

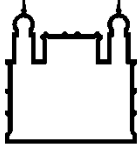
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM
INDIVÍDUOS SOROPOSITIVOS DO RIO DE JANEIRO COM
DIFERENTES PERFIS DE PROGRESSÃO PARA A AIDS

THAYSSE CRISTINA NEIVA FERREIRA LEITE

Rio de Janeiro
2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite

Estudo da diversidade genética do HIV-1 em
indivíduos soropositivos do Rio de Janeiro com
diferentes perfis de progressão para a Aids

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Dr^a. Monick Lindenmeyer Guimarães

RIO DE JANEIRO

2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ- RJ

L533 Leite, Thaysse Cristina Neiva Ferreira

Estudo da diversidade genética do HIV-1 em indivíduos soropositivos do Rio de Janeiro com diferentes perfis de progressão para a Aids / Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite. – Rio de Janeiro, 2012.

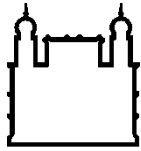
xvi, 86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.

Bibliografia: f. 55-70

1. HIV-1. 2. Subtipos. 3. Progressão. 4. Correcepto res. I. Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

THAYSSE CRISTINA NEIVA FERREIRA LEITE

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM INDIVÍDUOS
SOROPOSITIVOS DO RIO DE JANEIRO COM DIFERENTES PERFIS DE
PROGRESSÃO PARA A AIDS**

ORIENTADOR: Dr^a. Monick Lindenmeyer Guimarães

Aprovada em: 28/09/2012

EXAMINADORES:

Dr^a. Ana Carolina Paulo Vicente – **Presidente**
Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Dr^a. Esmeralda Augusta Jardim Machado Soares
Dr^a. Livia Melo Villar
Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

Rio de Janeiro, 28 de setembro de 2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação da Dr^a Monick Lindenmeyer Guimarães.

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe. Na verdade é este o saber.”

Kung-Fu-Tzu

Agradecimentos

Aos meus pais e irmã, por todo amor, carinho, e dedicação ao longo da minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado me incentivando na busca dos meus objetivos. Ao Filipe, pelo amor, companheirismo, incentivo, carinho e torcida pelo meu sucesso.

À Dr^a Monick Guimarães, minha orientadora querida, por todo ensinamento no meu início de carreira científica, toda atenção a mim dedicada, pela amizade, paciência e incentivo diário. Muito obrigada por sempre acreditar em mim e por me fazer crescer muito da iniciação científica até hoje. Não canso de repetir: tenho sorte e orgulho em ser sua aluna!

À Dr^a Mariza Morgado, por ter me recebido no Laboratório de Aids & Imunologia Molecular depositando em mim sua confiança, além de ser colaboradora na concepção e desenho do presente estudo.

À Dr^a Sylvia Teixeira, colaboradora do projeto, pelo carinho e prestatividade de sempre, e por ter contribuído bastante com o meu desenvolvimento ao longo desses quase quatro anos no laboratório, além, é claro, da excelente ajuda com as intermináveis tabelas! Muito obrigada Sylvinha, você é 10!

À Dayse Campos e Alessandra Coelho, do setor de Estatística e Documentação do IPEC/FIOCRUZ, pela preciosa ajuda com o banco de dados e análises estatísticas.

À Bianca, “minha irmã científica”, por ter estado sempre à disposição para me ajudar em qualquer coisa que eu precisasse (qualquer mesmo!), e por me fazer enxergar sempre o lado bom das coisas. Valeu, Bibi!

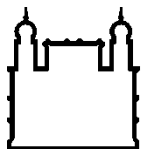
Aos amigos do LabAids, pela parceria, pelos momentos divertidos, pelas trocas de informações e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo, galera!

Às minhas companheiras do Mestrado que dividiram esta caminhada comigo, muito obrigada pela amizade que formamos e pelos vários momentos divertidíssimos!

À todos os meus amigos, gostaria de agradecer pela presença na minha vida nesses últimos anos e por compreenderem meus momentos de “sumiço”!

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de avaliar este trabalho e assim contribuir com o mesmo.

Aos órgãos que contribuíram com o financiamento deste estudo: CNPq e FAPERJ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM INDIVÍDUOS SOROPOSITIVOS DO RIO DE JANEIRO COM DIFERENTES PERFIS DE PROGRESSÃO PARA A AIDS

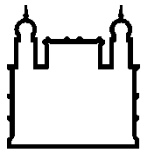
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite

A infecção pelo HIV-1 é caracterizada por um período assintomático extremamente variável entre os indivíduos, o que permitiu a descrição de diferentes perfis de progressão para aids, os quais tem sido associados a características específicas do hospedeiro e/ou do vírus, tal como o subtipo viral. Diante do exposto, como o Rio de Janeiro apresenta uma cocirculação dos subtipos B, F1, recombinantes BF1, além da variante B^{''} do subtipo B, e há um suporte do governo quanto a realização dos exames de rotina, o que permite o monitoramento dos pacientes HIV-1 positivos, foi possível a caracterização desses quanto ao perfil de progressão para aids. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a associação dos subtipos de HIV-1 circulantes no Rio de Janeiro com os distintos perfis de progressão e analisar em um subconjunto de pacientes a mudança do uso do correceptor de entrada utilizado pelo vírus em dois momentos distintos da infecção, antes e após a progressão. A casuística deste estudo foi composta por pacientes HIV-1 positivos que de acordo com seu acompanhamento clínico foram classificados nos distintos perfis de progressão para aids: Progressores Rápidos (PR – progressão em até 3 anos), Progressores Intermediários (PI - progridem a partir de 4 anos de infecção) e Não progressores de longo termo (LTNP - mais de 10 anos de infecção sem progressão). A subtipagem das amostras foi realizada a partir da região C2-V3 da gp120 do envelope viral através da análise filogenética pelo método Neighbor-Joining com modelo de substituição de Tamura-Nei, utilizando-se o programa Mega e análise de recombinação pelo método de boostcan do programa Simplot. Das 486 amostras classificadas quanto ao seu perfil de progressão, 285 eram PI, 179 PR e 22 LTNP. Destas, 238 foram caracterizadas quanto ao subtipo, sendo 84,5% pertencentes ao subtipo B (destes 28,9% B^{''}); 9,2% F1; 3,4% C; 1,3% D; 1,3% BF1 e 0,4% CRF01_AE, esta distribuição concorda com a descrita em estudos prévios com indivíduos do Rio de Janeiro. Dos 92 PR, 54,3% foram caracterizados como B, 22,8% B^{''}, 12% F1, 4,3% C, 3,3%D, 1,1% AE e 2,2% BF1. Dos 131 PI, 64,1% pertenciam ao subtipo B, 24,4% B^{''}, 7,6% F1, 3,1% C e 0,8% BF1. Dos 15 LTNP, 60% foram B, 33,3% B^{''} e 6,7% F1. Nossos achados apontam para uma maior porcentagem do subtipo F1 em PR, porém sem significância estatística. Contrapondo-se a outros estudos prévios, não foi verificada associação entre progressão mais lenta e a variante B^{''}. As análises de predição do uso do correceptor foram realizadas para 29 indivíduos. A maior parte dos indivíduos caracterizados como subtipos B, B^{''} e F1 apresentou a forma viral R5 em ambos momentos estudados, no entanto uma alta proporção de vírus X4 (42,9%) foi detectada em indivíduos classificados como B^{''}, fato que corrobora a ausência de associação da variante B^{''} com a progressão mais lenta. No seu conjunto, os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de melhor se compreender características virais que possam apontar marcadores de prognóstico para a aids.

Palavras-chave: HIV-1, subtipos, progressão, correceptores



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

GENETIC DIVERSITY OF HIV-1 SEROPOSITIVES INDIVIDUALS FROM RIO DE JANEIRO WITH DIFFERENT AIDS PROGRESSION PROFILES

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite

The HIV-1 infection is characterized by an asymptomatic period highly variable among the individuals leading to a description of different profiles to AIDS progression, which have been associated with specific characteristics of the host and/or virus, such as viral subtype. Given the above, as Rio de Janeiro city has a co-circulation of subtypes B, F1, BF1 recombinants in addition to B^{''} variant of subtype B, and there is a government support for routine exams allowing a good clinical follow up of the HIV-1 infected patients, it was possible to characterize them in the distinct AIDS progression profiles. Therefore, this study aimed to evaluate the association between HIV-1 subtypes circulating in Rio de Janeiro with distinct progression profiles and analyse the shift of the use of the coreceptor used by virus in a subset of patients at two different periods of infection, before and after progression. The subjects of this study consisted of HIV-1 seropositives which were classified according to their profile progression: rapid progressors (RP – less than to 3 years to AIDS progression), intermediate progressors (IP – progression after 4 years of infection), and long-term non-progressors (LTNP - more than 10 years of infection without progression). The samples subtyping was performed based on the C2-V3 region of gp120 of the envelope viral by using Neighbor-Joining phylogenetic inferences with Tamura-Nei substitution model, in Mega program and recombination analysis by bootscan method in Simplot. From 486 classified samples, 285 were as IP, 179 as RP and 22 as LTNP. From those, 238 were subtype characterized, being 84.5% B (28.9% B^{''}); 9.2% F1, 3.4 % C, 1.3% A, 1.3% and 0.4% CRF01_AE BF1, this distribution goes in agreement with those reported in previous studies with individuals from Rio de Janeiro. From those 92 characterized as RP, 54.3% were classified as B, 22.8% B^{''}, 12% F1, 4.3% C 3.3% D 1.1% and 2.2% AE BF1. From those 131 IP, 64.1% classified as B, 24.4% B^{''}, 7.6% F1, 3.1% C and 0.8% BF1. From those 15 LTNP, 60% were B, 33.3% B^{''} and 6.7% F1. Our findings depicted a higher percentage of sub-subtype F1 in RP, even though no statistical significance was observed. Distinct to the previous studies, no association between slower progression and variant B^{''} was verified. The coreceptor prediction analysis were performed for 29 patients. Most individuals characterized as subtypes B, B^{''} and F1 presented R5 viral form in both periods, however, a high proportion (42,9%) of X4 virus was detected in individuals classified as B^{''}, fact consistent with no association among variant B^{''} and slower progression. Taken together, our results show the necessity of better understanding the viral characteristics that may reinforce prognostic markers for AIDS.

