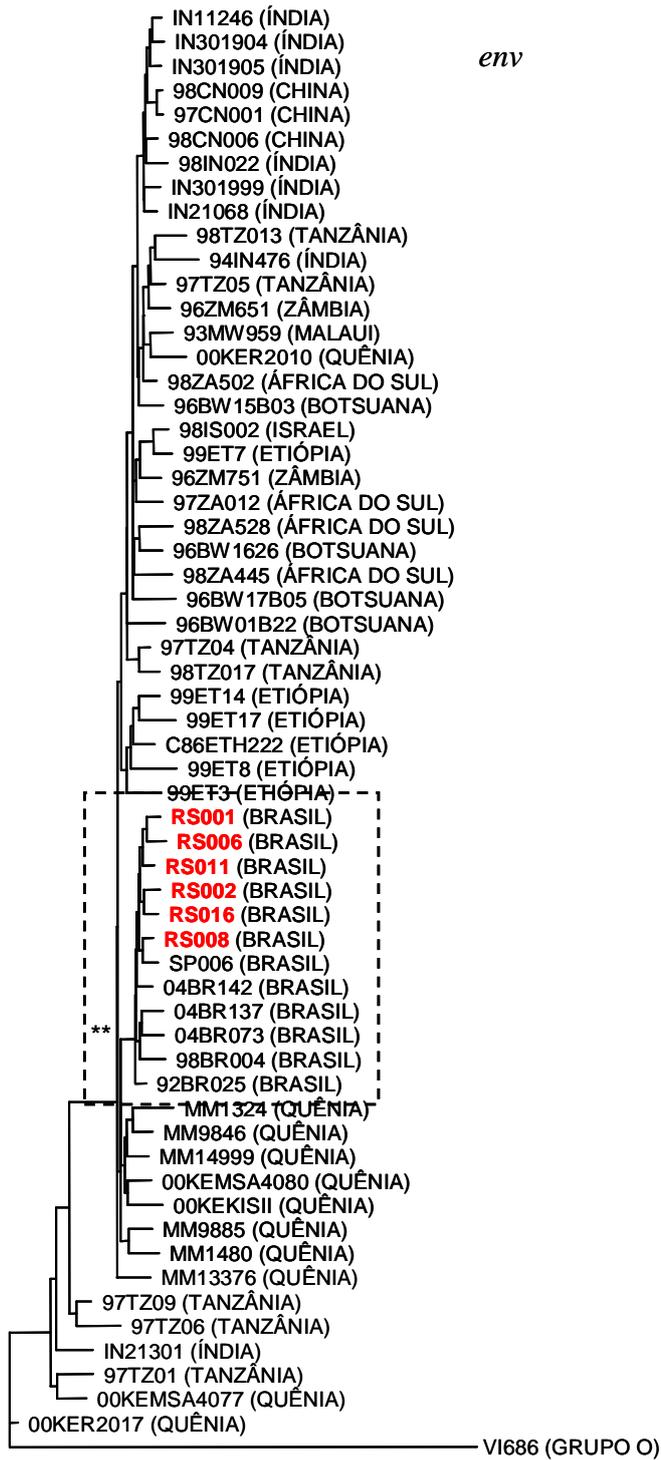
Os resultados de caracterização genotípica das amostras confirmam relatos anteriores sugerindo que a prevalência do subtipo C na região sul do Brasil está aumentando desde a sua introdução. Com base na caracterização molecular das regiões genômicas *gag* e *env*, observou-se prevalência significativamente maior de subtipo C para a região *gag* (54,5%), comparada com a região do envelope (27,3%), refletindo a importância da caracterização de mais de um gene para subtipagem e vigilância epidemiológica no país.

A formação de um grupo monofilético pelas seqüências do subtipo C do Brasil, através de reconstrução filogenética, a baixa diversidade genética entre elas em comparação com seqüências de subtipo C de outras regiões geográficas e a existência de um padrão de assinaturas de aminoácidos nestas seqüências sugerem que a entrada deste subtipo no país representou um evento recente causado por uma única linhagem viral.