Key words: HIV-1, subtypes, progression, coreceptors

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças infectados pelo HIV no mundo, no período de 1990 a 2010.	2
Figura 2: Estimativa do número de novas infecções pelo HIV e óbitos relacionados à aids no mundo, no período de 1990 a 2010.	2
Figura 3: Distribuição percentual dos casos de aids acumulados por região do Brasil no período de 1980 a 2011. Fonte: MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, Boletim epidemiológico, 2011.	4
Figura 4: Representação esquemática da partícula madura do HIV-1.	5
Figura 5: Representação esquemática do genoma proviral do HIV-1.	6
Figura 6: Representação esquemática da gp120 do HIV-1, demonstrando as cinco regiões conservadas (C1-C5) e as cinco regiões variáveis (V1-V5).	8
Figura 7: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1.	11
Figura 8: Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e das formas recombinantes circulantes de 2004 a 2007, com destaque para países da África Central.	14
Figura 9: Distribuição dos subtipos e CRFs predominantes do HIV-1 por região geográfica no Brasil.	16
Figura 10: Curso clínico, imunológico e virológico da infecção natural pelo HIV-1.	19
Figura 11: Padrão natural da infecção pelo HIV-1 nos três perfis de progressão para a aids: progressores rápidos, intermediários e não progressores de longo termo. Apresentando os níveis de RNA e contagem de células TCD4 em cada perfil ao longo da infecção.	21
Figura 12: Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral de 163 amostras de HIV-1.	34
Figura 13: Análise por bootscan das amostras PR21764, PI22953 e PR23149 na região C2-V3 do envelope viral.	35
Figura 14: Distribuição dos subtipos encontrados na população estudada (n=238).	36

- Figura 15:** Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras de HIV-1 subtipadas como B. 38
- Figura 16:** Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras de HIV-1 subtipadas como B, onde apenas amostras pertencentes à variante B” foram marcadas. 39
- Figura 17:** Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras de HIV-1 subtipadas como F1. 40
- Figura 18:** Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras dos indivíduos nos momentos antes (A) e após (P) a progressão. 42

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação da região gp120 do envelope viral.	27
Tabela 2: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento da região da gp120 do envelope viral.	30
Tabela 3: Dados epidemiológicos dos pacientes classificados de acordo com o seu respectivo perfil de progressão para a aids.	32
Tabela 4: Distribuição dos subtipos de HIV-1 de acordo com os diferentes perfis de progressão para a aids.	37
Tabela 5: Análise estatística entre os principais subtipos e os três perfis de progressão.	37
Tabela 6: Análise da predição do uso do correceptor de entrada com base na região da alça V3 com a utilização dos programas Geno2pheno, webPSSM e Regra das posições 11/25	44

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A	Arginina
aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Antirretroviral
CA	Capsídeo
CCR5	Receptor de alfa-quimiocinas 5
CD4	Grupamento de diferenciação 4
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CRF	Forma Recombinante Circulante
CV	Carga Viral
CXCR4	Receptor de beta-quimiocinas 4
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifostato
<i>env</i>	Gene que codifica as proteínas do envelope viral
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Glutamina
<i>gag</i>	Gene do grupo antígeno do HIV
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
gp120	Glicoproteína de 120 Kd
gp41	Glicoproteína de 41 Kd
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HXB2	Isolado Viral do HIV-1
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Kb	Kilobase

LTNP	Não progressores de longo termo
LTR	Terminações Longas Repetidas
MA	Matriz
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NC	Nucleocapsídeo
nm	Nanômetros
P	Prolina
pb	Pares de base
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Progressores Intermediários
PM	Peso Molecular
<i>pol</i>	Gene da polimerase do HIV
PR	Progressores Rápidos
R5	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CCR5
R5X4	Isolado de HIV-1 capaz de utilizar os receptores CCR5 e CXCR4
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
TBE	Tris-Ácido bórico- EDTA
TCD4	Linfócitos TCD4
TCD8	Linfócitos TCD8
TR	Transcriptase Reversa
UDI	Usuários de Drogas Injetáveis
UNAIDS	Programa das Nações Unidas no combate ao HIV/Aids
URF	Forma Recombinante Única

- V3 Terceira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
- X4 Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CXCR4

Índice

	Página
I. Introdução	
1.1. Dados epidemiológicos	1
1.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	4
1.2.1. O genoma do HIV	5
1.2.2. Ciclo de replicação do HIV	9
1.3. Origem e diversidade genética do HIV	11
1.3.1. Epidemiologia molecular do HIV-1 no mundo	13
1.3.2. Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil	15
1.4. Caracterização biológica do HIV-1	17
1.5. A infecção pelo HIV-1 e a progressão para a aids	18
II. Justificativa	22
III. Objetivos	
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
IV. Material e Métodos	
4.1. Casuística	25
4.2. Extração de DNA	26
4.3. Amplificação por “nested” PCR da região da gp120 do envelope viral	27
4.4. Extração de RNA	28
4.5. Reação de retrotranscrição e amplificação por “nested” PCR da região C2-V3 do envelope viral a partir do cDNA	28
4.6. Purificação e quantificação dos produtos de PCR para o sequenciamento	29
4.7. Reação de sequenciamento	29
4.8. Análise e edição das sequências	30
4.9. Determinação dos subtipos virais	30
4.10. Predição dos correceptores CCR5 e/ou CXCR4	31
4.11. Análises estatísticas	31
V. Resultados	
5.1. Identificação dos pacientes nos três perfis de progressão para aids e análise dos seus dados clínicos e epidemiológicos	32
5.2. Caracterização dos subtipos virais	33
5.3. Análise da distribuição dos subtipos nos distintos perfis de progressão	36
5.4. Análise temporal quanto ao uso do correceptor de entrada	41
VI. Discussão	
6.1. Identificação dos perfis de progressão para a aids	47
6.2. Caracterização molecular e distribuição dos subtipos no Rio de Janeiro	48
6.3. Análise da distribuição dos subtipos nos perfis de progressão	50

6.4. Análise temporal do uso do correceptor de entrada utilizado pelo vírus	51
VII. Conclusões	54
VIII. Referências Bibliográficas	55

I. Introdução

1.1. Dados epidemiológicos

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Coffin *et al.*, 1986). A pandemia de aids é considerada uma das mais importantes das últimas décadas, sendo caracterizada como um grande problema de saúde mundial e socioeconômico, principalmente em países em desenvolvimento, pois acomete majoritariamente a população economicamente ativa (Aids Epidemic Update, UNAIDS, 2009).

Dados da UNAIDS revelam que no ano de 2010 cerca de 34 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV no mundo, sendo 17% mais do que em 2001 (Figura 1). Deste total, 2,7 milhões de novos casos foram identificados em 2010. O número de pessoas que foram a óbito por causas relacionadas à aids nesse mesmo ano foi de 1,8 milhões, o que demonstra um decréscimo em comparação aos dados de 2,2 milhões registrados na metade da década de 2000. A prevalência dos casos de HIV/AIDS no mundo nos últimos anos tendeu a estabilização devido a significativa expansão do acesso à terapia antirretroviral pela população. Entretanto, o número de novas infecções continua elevado, devido ao crescimento da população mundial e à redução da mortalidade ao longo dos últimos anos (Figura 2) (World Aids Day Report, UNAIDS, 2011).

No início da epidemia, a maioria dos casos de aids estava relacionada a “grupos de risco” tais como homossexuais/bissexuais e usuários de drogas injetáveis. Porém, esse perfil de transmissão do HIV vem se modificando com expansão significativa entre indivíduos heterossexuais, logo, houve um aumento do número de casos de transmissão em mulheres e conseqüentemente, crianças.

A África Subsaariana continua sendo a região mais afetada pela epidemia, onde concentra 2/3 dos casos de aids no mundo, cerca de 22,9 milhões de pessoas infectadas, sendo 1,9 milhões de novos casos em 2010. Cerca de 1,5 milhões de pessoas infectadas encontram-se na América Latina, dentre as quais, 100.000 foram infectadas em 2010. Nesse mesmo ano, aproximadamente 67.000 pessoas morreram por causas relacionadas à aids nessa região (World Aids Day Report, UNAIDS, 2011).

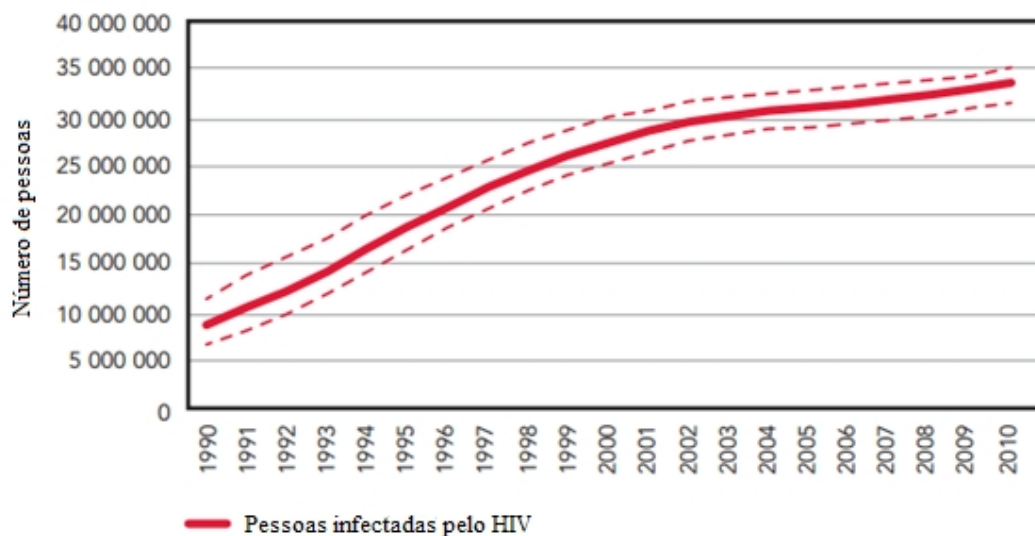


Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças infectados pelo HIV no mundo, no período de 1990 a 2010. Fonte: World Aids Day Report, 2011, UNAIDS

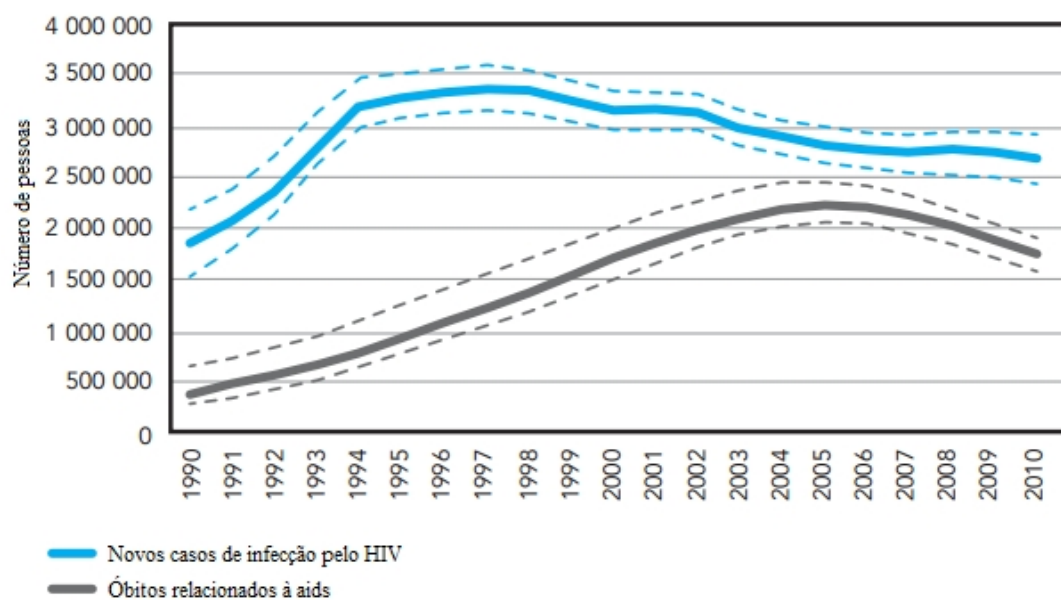


Figura 2: Estimativa do número de novas infecções pelo HIV e óbitos relacionados à aids no mundo, no período de 1990 a 2010. Fonte: World Aids Day Report, 2011, UNAIDS

Dentre os países da América Latina, o Brasil concentra cerca de 1/3 dos portadores de HIV. Entre os anos de 1980 a 2011, foram notificados 608.230 casos de aids acumulados no país e cerca de 241.469 óbitos relacionados. Em 2010, 34.218 novos casos foram identificados, e observamos uma taxa de incidência nacional de 17,9 casos por 100.000 habitantes (Boletim Epidemiológico, 2011).

Dados do Ministério da Saúde de 2011 indicam uma tendência à estabilização da taxa de incidência no Brasil ao longo dos últimos 12 anos. Porém, é importante frisar que o número de casos notificados no país não se distribui de forma homogênea entre as regiões. A região Sudeste é a mais acometida sendo responsável por mais da metade dos casos de aids notificados acumulados (56,4%), seguida pela região Sul (20,2%), Nordeste (12,9%), Centro-Oeste (5,8%), e por último a região Norte (4,7%) (Figura 3). De acordo com o perfil de cada região, observa-se um processo lento de estabilização da incidência nas regiões Sudeste e Sul, acompanhado mais recentemente pela região Centro Oeste, já as regiões Norte e Nordeste mantêm uma tendência de crescimento da incidência de casos.

Assim como descrito para epidemia mundial, no Brasil verifica-se um aumento na transmissão heterossexual; uma estabilização da transmissão homo/bissexual e uma importante redução na transmissão por uso de drogas injetáveis. De acordo com o boletim epidemiológico de 2011, a razão de sexo vem diminuindo ao longo dos anos, iniciando com 40 homens para cada mulher com aids no ano de 1983, e chegando a 1,7 homens para cada mulher no ano de 2010 (Boletim Epidemiológico, 2001).

Vale ressaltar que o Brasil continua sendo uma referência entre países em desenvolvimento por oferecer acesso gratuito aos medicamentos antirretrovirais para os indivíduos infectados; e implementar um programa de redução de danos com medidas preventivas como a distribuição de preservativos e seringas; e campanhas de conscientização da população. Como resultado dessa política de prevenção da aids, as taxas de transmissão reduziram, assim como a mortalidade, o que contribui no controle da epidemia e em um aumento da expectativa de vida das pessoas com HIV/AIDS no país.

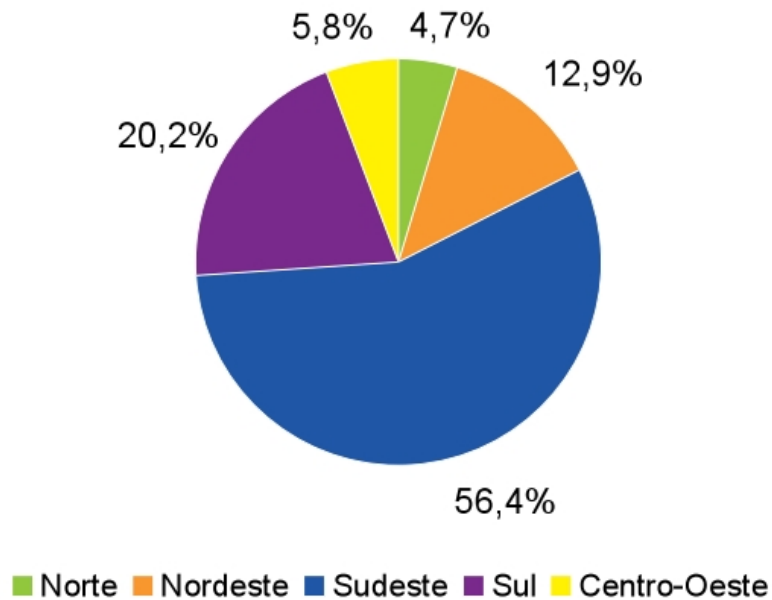


Figura 3: Distribuição percentual dos casos de aids acumulados por região do Brasil no período de 1980 a 2011. Fonte: MS/SVS/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, Boletim epidemiológico, 2011.

1.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, a qual possui a enzima transcriptase reversa capaz de retrotranscrever seu genoma de RNA em DNA; e ao gênero *Lentivirus* (Coffin *et al.*, 1986), que se caracteriza por produzir infecções crônicas no hospedeiro, além de danos em seu sistema imune (revisto por Roquebert *et al.*, 2009).

A partícula viral (Figura 4) madura apresenta simetria icosaédrica, com aproximadamente 110nm de diâmetro. O envelope corresponde à camada mais externa do vírus e se origina da bicamada lipídica da célula hospedeira durante o brotamento dos vírions e apresenta as glicoproteínas gp120 e gp41. Essas glicoproteínas codificadas pelo gene do envelope (*env*) desempenham um importante papel nas etapas de adsorção, fusão membranar e posterior entrada na célula hospedeira (Goto, Ashina, Nakai, 1994; revisto por Goto, Nakai, Ikuta, 1998). Internamente ao envelope viral, encontramos a matriz (MA) formada pela proteína p17 codificada pelo grupo antígeno específico, gene *gag*. Essa proteína é essencial para a integridade do vírion e participa na maturação da

partícula viral pela incorporação das glicoproteínas do envelope no vírion maduro (Rubbert *et al.*, 2005). O capsídeo viral (CA) é constituído pela proteína p24 e apresenta forma cônica (Marx, Munn, Joy, 1988). Envoltos pelo capsídeo encontram-se o nucleocapsídeo (NC), as enzimas virais (protease, transcriptase reversa e integrase) e as proteínas acessórias, as quais estão intimamente ligadas às duas fitas de RNA.