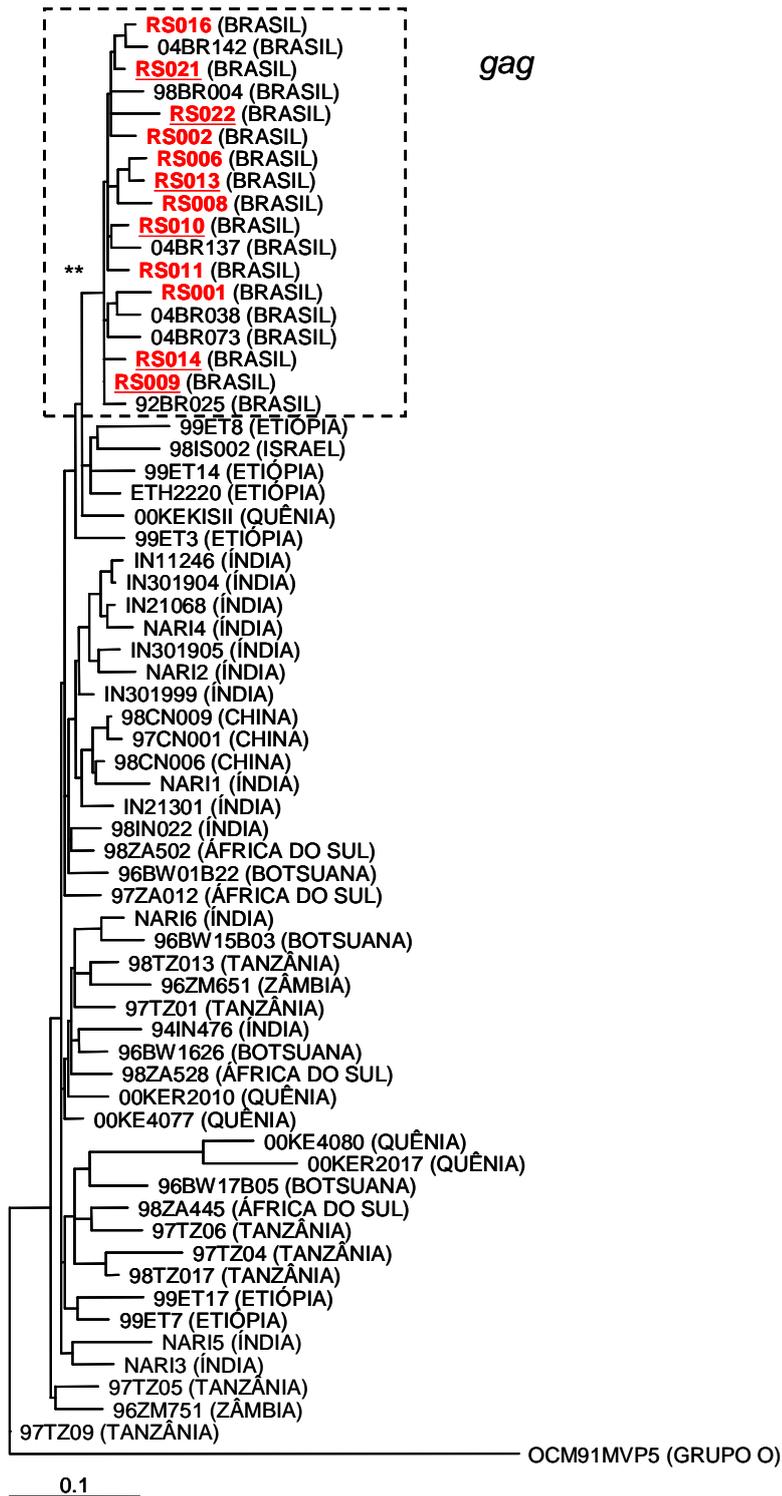
Eventos de recombinação são processos comuns entre diferentes genótipos de HIV-1 em co-circulação em uma mesma região geográfica. Foi observada uma alta proporção (27,3%) de formas recombinantes entre os subtipos B e C entre as amostras estudadas, o que representa provavelmente o reflexo das altas taxas de prevalência destes subtipos na região sul do país. A observação de três padrões distintos de recombinação e a presença de assinaturas de aminoácidos brasileiras indicam que os eventos estão ocorrendo em elevadas taxas há mais de dez anos no Sul do Brasil.

A caracterização biológica dos isolados mostrou que a utilização do correceptor CXCR4 ocorreu raramente entre os isolados do subtipo C. A análise das seqüências de aminoácidos da alça V3 mostrou que nos vírus do subtipo C esta região genômica está muito mais conservada e possui carga total menor do que nos vírus do subtipo B, o que é consistente com o fenótipo NIS e R5 da maioria dos isolados do subtipo C.

ANEXOS



Anexo A: Análise filogenética Máxima Verossimilhança (“Maximum Likelihood”) mostrando a relação dos vírus do Brasil do subtipo C do HIV-1 com isolados do subtipo C de diferentes regiões geográficas com base nas seqüências do envelope. A seqüência VI686 do grupo O do HIV-1 foi utilizada como grupo externo. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de $p < 0,001$. As seqüências geradas neste estudo estão representadas em vermelho.