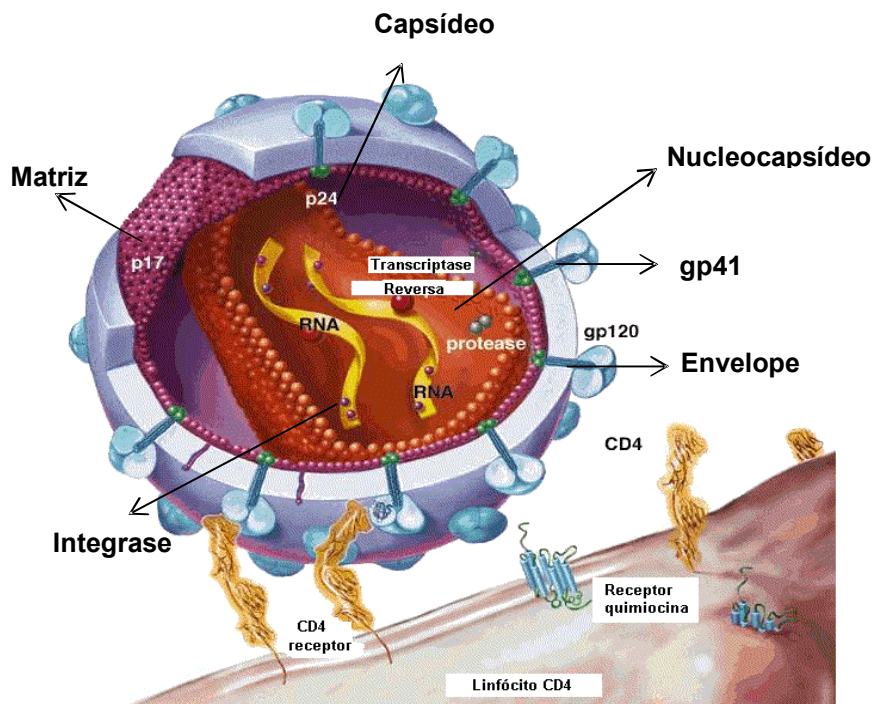


Figura 4: Representação esquemática da partícula madura do HIV-1 destacando as camadas estruturais, assim como as proteínas que as compõe e as enzimas (transcriptase reversa, protease e integrase). Fonte: <http://celulando.blogspot.com>

1.2.1. O genoma do HIV

O HIV, como todo retrovírus, possui um genoma constituído de duas fitas de RNA similares de polaridade positiva, cada uma com aproximadamente 9,7kb de tamanho, contendo seqüências de leitura abertas que codificam as diversas proteínas virais (revisto por Goto *et al.*, 1998).

O genoma do HIV apresenta nove genes: *gag*, *env* (codificam proteínas estruturais) e *pol* (codifica as enzimas virais que são comuns a todos os retrovírus); *tat* e *rev* (genes regulatórios) e *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* (genes acessórios, no caso do HIV-1)

(Figura 5). Na extremidade 3' e 5' do genoma proviral do HIV são encontradas repetições terminais longas denominadas de LTR (*Long terminal repeats*), onde estão localizadas as principais sequências promotoras para a transcrição dos genes virais. As regiões LTR não codificam proteína, mas exercem funções importantes como participação na retrotranscrição, promovendo a interação do RNA molde com o cDNA e participação na integração com o genoma hospedeiro (Cherrington, Ganem, 1992; revisto por Freed *et al.*, 2001).

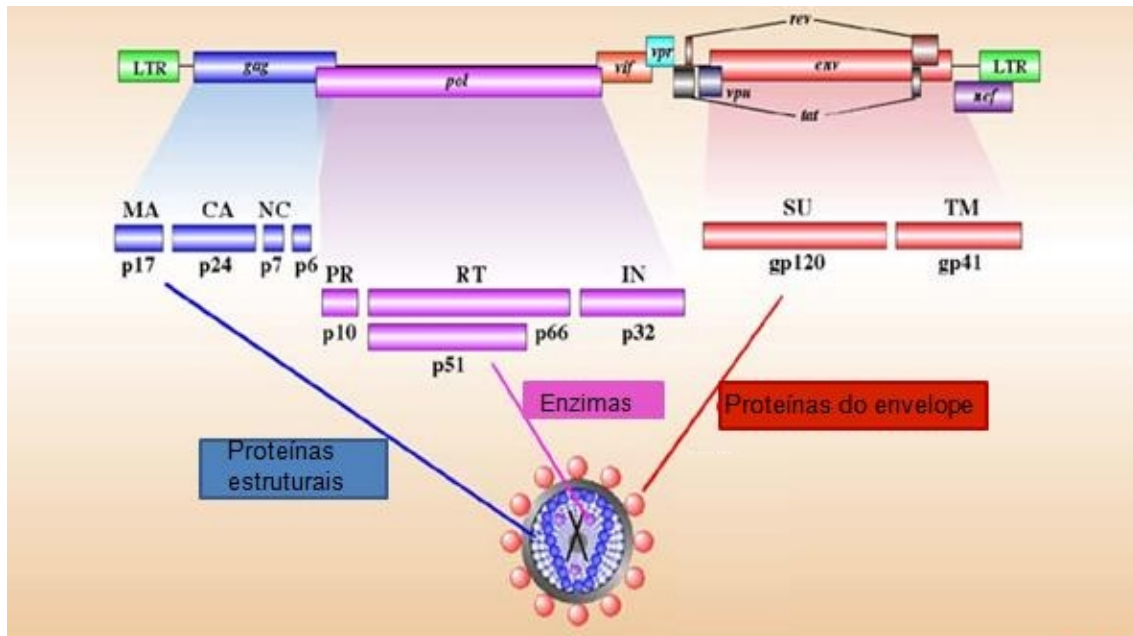


Figura 5: Representação esquemática do genoma proviral do HIV-1. As proteínas codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *env* também encontram-se representadas. Fonte: <http://www.liquidarea.com>.

O gene *gag* (grupo antígeno específico) é o primeiro gene, localizado na terminação 5' do genoma do HIV. As proteínas codificadas a partir desse gene são sintetizadas de uma poliproteína precursora de 55kD, denominada p55. Durante, ou logo após a liberação de novas partículas virais, a protease cliva essa poliproteína em quatro proteínas estruturais: p17 (matriz – MA), p24 (capsídeo – CA), p7 (nucleocapsídeo – NC) e p6 (revisto por Freed *et al.*, 2001). As principais funções dessas proteínas são: formar a estrutura funcional do vírus, proteger o material genético viral e as enzimas necessárias à replicação, empacotamento do RNA viral, direcionar as partículas nascentes para a superfície da célula hospedeira, estimular a liberação de

novas partículas virais, entre outras (Gottlinger *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1995; revisto por Freed *et al.*, 2001).

O gene *pol* (polimerase) codifica uma poliproteína precursora p160 *gag/pol* a qual é clivada pela protease gerando as enzimas virais: protease (PR - p10), transcriptase reversa (RT - p66/p51) e integrase (IN - p31), que estão envolvidas nos processos de maturação, retrotranscrição e integração ao genoma viral, respectivamente. A sequência do gene *pol* não possui um códon de iniciação, assim, não pode ser traduzida independentemente. Ela é então traduzida fusionada a *gag*, formando um precursor *gag-pol*. A protease, oriunda do gene *pol*, cliva o polipeptídeo *pol*, separando-o de *gag*, sendo então uma proteína indispensável na produção da partícula madura (revisto por Freed, 2001).

O gene *env* (envelope) codifica uma poliproteína precursora, a gp160, que é traduzida no retículo endoplasmático da célula hospedeira e é encaminhada para o Complexo de Golgi, sendo glicosilada e clivada por proteases celulares em gp120 (superfície) e gp41 (transmembranar). Essas glicoproteínas desempenham um importante papel nas etapas de adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira (Goto, Ashina, Nakai, 1994; revisto por Goto, Nakai e Ikuta, 1998). A gp120 contém determinantes que interagem com o receptor CD4 e correceptores, enquanto a gp41 ancora o complexo gp120/gp41 na membrana, além de conter domínios importantes para catalisar a reação de fusão entre a bicamada lipídica viral e do hospedeiro durante a entrada do vírus (Caffrey *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1997). A glicoproteína gp120 reconhece e interage com o receptor CD4, promovendo a adsorção do vírus à superfície da célula hospedeira. Além do CD4, essa glicoproteína reconhece e se associa a receptores de quimiocinas CCR5 e/ou CXCR4. Essas interações promovem mudanças conformacionais tanto na gp120 quanto na gp41, levando à exposição do peptídeo de fusão da gp41 e consequente fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira (Clapham, Weiss, 1997; Chan e Kim, 1998; revisto por Berger, Murphy e Farber, 1999; revisto por Freed *et al.*, 2001). A gp120 é o principal contato entre o vírus e a célula hospedeira, sendo composta por cinco regiões constantes (C1 a C5), que geralmente são semelhantes entre os diferentes subtipos virais, e cinco regiões variáveis (V1 a V5) (Figura 6). Dentre as regiões variáveis, os domínios V1 e V2 são interligados através de pontes dissulfeto, formando a alça V1/V2. As demais regiões variáveis, V3, V4 e V5, formam alças independentes (Cicala, Arthos e Fauci, 2010). A região da terceira alça

hipervariável (V3) é constituída por 35 aminoácidos e é conhecida por codificar os principais determinantes de especificidade do uso do correceptor (De Jong *et al.*, 1992; revisto por Chandramouli *et al.*, 2012). Assim, variações genéticas nesta região podem estar relacionadas com o uso diferencial de correceptores pelos vírus, tal como a presença de aminoácidos básicos nas posições 11 e/ou 25 que tem sido associada com o uso do correceptor CXCR4 (Fouchier *et al.*, 1992; De Jong *et al.*, 1992). Estudos recentes têm mostrado que algumas características da região da gp120 do HIV-1 podem estar correlacionadas com a velocidade de progressão para a aids, tais como: o comprimento das regiões variáveis; diversidade total de aminoácidos e número de sítios de glicosilação (PNGs) (Derdeyn *et al.*, 2004; Rong *et al.*, 2007; Archary *et al.*, 2010).