Anexo B: Análise filogenética Máxima Verossimilhança (“Maximum Likelihood”) mostrando a relação dos vírus do Brasil do subtipo C do HIV-1 com isolados do subtipo C de diferentes regiões geográficas com base nas seqüências de *gag*. A seqüência OCM91MVP5 do grupo O do HIV-1 foi utilizada como grupo externo. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de $p < 0,001$. As seqüências geradas neste estudo estão representadas em vermelho e aquelas com subtipo discordante em relação à *env* estão sublinhadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Abebe A, Demissie D, Goudsmit J, Brouwer M, Kuiken CL, Pollakis G, *et al.* HIV-1 subtype C syncytium- and non-syncytium-inducing phenotypes and coreceptor usage among Ethiopian patients with AIDS. *AIDS* 1999; 13: 1305-11.
- Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994; 76: 853-64.
- Alaesus A. Significance of HIV-1 Genetic Subtypes. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 455-463.
- Anderson DJ, Politch JA, Tucker LD, Fichorova R, Haimovici F, Tuomala RE, *et al.* Quantitation of mediators of inflammation and immunity in genital tract secretions and their relevance to HIV type 1 transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14 Suppl 1: S43-9.
- Arendrup M, Nielsen C, Hansen JE, Pedersen C, Mathiesen L, Nielsen JO. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5: 303-7.
- Arien KK, Abraha A, Quinones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 2005; 79: 8979-90.
- Back NK, Smit L, De Jong JJ, Keulen W, Schutten M, Goudsmit J, *et al.* An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization. *Virology* 1994; 199: 431-8.
- Ball SC, Abraha A, Collins KR, Marozsan AJ, Baird H, Quinones-Mateu ME, *et al.*, Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J Virol* 2003; 77: 1021-38.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Charnaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871.
- * De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style) – Grupo de Vancouver
- Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 1996; 348: 31-35.
- Berger EA. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 1997; 11 Suppl A: S3-16.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Ann Rev Immunol* 1999; 17: 657-700.
- Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, *et al.* Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 1997; 71: 7478-87.

Bjorndal A, Sonnerborg A, Tscherning C, Albert J, Fenyo EM. Phenotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates of Ethiopian AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 647-53.

Blackard JT, Renjifo BR, Mwakagile D, Montano MA, Fawzi WW, Essex M. Transmission of human immunodeficiency type 1 viruses with intersubtype recombinant long terminal repeat sequences. *Virology* 1999; 254: 220-225.

Blackard JT, Renjifo B, Fawzi W, Hertzmark E, Msamanga G, Mwakagile D, *et al.* HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission. *Virology* 2001; 287: 261-5.

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

Bongertz V, Costa CI, Santos VG, Joao Filho EC, Galvao-Castro B, Morgado MG. Correlation between susceptibility of primary HIV-1 isolates to autologous and heterologous neutralizing antibodies. *AIDS* 1997; 11: 969-75.

Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez JC, *et al.* HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23: 184-193.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68: 6103-10.

Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997; 3: 205-11.

Boyd MT, Simpson GR, Cann AJ, Johnson MA, Weiss RA. A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol* 1993; 67: 3649-52.

Braaten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* 1996; 70: 3551-60.

Brindeiro R, Vanderborgh B, Caride E, Correa L, Oravec RM, Berro O, *et al.* Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1674-80.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brígido L, *et al.* Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNET): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17: 1063-1069.

Brown BK, Darden JM, Tovanabutra S, Oblander T, Frost J, Sanders-Buell E, *et al.* Biologic and genetic characterization of a panel of 60 human immunodeficiency virus type 1 isolates, representing clades A, B, C, D, CRF01_AE, and CRF02_AG, for the development and assessment of candidate vaccines. *J Virol* 2005; 79: 6089-6101.

Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994; 8: 1123-8.

Burke DS, McCutchan FE. Global distribution of human immunodeficiency virus type 1 clades. In: DeVita VT, Hellman LJr., Rosenberg SA (ed). AIDS: biology, diagnostics, treatment and prevention. 4th ed. New York: Lippencott-Raven Publishers; 1996. P. 119-126.

Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* 2000; 132: 71-91.

Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, *et al.* Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 2001; 275: 107-115.

Carr JK, Salminen MO, Koch C, Gotte D, Artenstein AW, Hegerich PA, *et al.* Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 1996; 70: 5935-5943.

Casado G, Thomson MM, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40: 532-7.

Casper CH, Clevestig P, Carlenor E, Leitner T, Anzen B, Lidman K, *et al.* Link between the X4 phenotype in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers and their children, despite the early presence of R5 in the child. *J Infect Dis* 2002; 186: 914-21.

Cecilia D, Kulkarni SS, Tripathy SP, Gangakhedkar RR, Paranjape RS, Gadkari DA. Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *Virology* 2000; 271: 253-258.

Chackerian B, Rudensy LM, Overbaugh J. Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. *J Virol* 1997; 71: 7719-7727.

Chan DC, Kim OS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998;93: 681-684.

Chan SY, Speck RF, Power C, Gaffen SL, Chesebro B, Goldsmith MA. V3 recombinants indicate a central role for CCR5 as a coreceptor in tissue infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1999; 73: 2350-8.

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 Virol* 1996; 70: 9055-9.

Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, *et al.* The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85: 1135-48.

Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, *et al.* The orphan seven-transmembrane receptor Apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dual tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 72: 6113-6118.

Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, Olson WC, *et al.* The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* 2003; 77: 4449-4456.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270: 1811-5.
Coffin JM. HIV population dynamics *in vivo*: Implications for genetics variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267: 483-489.

Cohen EA, Subbramanian RA, Gottlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 214: 219-35.

Cohen OJ, Kinter A, Fauci AS. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol Rev* 1997; 159: 31-48.

Cohen OJ, Weissman D, Fauci AS. The immunopathogenesis of HIV infection. In: William E Paul. *Fundamental immunology*. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.

Collins KL, Chen BK, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 397-401.

Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 1993; 67: 1772-7.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185: 621-8.

Corbet S, Muller-Trutwin MC, Versmissen P, Delarue S, Ayoub A, Lewis J, *et al.* env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* 2000; 74: 529-34.

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

Cornelissen M, Mulder-Kampinga G, Veenstra J, Zorgdrager F, Kuiken C, Hartman S, *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 Virol* 1995; 69: 1810-8.

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 Virol* 1996; 70: 8209-12.

Couto-Fernandez, J.C.; Morgado, M.G.; Bongertz, V.; Tanuri, A.; Andrade, T.; Brites, C.; *et al.* HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 22: 288-293.

Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 73-8.

Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, Duarte G, 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: 74-9.

Csillag C. HIV-1 subtype C in Brazil. *Lancet* 1994; 344: 1354.

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 by single amino acid substitution. *J Virol* 1992; 66: 6777-80.

Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, *et al.* Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 *env* genes. *Science* 1993; 262:1257-1261.

De Martinez AM, Barbosa EF, Ferreira PC, Cardoso FA, Silveira J, Sassi G, *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 471-476.

Deng H, Unutmaz D, Kewal-Ramani V, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 1997; 388: 296-300.

De Oliveira T, Bishop K, Danaviah S, Cassol S. Changing dynamics of HIV-1 subtype diversification in Africa. 8th HIV Dynamics and Evolution Meeting, Paris, 27-29 April 2001.

De Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, *et al.* An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005; 21: 3797-800.

De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Casiero MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 1-13.

Descamps D, Collin G, Loussert-Ajaka I, Saragosti S, Simon F, Brun-Vezinet F. HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs. *AIDS* 1995; 9: 977-8.

De Wolf F, Hogervorst E, Goudsmit J, Fenyo EM, Rubsamen-Waigmann H, Holmes H, *et al.* Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics. WHO Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1387-400.

Doe B, Steimer KS, Walker CM. Induction of HIV-1 envelope (gp120)-specific cytotoxic T lymphocyte responses in mice by recombinant CHO cell-derived gp120 is enhanced by enzymatic removal of N-linked glycans. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2369-2376.

Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51: 151-178.

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

Doranz B, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, *et al.* 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.

Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, *et al.* A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5639-5644.

Dumans AT, Soares MA, Pieniazek D, Kalish ML, De Vroey V, Hertogs K, *et al.* Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3075-9.

Esparza J, Bhamarapravati N. Accelerating the development and future availability of HIV-1 vaccines: why, when, where, and how? *Lancet* 2000; 355: 2061-2066.

Ezzell C. AIDS drugs gets green light. *Nature* 1987, 329: 751.

Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; 262: 1011-1018.

Fenyö EM, Morfeld-Mansin L, Chiodi F, Lind B. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol* 1988; 62: 4414-4419.

Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, *et al.* Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992; 66: 3183-7.

Fouchier RA, Brouwer M, Broersen SM, Schuitemaker H. Simple determination of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing V3 genotype by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 906-11.

Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 1-25.

Gadelha SR, Shindo N, Cruz JN, Morgado MG, Galvao-Castro B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 461-463.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224: 500-503.

Gao F, Morrison SG, Robertson DL, Thornton CL, Craig S, Karlsson G *et al.* Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. The WHO and NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization. *J Virol* 1996a; 70: 1651-67.

Gao F, Robertson DL, Morrison SG, Hui H, Craig S, Decker J, *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* 1996b; 70: 7013-29.

Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Morrison SG, Jian B, Chen Y, *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 Virol* 1998; 72: 5680-98.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397: 436-441.

Gaschen B, Korber B, Foley B. Global variation in the V3 region. Part VII. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.M. 1999. [citado em Dezembro/2005] Disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/HTML/99compendium.html>.

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

Glushakova S, Grivel JC, Fitzgerald W, Sylwester A, Zimmerberg J, Margolis LB. Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nat Med* 1998; 4: 346-9.

Gordon G, De Oliveira T, Bishop K, Coovadia HM, Madurai L, Engelbrecht S, *et al.* Molecular Characteristics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Viruses from KwaZulu-Natal, South Africa: Implications for Vaccine and Antiretroviral Control Strategies. *J Virol* 2003; 77: 2587-2599.

Goudsmit J, Debouck C, Meloen RH, Smit L, Bakker M, Asher DM, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4478-82.

Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002; 8: 673-680.

Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003; 77: 11708-17.

Guimaraes ML, Bastos FI, Telles PR, Galvao-Castro B, Diaz RS, Bongertz V, *et al.* Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J Clin Virol* 2001; 21: 143-151.

Guimarães ML, Moreira AS, Loureiro R, Galvão-Castro B, The Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, Morgado MG. High Frequency of Recombinant Genomes in HIV Type 1 Samples from Brazilian Southeastern and Southern Regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:1261-1269.

Gürtler LG. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl* 1996; 11: 195-202.

Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000; 287: 607-614.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *NAS* 1999; 41: 95-98.

Harrigan PR, Bloor S, Larder BA. Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. *J Virol* 1998; 72: 3773-8.

Heyndriks L, Janssens W, Zekeng L, Musinda R, Anagonou S, Van Der Awera G, *et al.* Simplified strategy for detection of recombinant HIV-1 group M isolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. *J Virol* 2000; 74:363-370.

Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1986; 339: 389-392.

HIV databases. Los Alamos National Laboratory. 2001 [citado em Janeiro/2006]. Disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>.

Hoffman NG, Seillier-Moisewitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 2002; 76: 3852-64.

Holm-Hansen C, Grothues D, Rustad S, Rosok B, Pascu FR, Asjo B. Characterization of HIV type 1 from Romanian children: lack of correlation between V3 loop amino acid sequence and syncytium formation in MT-2 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 597-603.

Hope TJ. Viral RNA export. *Chem Biol* 1997; 4: 335-44.

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: 210-216.

Hu DJ, Vanichseni S, Mastro TD, Raktham S, Young NL, Mock PA, *et al.* Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. *AIDS* 2001; 15: 683-91.

Hu QX, Barry AP, Wang ZX, Connolly SM, Peiper SC, Greenberg ML. Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 envelope during infection reveals molecular corollaries of specificity for coreceptor utilization and AIDS pathogenesis. *J Virol* 2000; 74: 11858-72.

Ivanoff LA, Dubay JW, Morris JF, Roberts SJ, Gutshall L, Sternberg EJ, *et al.* V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *Virology* 1992; 187: 423-32.

Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, *et al.* Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol* 2000; 74: 3740-51.

Johansson B, Sherefa K, Sonnerborg A. Multiple enhancer motifs in HIV type 1 strains from Ethiopia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 761-4.

John G, Neilson J, Lewis P, Overbaugh J, Nduati RW, Mbori-Ngacha DA, *et al.* HIV-1 subtype and shedding of cervicovaginal HIV-1 DNA during pregnancy, abstr. 13117. *In* Program of 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, 1998.

Johnston ER, Zijenah LS, Mutetwa S, Kantor R, Kittinunvorakoon C, Katzenstein DA. High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *J Virol* 2003; 77: 7682-7688.

Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med* 1998; 339: 33-39.

Kaleebu P, Ross A, Morgan D, Yirrell D, Oram J, Rutebemberwa A, *et al.* Relationship between HIV-1 Env subtypes A and D and disease progression in a rural Ugandan cohort. *AIDS* 2001; 15: 293-9.

Kanki P, Travers K, Mboup S. Slower Heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 1994; 343: 943-946.

Kanki P, Hamel DJ, Sankale JL, Hsieh CC, Thior I, Barin F, *et al.* HIV-1 subtypes differ in disease progression. *J. Infect. Dis* 1999; 179: 68-73.

Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 1987; 330: 489-493.

Karlsson A, Parsmyr K, Sandstrom E, Fenyo EM, Albert J. MT-2 cell tropism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 364-70.

Karn, J. Tackling Tat. *J Mol Biol* 1999; 293: 235-254.

Kato K, Sato H, Takebe Y. Role of naturally occurring basic amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop on viral coreceptor usage and cell tropism. *J Virol* 1999; 73: 5520-6.

Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 133-73.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-120.

Klimkait T, Strebek K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol.* 1990; 64: 621-9.

Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, *et al.* Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993; 118: 681-8.

Korber BT, MacInnes K, Smith RF, Myers G. Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994; 68:6730-44.

Kotler DP, Reka S, Borcich A, Cronin WJ. Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. *Am J Pathol* 1991; 139: 823-30.

Koulinska IN, Ndung'u T, Mwakagile D, Msamanga G, Kagoma C, Fawzi W, *et al.* A new human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form from Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 423-31.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001; 17: 1244-5.

Kunanusont C, Foy HM, Kreiss JK, Rerks-Ngarm S, Phanuphak P, Raktham S, et al. HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. *Lancet* 1995; 345: 1078-83.

Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 1998; 393: 648-59.

Lahdevirta J, Maury CP, Teppo AM, Repo H. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1988; 85: 289-91.

Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Mariotti M, Thauvin M, Lerable J, Salpêtrier J, Morand-Joubert L. The risk of disease progression is determined during the first year of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1998; 177: 1541-8.

Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 10373-82.

Li Y, Rey-Cuille MA, Hu SL. N-linked glycosylation in the V3 region of HIV type 1 surface antigen modulates coreceptor usage in viral infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1473-9.

Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 1997; 185: 2015-23.

Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* 1991; 87: 1462-6.

Margolis LB, Glushakova S, Grivel JC, Murphy PM. Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines. *J Clin Invest* 1998; 101: 1876-80.

Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, *et al.* Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 2003; 114: 21-31.

Marlink R, Kanki P, Thior I. Reduced rates of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994; 265: 1587-1590.

Marozsan AJ, Moore DM, Lobritz MA, Fraundorf E, Abraha A, Reeves D, *et al.* Differences in the Fitness of Two Diverse Wild-Type Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates Are Related to the Efficiency of Cell Binding and Entry. *J Virol* 2005; 79: 7121-7134.

Marx PA, Chen Z. The function of simian chemokine receptors in the replication of SIV. *Semin Immunol* 1998; 10: 215-223.

Matsuyama T, Kobayashi N, Yamamoto N. Cytokines and HIV infection: is AIDS a tumor necrosis factor disease? *AIDS* 1991; 5: 1405-17.

McCormick-Davis C, Dalton SB, Singh DK, Stephens EB. Comparison of Vpu sequences from diverse geographical isolates of HIV type 1 identifies the presence of highly variable domains, additional invariant amino acids, and a signature sequence motif common to subtype C isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1089-95.

Mccutchan FE, Viputtigul K, De Souza MS, Carr JK, Markowitz LE, Buapunth P, *et al.* Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 801-805.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200: 761-70.

Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-70. Erratum in: *Science* 1997;275: 14.

Ministério da Saúde: AIDS no Brasil: um esforço conjunto governo – sociedade / Coordenação Nacional de DST e AIDS, 1998.

Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico AIDS e DST. Ano II0 nº01 - 1ª à 26ª semanas epidemiológicas – janeiro a junho de 2005- ISSN: 1517-1159.

Montano MA, Novitsky VA, Blackard JT, Cho NL, Katzenstein DA, Essex M. Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Virol* 1997; 71: 8657-8665.

Montano MA, Nixon CP, Ndung'u T, Bussmann H, Novitsky VA, Dickman D, *et al.* Elevated tumor necrosis factor- α activation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Southern Africa is associated with an NF- κ B enhancer gain-of-function. *J Infect Dis* 2000; 181: 76-81.

Morgado MG, Sabino E, Sphaer E, Bongertz V, Brígido L, Guimarães MDC, *et al.* Polymorphism in the V3 region on the envelope protein of HIV-1 in Brazil: divergence from prevalent North American/European subtype B strains and identification of newly described F subtype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 569-576.

Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBWG, Neves JR, Costa CI, Veloso Dos Santos VG, *et al.* Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 339-3.

Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves JRI, Veloso VG, *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 AIDS and Hum Retrovirology* 1998a; 18: 488-494.

Morgado MG, Guimarães ML, Neves JRI, Veloso VG, Linhares-De-Carvalho MI, Castello-Branco, *et al.* Polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998b; 93: 383-386.

Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 143-150.

Morris L, Cilliers T, Bredell H, Phoswa M, Martin DJ. CCR5 is the major coreceptor used by HIV-1 subtype C isolates from patients with active tuberculosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 697-701.

Naghavi MH, Schwartz S, Sonnerborg A, Vahlne A. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1293-1303.

Nannini EC, Okhuysen PC. HIV1 and the gut in the era of highly active antiretroviral therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4: 392-8.

National Center for Infectious Diseases Division of HIV/AIDS, Castro KG, Ward JW, Slutsker L, Buehler JW, Jaffe HW, *et al.* 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR Recommendations and Reports* [serial online] 1992 [citado em Janeiro/2006]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm>.

Neilson JR, John GC, Carr JK, Lewis P, Kreiss JK, Jackson S, *et al.* Subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya. *J Virol* 1999; 73: 4393-403.

Nicholas KB, Nicholas H B J, Deerfield D W in GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation (*EMBNEW NEWS* 30). 1997

Novella IS, Duarte EA, Elena SF, Moya A, Domingo E, Holland JJ. Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5841-4.

Novitsky VA, Montano MA, McLane MF, Renjifo B, Vannberg F, Foley BT, *et al.* Molecular cloning and phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C: a set of 23 full-length clones from Botswana.. *J Virol* 1999; 73: 4427-4432.

Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, *et al.* The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382: 833-835.

Page RD. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996; 12: 357-358.

Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyins H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, *et al.* Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 1994; 370: 463-7.

Pantaleo G, Fauci S. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 825-54.

Pastore C, Ramos A, Mosier DE. Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *J Virol* 2004; 78: 7565-74.

Peeters M, Vincent R, Perret JL, Lasky M, Patrel D, Liegeois F, *et al.* Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20: 115-121.

Peeters M. Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. In: *HIV Sequence compendium*. Los Alamos National Laboratory, New México; 2000.

Peeters M. The genetic variability of HIV-1 and its implications. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 222-5.

Peter F. HIV nef: The mother of all evil? *Immunity* 1998; 9: 433-7.

Phair JP. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 883-5.

Philpott S, Weiser B, Anastos K, Kitchen CM, Robison E, Meyer WA 3rd, et al. Preferential suppression of CXCR4-specific strains of HIV-1 by antiviral therapy. *J Clin Invest* 2001; 107: 431-8.

Plummer FA. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV): interactions of conventional sexually transmitted diseases, hormonal contraception and HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14 Suppl 1: S5-10.

Poignard P, Klasse PJ, Sattentau QJ. Antibody neutralization of HIV-1. *Immunol Today* 1996; 17: 239-246.

Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 2001; 276: 13433-41.

Pollakis G, Abebe A, Kliphuis A, Chalaby MI, Bakker M, Mengistu Y, et al. Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic human immunodeficiency virus type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals. *J Virol* 2004; 78: 2841-52.

Puglisi JD, Tan R, Calnan BJ, Frankel AD, Williamson JR. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* 1992; 257: 76-80.

Quinones-Mateu ME, Ball SC, Marozsan AJ, Torre VS, Albright JL, Vanham G, et al. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. *J Virol* 2000; 74: 9222-33.

Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews* 2004; 5: 52-61.

Reitter JN, Means RE, Desrosiers RC. A Role for Carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nature Med* 1998; 4: 679-684.

Renjifo B, Chaplin B, Mwakagile D, Shah P, Vannberg F, Msamanga G, et al. Epidemic expansion of HIV type 1 subtype C and recombinant genotypes in Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 635-8.

Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, et al. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol* 2001; 4: 16-25.

Richman, D.D. HIV chemotherapy. *Nature* 2001, 410: 995-1001.

Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4144-4149.

Rinke de Wit TF, Tsegaye A, Wolday D, Hailu B, Aklilu M, Sanders E, *et al.* Primary HIV-1 subtype C infection in Ethiopia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 30: 463-470.

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

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, *et al.* *Human Retroviruses and AIDS 1999. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences.* Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1999.

Rodenburg CM, Li Y, Trask SA, Chen Y, Decker J, Robertson DL, *et al.* Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 161-168.

Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhake RD, Paula Ferreira JL, *et al.* Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res.* In press 2005.

Sabino E, Sphaer E, Morgado MG, Borber BT, Dias RS, Bongertz V, *et al.* Identification of an HIV-1 proviral genome recombinant between subtype B and F in PBMCs obtained from an individual in Brazil. *J Virol* 1994; 68: 6340-6346.

Sabri F, Chiodi F, Fenyo EM. Lack of correlation between V3 amino acid sequence and syncytium-inducing capacity of some HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 855-8.

Salemi M, de Oliveira T, Soares MA, Pybus O, Dumans AT, Vandamme AM, *et al.* Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol* 2005; 60: 598-605.

Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 1423-1425.

Salminen MO, Johansson B, Sonnerborg A, Ayehunie S, Gotte D, Leinikki P, *et al.* Full-length sequence of an Ethiopian human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate of genetic subtype C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 1329-1339.

Salminen MO, Carr JK, Robertson DL, Hegerich P, Gotte D, Koch C, *et al.* Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. *J Virol* 1997; 71: 2647-55.

Sanabani S, Neto WK, de Sa Filho DJ, Diaz RS, Munerato P, Janini LM, *et al.* Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 171-6.

Schellekens PT, Tersmette M, Roos MT, Keet RP, de Wolf F, Coutinho RA, *et al.* Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype. *AIDS* 1992; 6: 665-9.

Schubert U, Ferrer-Montiel AV, Oblatt-Montal M, Henklein P, Strebel K, Montal M. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett* 1996; 398: 12-8.

Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, *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 monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; 66: 1354-60.

Sha BE, D'Amico RD, Landay AL, Spear GT, Massad LS, Rydman RJ, *et al.* Evaluation of immunologic markers in cervicovaginal fluid of HIV-infected and uninfected women: implications for the immunologic response to HIV in the female genital tract. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16: 161-8.

Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, *et al.* Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73: 10489-502.

Shankarappa R, Chatterjee R, Learn GH, Neogi D, Ding M, Roy P, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 env sequences from Calcutta in eastern India: identification of features that distinguish subtype C sequences in India from other subtype C sequences. *J Virol* 2001; 75: 10479-87.

Shimizu N, Haraguchi Y, Takeuchi Y, Soda Y, Kanbe K, Hoshino H. Changes in and discrepancies between cell tropisms and coreceptor uses of human immunodeficiency virus type 1 induced by single point mutations at the V3 tip of the env protein. *Virology* 1999; 259: 324-33.

Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 1991; 349: 167-9.

Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 9434-8.

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

Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragost S, *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Med* 1998; 4: 1032-1037.

Singh A, Collman RG. Heterogeneous spectrum of coreceptor usage among variants within a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 primary-isolate quasispecies. *J Virol* 2000; 74: 10229-10235.

Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol* 1998; 72: 6646-56.

Soares EAJM, Santos RP, Pellegrini JA, Spinz E, Tanuri A, Soares MA. Epidemiologic and Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003a; 34: 520-526.

Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, *et al.* A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 2003b; 17: 11-21.

Soriano V, Gomes P, Heneine W, Holguin A, Doruana M, Antunes R, *et al.* Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* 2000; 61: 111-6.

Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, *et al.* HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 1996; 271: 1291-3.

Starcich BR, Haha BH, Shaw GM, Mcneely PD, Modrow S, Wolf H, *et al.* Identification and characterization of conserved and variable regions of the envelope gene HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986; 45: 637.

Stefani MM, Pereira GA, Martelli CM, Shindo N, Galvao-Castro B. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23: 205-207.

Subbarao S, Schochetman G. Genetic variability of HIV-1. *AIDS* 1996; suppl A: 13-23.

Swofford D. PAUP 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), 4.0b2a. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.; 1999.

Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, *et al.* HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20: 60-66.

Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, *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 Virol* 1989; 63: 2118-25.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D. The CLUSTAL_X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876-4882

Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Najera R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS* 2005; 19: 1155-63.

Tsherning C, Alaeus A, Frederiksson R. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 1998; 241: 181-188.

Turchi MD, Diaz RS, Martelli CM, Sabino EC, Da Silva WP, Filho OF, Laranjeira RR, Busch MP, Castelo A. Genetic diversity and HIV-1 incidence estimation among cocaine users in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 30: 527-32.

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

UNAIDS 2005: UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: December 2005. [citado em dezembro/2005.]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.

Valentin A, Albert J, Fenyo EM, Asjo B. Dual tropism for macrophages and lymphocytes is a common feature of primary human immunodeficiency virus type 1 and 2 isolates. *J Virol* 1994; 68: 6684-9.

Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, *et al.* Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8886-91.

Van Der Loeff M, Aaby P. Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS* 1999; 13: 69-84.

Van Harmelen J, Williamson C, Kim B, Morris L, Carr J, Karim SS, *et al.* Characterization of full-length HIV type 1 subtype C sequences from South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1527-1531.

Van Opijnen T, Berkhout B. The host environment drives HIV-1 fitness. *Rev Med Virol* 2005; 15: 219-33.

Velazquez-Campoy A, Todd MJ, Vega S, Freire E. Catalytic efficiency and vitality of HIV-1 proteases from African viral subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6062-7.

Vicente ACP, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, *et al.* The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *JAIDS* 2000; 23: 327-331.

Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; 422: 307-12.

Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S. The molecular epidemiology of HIV in Asia. [Retraction of Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S. In: *AIDS* 2001 Mar 9;15(4):545]. *AIDS* 1994; 8 Suppl 2: S13-28.

Who Network for HIV Isolation and Characterization. HIV 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.

Xiao L, Sulaiman I, Fayer R, Lal AA. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 687-91.

Yamaguchi-Kabata Y and Gojobori T. Reevaluation of amino acid variability of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 envelope glycoprotein and prediction of new discontinuous epitopes. *J Virol* 2000; 74: 4335-4350.

Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K, Takebe Y. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan Province of China. *AIDS* 2002; 16: 1401-7.

Zacharova V, Becker ML, Zachar V, Ebbesen P, Goustin AS. DNA sequence analysis of the long terminal repeat of the C subtype of human immunodeficiency virus type 1 from Southern Africa reveals a dichotomy between B subtype and African subtypes on the basis of upstream NF-IL6 motif. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13: 719-24.

Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, *et al.* Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997; 3: 1369-75.

Zeichner SL. The molecular biology of HIV. Insights into pathogenesis and targets for therapy. *Clin Perinatol* 1994; 21: 39-73.

Zhang L, He T, Talal A, Wang G, Frankel SS, Ho DD. In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J Virol* 1998; 72: 5035-45.

Zhang H, Orti G, Du Q, He J, Kankasa C, Bhat G, *et al.* Phylogenetic and phenotypic analysis of HIV type 1 env gp120 in cases of subtype C mother-to-child transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 1415-23.

Zhu T, Wang N, Carr A, Nam DS, Moor-Jankowski R, Cooper DA, *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 Virol* 1996; 70: 3098-107.

Zijenah L, Mbizvo MT, Kasule J, Nathoo K, Munjoma M, Mahomed K, Maldonado Y, Madzime S, Katzenstein D. Mortality in the first 2 years among infants born to human immunodeficiency virus-infected women in Harare, Zimbabwe. *J Infect Dis* 1998; 178: 109-13.