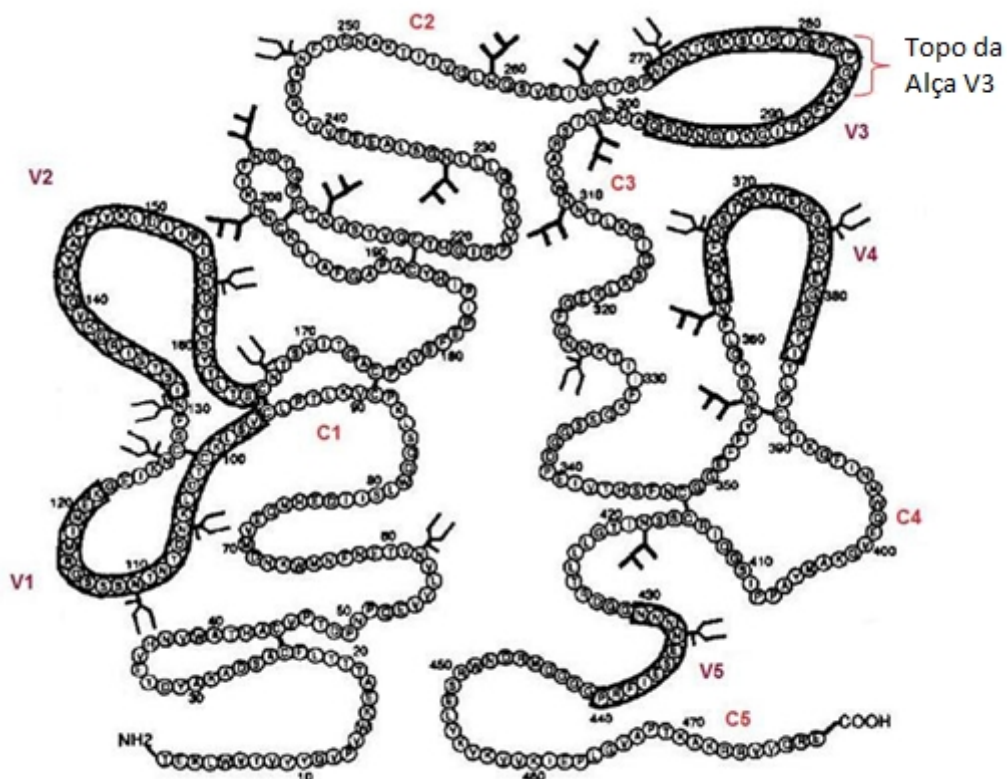


Figura 6: Representação esquemática da gp120 do HIV-1, demonstrando as cinco regiões conservadas (C1-C5) e as cinco regiões variáveis (V1-V5). Em destaque, o topo da alça V3 onde se encontra a substituição da prolina pelo triptofano, que distingue a variante B'' do subtipo B comum. Fonte: Adaptado a partir de Leonard *et al.*, 1990.

Os genes regulatórios e acessórios estão envolvidos em diversos fenômenos que têm como objetivo aumentar a capacidade replicativa viral. Os genes regulatórios *tat* e *rev* codificam proteínas reguladoras que se acumulam no núcleo e unem-se a regiões

específicas do RNA viral. A proteína Tat é um potente ativador da transcrição, pois tem como principal função promover a fosforilação da RNAPol II do hospedeiro, aumentando os níveis de transcritos virais no interior da célula (revisto por Freed *et al.*, 2001). O gene acessório *rev* produz um fator de exportação nuclear que facilita a exportação dos transcritos virais do núcleo para o citoplasma da célula, permitindo assim a tradução e expressão das proteínas estruturais (revisto por Delgado, 2011). Os genes acessórios codificam proteínas importantes para a replicação viral e infecção. A proteína Vif é uma proteína citoplasmática que apesar de não ser necessária para montagem e liberação dos vírions, parece ser importante para transmissão do vírus célula-célula e na geração de vírus plenamente infecciosos (Strebel *et al.*, 1987). Vif interage com a proteína de defesa antiviral da célula humana, APOBEC3G, cancelando seu efeito (revisto por Delgado, 2011). As principais funções da proteína Vpr incluem a estimulação da expressão gênica (Cohen *et al.*, 1990); e transporte do complexo viral pré-integração ao núcleo imediatamente depois da entrada do vírus na célula, o que diferencia o HIV-1 da maioria dos retrovírus (revisto por Delgado, 2011). Vpu é uma proteína de membrana que tem como principal função promover a liberação dos novos vírus (revisto por Strebel, 2003). Recentemente, foi descrita uma função de Vpu similar a de Vif, inibir a ação de um fator de restrição novo chamado “*Tetherin*”, este tem a função de impedir a liberação de partículas virais (revisto por Delgado, 2011). A proteína Nef tem sido alvo de diversos estudos já que participa de funções diversas, além de ser a maior proteína acessória. Nef induz a regulação negativa da expressão do receptor CD4 e de moléculas de HLA classe I na superfície das células infectadas (Collins *et al.*, 1998), o que pode representar um mecanismo de escape importante ao evadir um ataque mediado por células TCD8+; promove aumento da infectividade viral, modulando vias intracelulares de ativação, e mantendo assim, altos níveis de replicação viral no hospedeiro (revisto por Geyer, Fackler, Peterlin, 2001).

1.2.2. Ciclo de replicação do HIV

O ciclo de replicação do HIV é dividido em diversas etapas, e proteínas virais e celulares estão envolvidas nesse processo. As principais etapas desse complexo ciclo serão descritas a seguir.

A infecção pelo HIV-1 tem início com a entrada do vírus na célula hospedeira. Esse processo se dá pela adsorção das partículas virais na superfície de células do sistema imunológico que expressam o receptor CD4, através da interação da glicoproteína do envelope viral gp120 com este receptor. A molécula CD4 é o principal receptor para o HIV-1 e está presente em células como linfócitos T auxiliares, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células da micróglia do sistema nervoso central (revisto por Gomez e Hope, 2005). Além do receptor CD4, a gp120 reconhece e se associa a receptores de quimiocinas, CCR5 (expresso em macrófagos e células dendríticas) e/ou CXCR4 (expresso em células T), que servem como correceptores para a entrada do vírus na célula (Clapham, Weiss, 1997). Após essas ligações, ocorrem mudanças conformacionais na gp120 e na gp41, levando a exposição dessa última, ocorrendo então à fusão entre o envelope viral e a bicamada lipídica da célula hospedeira. Como consequência, ocorre a entrada do vírus na célula (Sattentau *et al.*, 1993). O conteúdo do capsídeo é, então, liberado no citoplasma (Leavitt *et al.* 2004) (Figura 7).

Uma vez no citoplasma, o capsídeo sofre um processo de dissociação estrutural e o RNA genômico e as enzimas virais são liberadas na célula. Em seguida, a enzima transcriptase reversa promove a síntese de uma molécula de DNA a partir do RNA viral. Ao mesmo tempo, a enzima RNaseH é necessária para degradar o RNA do híbrido DNA-RNA. A síntese da fita de DNA complementar é realizada pela atividade DNA-polimerase RNA dependente da transcriptase reversa.

O DNA viral é transportado ao núcleo, e pela ação da enzima integrase ele é integrado ao genoma do hospedeiro. Após essa integração, o genoma passa a ser conhecido como provírus. Esse provírus tem uma tendência de manter-se no estado latente na célula infectada sem produzir vírus até ser ativado por um determinado evento mitogênico. Quando a célula é ativada, através do uso da maquinaria biossintetizadora da célula (Frankel, Young, 1998), ocorre a transcrição do RNA viral, a síntese de proteínas, a montagem e a liberação de novas partículas de HIV-1, que irão sofrer maturação pela enzima protease (Freed, 2001).

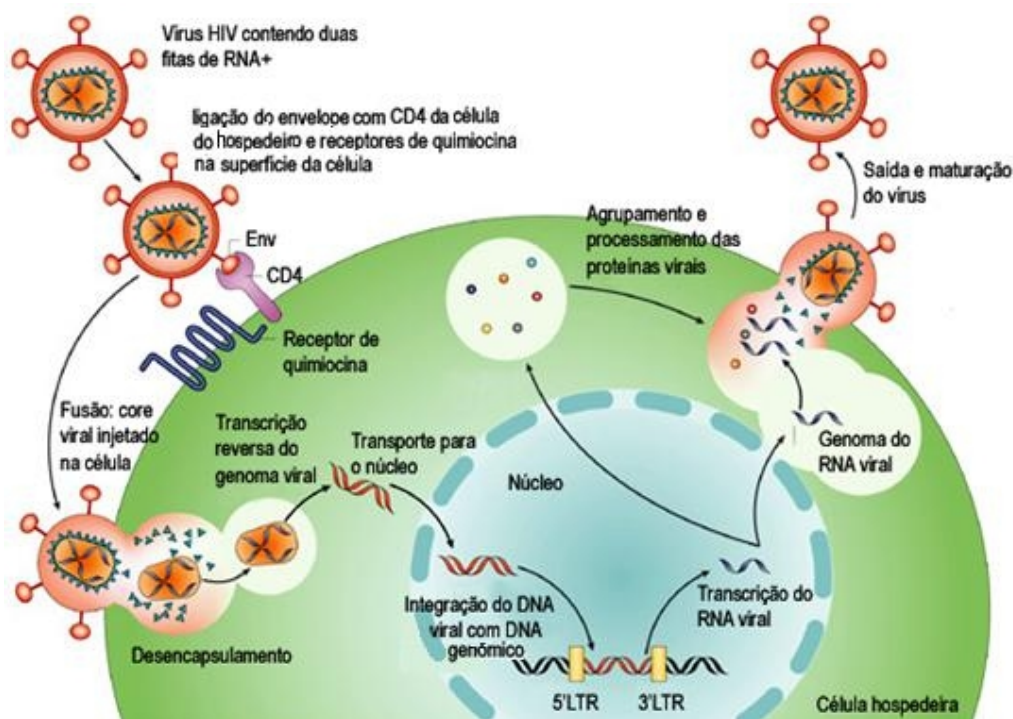


Figura 7: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1. Fonte: Adaptado de Peterlin e Trono, 2003.

1.3. Origem e classificação genética do HIV

A hipótese mais aceita para a origem do HIV baseia-se na transmissão zoonótica a partir de lentivírus de primatas, ou seja, o SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia) teria sido transmitido ao homem através do contato com fluidos de primatas não-humanos infectados com esse vírus. Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 são oriundos de eventos distintos de introdução na população humana. O HIV-1 apresenta relação filogenética com o SIVcpz (infecta chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*) e HIV-2 com o SIVsm (infecta macacos *Sooty mangabey*). Foi demonstrado que regiões africanas de ocupação natural dos chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* coincidem com áreas onde os grupos de HIV-1 já foram encontrados; assim como regiões habitadas por macacos *Sooty mangabey* coincidem com regiões endêmicas para o HIV-2, corroborando evidências de transmissão zoonótica (Gao *et al.*, 1999; revisto por Alaleus *et al.*, 2000; revisto por Hahn *et al.*, 2000).

O HIV-1 é responsável pela pandemia de aids e o HIV-2 é endêmico em alguns países da África e menos patogênico que o HIV-1 (Clavel *et al.*, 1986; Alaeus *et al.*, 2000).

Uma das características mais marcantes do HIV é a alta variabilidade genética. Essa diversidade está relacionada a diversos fatores como: os mecanismos de replicação viral, a biologia do vírus e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Wei *et al.*, 1995-adicionar).

O HIV apresenta uma alta taxa de produção viral, com cerca de 10^9 novos vírus gerados por dia, o que potencializa os diversos mecanismos descritos a seguir. A predisposição natural ao erro da enzima transcriptase reversa (TR) pela ausência de mecanismos de correção no momento da transcrição do RNA viral em DNA, leva a incorporação de substituições, deleções e inserções de nucleotídeos na ordem de 10^{-5} (Roberts *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 2010). A susceptibilidade aos eventos de recombinação também é um importante mecanismo que contribui para o aumento da variabilidade genética do HIV (Robertson *et al.*, 1995). Este é um processo comum aos retrovírus, devido a existência de duas fitas de RNA em um mesmo compartimento e pela capacidade da TR em se transferir de uma fita de RNA para outra durante a retrotranscrição. No HIV-1, ocorre uma média de três saltos da TR entre as fitas de RNA durante esse processo (Yu *et al.*, 1998). A recombinação pode ocorrer entre genomas do mesmo subtipo, entre dois ou mais subtipos e até entre grupos diferentes de HIV-1 (revisto por Steain *et al.*, 2004).

O HIV-1 é classificado, com base no genoma completo, em quatro grupos distintos geneticamente, com diferentes introduções de primatas não-humanos para humanos: M (Major, majoritário), O (Outlier), N (Novo, não-M e não-O) e P (Simon *et al.*, 1998; Roques *et al.*, 2004; Ayoubia *et al.*, 200; Plantier *et al.*, 2009). O grupo M é o mais prevalente no mundo, e devido a sua variabilidade genética, é classificado filogeneticamente em nove subtipos: A-D, F-H, J e K (Robertson *et al.*, 2000). Os subtipos A e F são ainda divididos em sub-subtipos: A1-A5 e F1-F2 (Gao *et al.*, 2001; Meloni *et al.*, 2004; Triques *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2006). A variabilidade genética varia de acordo com a região genômica avaliada, podendo chegar a 35% entre os distintos subtipos na região do envelope viral (revisto por Korber *et al.*, 2001).

Além dos vários subtipos virais, os eventos de recombinação entre os diferentes subtipos levam a geração de formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs). Tanto para a descrição de um CRF como para um grupo ou subtipo, é necessário que sejam sequenciados pelo menos dois genomas completos e um parcial de vírus obtidos de indivíduos distintos e não relacionados epidemiologicamente. No caso de um novo CRF, essas três sequências devem apresentar o mesmo padrão de recombinação ao longo do genoma (Robertson *et al.*, 2000). Os URFs também são formas recombinantes entre subtipos, porém, são encontrados em apenas um indivíduo infectado. Os genomas recombinantes são atualmente responsáveis por pelo menos 20% das infecções por HIV-1 no mundo (revisto por Hemelaar, 2011). Até o momento já foram descritas e depositadas no banco de Los Alamos 51 CRFs (Hemelaar, 2011; HIV Sequence Database, 2012).

1.3.1. Epidemiologia molecular do HIV-1 no mundo

A distribuição global dos subtipos é altamente heterogênea (Figura 8). Um estudo recente analisou a distribuição dos subtipos em diferentes países no período de 2004 a 2007 e comparou com os dados do período de 2000 a 2003 (Hemelaar *et al.*, 2006). Uma tendência à estabilização da distribuição dos subtipos foi observada, apesar de um aumento no número de CRFs (Hemelaar *et al.*, 2011).

O subtipo C é responsável por cerca de 50% das infecções pelo HIV-1 no mundo. A África Subsaariana é a região mais acometida pela epidemia e contém cerca de 65% dos casos, sendo o subtipo C responsável por mais da metade dessas infecções. Esse subtipo é o mais prevalente em países com altas taxas de infecção, que inclui os países da África Subsaariana, Índia e China (Sengupta *et al.*, 2005; Hemelaar *et al.*, 2006; revisto por Hemelaar *et al.*, 2011).

Os subtipos A, B, CRF02_AG, CRF01_AE, G e D são responsáveis por 12, 11, 8, 5, 5 e 2% das infecções, respectivamente. Já os subtipos F, H, J e K, representam uma menor prevalência, juntos, causam menos de 1% das infecções no mundo (Hemelaar *et al.*, 2011). A África Central apresenta a maior diversidade de subtipos e recombinantes, e é considerada o epicentro da epidemia global.

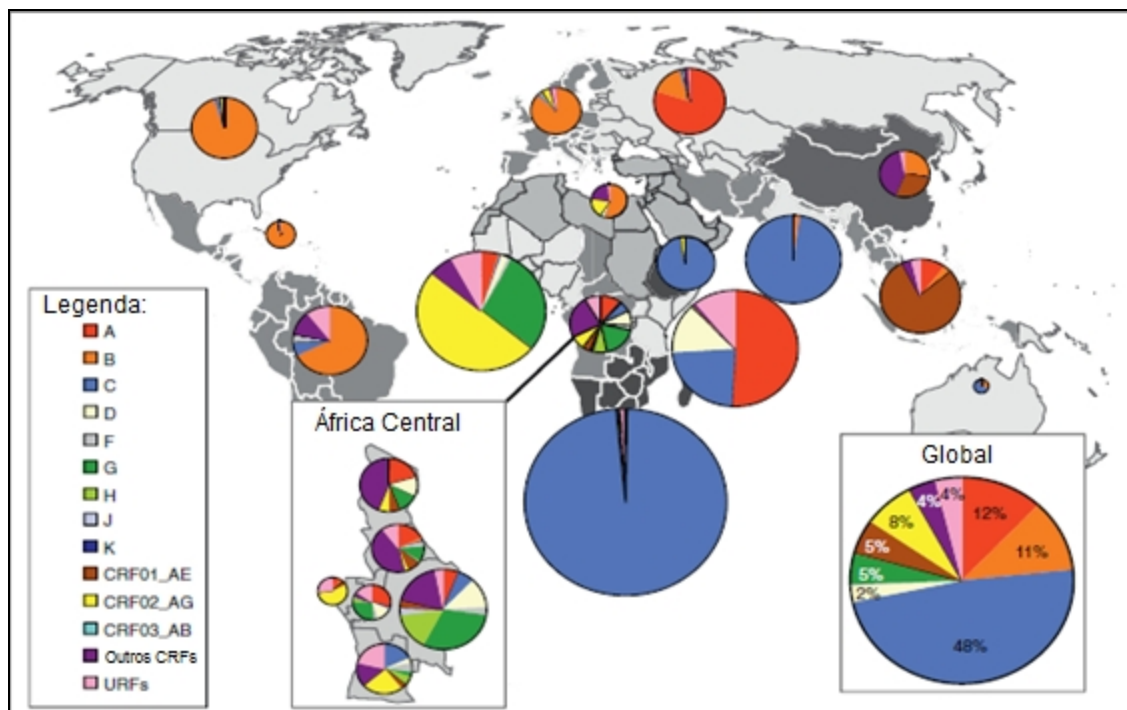


Figura 8: Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e das formas recombinantes circulantes de 2004 a 2007, com destaque para países da África Central. Os gráficos em formato de pizza representam a distribuição dos subtipos e formas recombinantes em cada região. A superfície relativa de cada gráfico corresponde ao número relativo de indivíduos infectados pelo HIV-1 em cada região. Fonte: adaptado de Hemelaar, 2012.

O subtipo B apresenta uma ampla distribuição, sendo prevalente na Europa, nas Américas do Norte e Sul incluindo o Caribe, e na Austrália (Hemelaar *et al.*, 2011). Esse subtipo é o mais estudado por ser o mais difundido, e por predominar nas epidemias de países desenvolvidos.

A América Latina abrange cerca de 5% das infecções mundiais e os países com maiores prevalências são o Brasil e Argentina. Nessa região há uma intensa circulação dos subtipos B (principal), C, F1 e recombinantes BF1 (Hemelaar *et al.*, 2006; revisto por Hemelaar *et al.*, 2011). O sub-subtipo F1 está presente na maioria dos países da América Latina: Argentina (Aulicino *et al.*, 2007), Bolívia (Velarde-Dunois *et al.*, 2000), Uruguai (Hierholzer *et al.*, 2002) e possui maior prevalência no Brasil (Morgado *et al.*, 1994; Morgado, 1998). É importante ressaltar que a maioria dos casos F1 encontram-se na sua forma recombinante BF1 (Barreto *et al.*, 2006, Guimarães *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2010; Hierholzer *et al.*, 2002; Aulicino *et al.*, 2012), e destas, destacamos os CRF_12BF e CRF17_BF encontrados da Argentina, Paraguai e Uruguai

(Carr *et al.*, 2001; Aguayo *et al.*, 2008; Bello *et al.*, 2010; Aulicino *et al.*, 2011) e mais recentemente foi encontrado o CRF38_BF no Uruguai (Ruchansky *et al.*, 2009).

A alta variabilidade genética do HIV-1 pode ter grande impacto na progressão para a aids, transmissão, diagnóstico, resposta à terapia antirretroviral, resposta imune e portanto, no desenvolvimento de vacinas (Hemelaar, 2011).

1.3.2. Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil

A epidemia molecular de aids no Brasil é representada predominantemente pelo subtipo B, seguido pelos subtipos F1 e C, além dos recombinantes BF1 e BC (Potts *et al.*, 1993; Morgado *et al.*, 1994; Louwagie *et al.*, 1994; Vicente *et al.*, 2000; Guimarães *et al.*, 2002; Morgado *et al.*, 2002; Brindeiro *et al.*, 2003; Couto-Fernandez *et al.*, 2005; Brigido *et al.*, 2011) (Figura 9). Também já foram descritos no país casos de infecções pelos subtipos D, A e CRF02_AG (Morgado *et al.*, 1998; Couto-Fernandez *et al.*, 2006; Caride *et al.*, 2000; Pires *et al.* 2004, Machado *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010).

A região Sul apresenta um perfil de distribuição de subtipos diferente do restante do país, onde verifica-se uma alta proporção do subtipo C, principalmente nos estados de Santa Catarina (50-80%) e do Rio Grande do Sul (30-45%) apresentando-se como subtipo predominante (Brindeiro *et al.*, 2003; Brigido *et al.*, 2007; Locateli *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2010; revisto por Bello *et al.*, 2012), seguido do subtipo B e recombinantes BC (principalmente CRF31_BC) e baixa prevalência de F1 (Guimarães *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006). O Paraná ainda apresenta uma proporção maior do subtipo B (50-70%), seguido pelo subtipo C (20-30%) e recombinantes BC (~15%) (Ferreira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2010; Raboni *et al.*, 2010).

A região Sudeste apresenta a maior prevalência de casos de aids do país e segue o padrão molecular descrito para maior parte do território nacional, com subtipo B predominante (75-80%), seguido do sub-subtipo F1 (10-15%), recombinantes BF1 (4 a 10%), e em menor proporção pelo subtipo C (2-5%) (Tanuri *et al.*, 1999; Cabral *et al.*, 2006; Morgado *et al.* 1998, Pires *et al.*, 2004; Sanabani *et al.*, 2011; Sabino *et al.*, 1994; Brindeiro *et al.*, 2003; Sá Ferreira *et al.*, 2007; Barreto *et al.*, 2006). Já foram descritas no Brasil, cinco CRFs BF1, todos na região Sudeste: CRF28_BF, CRF29_BF,

CRF39_BF, CRF40_BF, CRF46_BF (De Sa *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2008; Sanabani *et al.*, 2010). Casos isolados do subtipo D, bem como recombinantes BD, CRF02_AG e A também já foram encontrados nessa região (Cabral *et al.*, 2006; Caride *et al.*, 2000; Eyer-Silva e Morgado 2007; Morgado *et al.*, 1998; Pires *et al.*, 2004; Tanuri *et al.*, 1999; Varella *et al.*, 2008; Delatorre *et al.*, 2012).



Figura 9: Distribuição dos subtipos e CRFs predominantes do HIV-1 por região geográfica no Brasil. Fonte: Atualizado a partir de Morgado *et al.*, 2002

Através da caracterização do envelope viral de amostras do subtipo B no Brasil foi possível descrever a existência de uma variante desse subtipo tipicamente brasileira, denominada B". Essa variante é caracterizada pela presença do aminoácido Triptofano (W) na posição 16 do topo da alça V3 da gp120 do envelope (Potts *et al.*, 1993; Morgado *et al.*, 1994; Covas *et al.*, 1998), em substituição ao aminoácido Prolina (P) comum aos isolados de subtipo B predominante nas Américas, inclusive Brasil, e na Europa. Essa mudança de aminoácidos causa alterações na estrutura secundária da alça V3 nesses isolados (Morgado *et al.*, 1996). A variante B" do subtipo B representa cerca de 40 a 60% das sequências B e já foi encontrada em todas as regiões do Brasil (Machado *et al.*, 2009; Veras *et al.*, 2007; Morgado *et al.*, 1996); exceto o Sul, pois até o momento não existem estudos de caracterização da região do envelope viral nesta região geográfica. A

figura 4, que representa a estrutura da gp120, destaca na alça V3 a posição da troca de aminoácidos que caracteriza a variante B”.

1.4. Caracterização biológica do HIV-1

Características relacionadas com o perfil biológico do HIV-1 permitem classificar os isolados virais de acordo com o uso preferencial dos receptores de quimiocinas e tropismo celular.

Os vírus com capacidade de utilização somente do correceptor CCR5 são denominados R5; os que utilizam o correceptor CXCR4 são chamados X4; e aqueles com capacidade de utilizar simultaneamente os correceptores CCR5 e CXCR4 são denominados vírus R5X4 (Berger *et al.*, 1999; revisto por Thielen *et al.*, 2010). Os vírus R5 são menos patogênicos e infectam predominantemente células TCD4+ ativadas e macrófagos; já os vírus X4 têm como alvo células TCD4 em repouso e apresentam alto poder replicativo e alta patogenicidade (Fouchier *et al.*, 1992; Alkhatib *et al.*, 1996; revisto por Franca *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que, em geral, os vírus R5 predominam na infecção aguda, enquanto que os vírus X4 emergem, em cerca de 40-50% dos infectados, somente no estágio mais avançado da infecção, sendo correlacionados com a progressão acelerada para a doença (Berger *et al.* 1999; Brumme *et al.*, 2005; revisto por Thielen *et al.*, 2010). A dinâmica da transição que determina o surgimento dos vírus X4 a partir da infecção primária por vírus X5 tem sido amplamente estudada. Mutações na alça V3 da gp120 do envelope viral, tais como: a substituição de resíduos negativamente carregados por outros de carga positiva ao longo da alça; e variações em aminoácidos específicos das posições 11 e 25, parecem influenciar na mudança do uso do correceptor CCR5 para CXCR4 pelos vírus durante a infecção (Revisto por Coetzer *et al.*, 2006). Além do V3, outras regiões como V1V2 e C4 também parecem ser importantes (Hartley *et al.*, 2005; Pastore *et al.*, 2006).

A interação vírus-correceptor é atualmente um alvo importante de drogas antirretrovirais. Desta forma, a determinação do tipo de correceptor utilizado pelo vírus para penetrar na célula é de extrema importância para que a eficácia do tratamento seja monitorada.

1.5. A infecção pelo HIV-1 e a progressão para a aids

A infecção pelo HIV-1 ocorre através do contato de um indivíduo não-infectado com o sangue, sêmen ou outros fluidos corporais de um indivíduo infectado. Aproximadamente de duas a quatro semanas após essa exposição, inicia-se a fase de infecção primária (fase aguda), que se caracteriza por altos índices de replicação viral ($> 10^7$ cópias de RNA/mL de plasma) e consequente disseminação do vírus para os linfonodos e sangue periférico. Como consequência dessa alta replicação viral, ocorre uma dramática depleção do número de linfócitos TCD4⁺ (Pantaleo e Fauci, 1996; revisto por Moir, Chun e Fauci, 2011). Nos linfonodos, o vírus replica-se rapidamente e atinge outros tecidos linfoides, particularmente o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), podendo atingir um pico de mais de 20 milhões de cópias por mililitro de plasma por volta do 14^o-21^o dia de infecção (Piatak *et al.*, 1993). Estima-se que durante a fase primária, cerca de 50 a 90% dos indivíduos infectados apresentem sintomas que geralmente incluem febre, fadiga, faringite, dor de cabeça entre outros que se assemelham a uma gripe e tem duração de uma semana ou mais (Cohen, Kinter, Fauci, 1997; Walensky *et al.*, 2001). Em resposta à infecção ocorre um aumento significativo de células TCD8⁺ no sangue periférico, apontando assim para um papel importante dessas células na tentativa de controle inicial da replicação viral (Barouch *et al.*, 2000; Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994).

Após esta fase inicial, a viremia plasmática começa a declinar até atingir o chamado “set point” viral, marcando o início da fase crônica (assintomática) da infecção. Consequentemente, há a recuperação do número de linfócitos TCD4⁺ que se mantém estável ou sofre um declínio gradual (Cohen *et al.*, 1997). Nesta fase, a maioria dos indivíduos se mantém assintomática (longo período de latência clínica), porém, os níveis de viremia embora baixos, não são totalmente controlados (Pantaleo e Fauci, 1996) (Figura 10). Os mecanismos responsáveis pela habilidade do vírus em escapar da resposta imune ainda não são bem entendidos. Um dos fatores que parecem contribuir na elucidação dessa questão, é a propensão do HIV em gerar populações variantes virais dentro de um mesmo indivíduo que podem não ser reconhecidas pelo sistema imune (Brander, Frahm, Walker, 2006; Walker *et al.*, 2008; revisto por Archary *et al.*, 2010).

Após um período de geralmente três a dez anos, como consequência do efeito citopático do vírus sobre as células infectadas e de mecanismos imunológicos que

causam a destruição destas células, como a apoptose e citotoxicidade, ocorre uma perda considerável de células TCD4+ (atingindo níveis inferiores a 200 células/mm³). A resposta de linfócitos HIV-específicos é geralmente perdida e anticorpos neutralizantes são raramente detectados. Concomitantemente, ocorre um novo aumento da replicação viral culminando com os sintomas da chamada fase de aids. Portanto, esta síndrome se caracteriza por uma imunossupressão acentuada, tornando o indivíduo infectado susceptível às infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (Cohen, Weissman, Fauci,1999; Kahn *et al.*, 1998; revisto por Alcamí e Coiras, 2011). Apesar de a terapia antirretroviral promover um aumento da sobrevivência dos portadores de HIV/Aids no mundo, é importante destacar que os indivíduos infectados evoluem para o óbito.

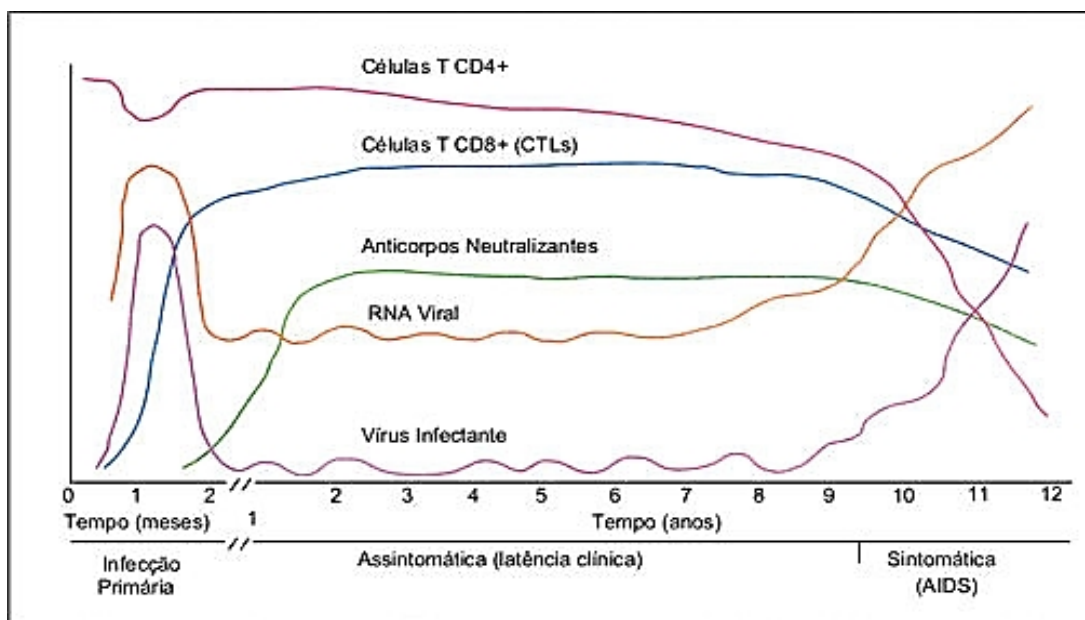


Figura 10: Curso clínico, imunológico e virológico da infecção natural pelo HIV-1. Fonte: Adaptado de Poignard, Klasse e Sattentau, 1996.

A duração do período de latência clínica, entre a fase aguda e a fase de aids, é bastante variável e diferentes perfis de progressão para a doença foram descritos (Pantaleo e Fauci, 1996; revisto por Casado *et al.*, 2010). Esses perfis tem sido associados a fatores relacionados ao perfil genético e imunológico do hospedeiro e a características inerentes ao vírus.

A grande maioria dos indivíduos infectados (70-80%) apresenta um perfil típico de progressão para a aids, levando de quatro a dez anos para atingí-la, sendo

denominados progressores intermediários (Pantaleo e Fauci, 1996; revisto por Langford *et al.*, 2007; Casado *et al.*, 2010). Nesses indivíduos, após a infecção primária, ocorre um longo período de latência clínica e, apesar da falta de sintomas, há uma replicação persistente do vírus e uma perda progressiva de células TCD4+. Uma porcentagem significativa dos indivíduos infectados (10-15%) evolui para a aids em até três anos após a infecção aguda, sendo denominados progressores rápidos. Nesses indivíduos, o período de latência clínica pode estar ausente ou ser muito breve. Mesmo após a queda inicial, os níveis de viremia podem aumentar rapidamente, e isso se deve ao ineficiente controle imune no início da infecção (Pantaleo e Fauci 1996; revisto por Langford *et al.*, 2007; Casado *et al.*, 2010). Por outro lado, uma pequena fração dos indivíduos infectados (até 5%), denominados não-progressores de longo termo (LTNP, “long term non progressors”), permanece, mesmo na ausência de tratamento, clinicamente assintomática e com altos valores de células TCD4+ (>500 células/ mm^3) por mais de dez anos de infecção. A contagem de células TCD4+ nesses indivíduos permanece estável por vários anos, apresentam baixos níveis virológicos, há também uma preservação do tecido linfóide e da função imune (Easterbrook, 1994; Pantaleo e Fauci, 1996; revisto por Langford *et al.*, 2007) (Figura 11). Existe também uma sub-população de indivíduos pertencentes ao grupo dos LTNPs que são capazes de manter a carga viral abaixo do limite de detecção (<50 cópias de RNA/mL no plasma). Esses indivíduos são denominados controladores de elite (EC, “elite controllers”).

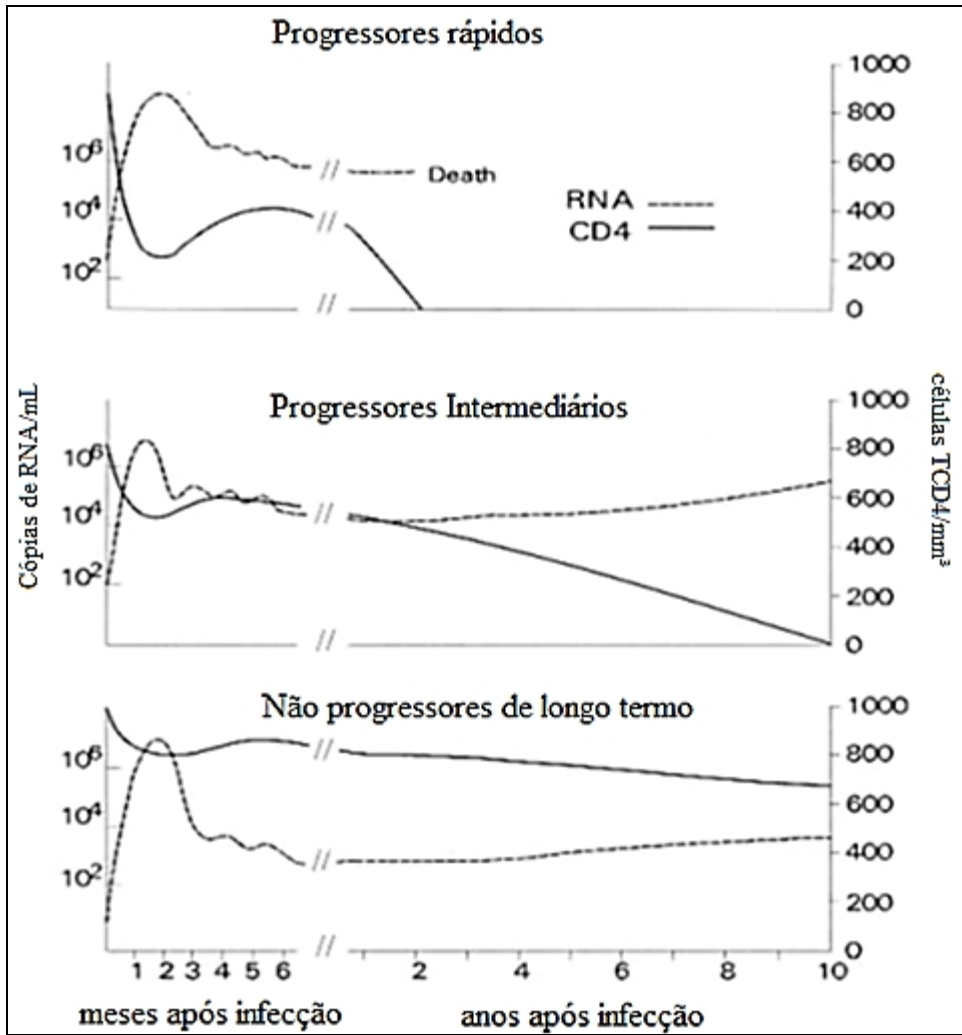


Figura 11: Padrão natural da infecção pelo HIV-1 nos três perfis de progressão para a aids: progressores rápidos, intermediários e não progressores de longo termo. Apresentando os níveis de RNA e contagem de células TCD4 em cada perfil ao longo da infecção. Fonte: Adaptado de Langford, 2007.

II. Justificativa

A infecção pelo HIV se caracteriza pela existência de um período de latência clínica (período assintomático) entre a infecção aguda e a fase de aids, sendo este altamente variável. Diversos estudos buscam uma possível influência de fatores virais, genéticos e imunológicos do hospedeiro na taxa de progressão para a aids. A genética do hospedeiro tem sido reconhecida como um determinante que afeta a susceptibilidade à infecção pelo vírus e a progressão para a doença. Por exemplo, indivíduos que são homocigotos para o alelo CCR5- Δ 32 (gene com deleção de 32 pares de base) são protegidos contra a infecção pelo HIV-1 (Liu *et al.*, 1996), enquanto que indivíduos em heterocigose apresentam uma progressão mais lenta para a doença (Michael *et al.*, 1997; Ioannidis *et al.*, 2001; Pantaleo *et al.*, 1997). Outro marcador importante são os alelos HLA classe I, importantes na apresentação de antígenos. Os alelos HLA-B*27 e HLA-B*57 são associados a uma progressão lenta para a aids (Kaslow *et al.*, 1996; Hendel *et al.*, 1999; Altfeld *et al.*, 2003). Uma progressão mais rápida é conferida pelo HLA-B*35 (Gao *et al.*, 2001). Entretanto, a influência de características virais na progressão para a aids ainda é controversa.

Alguns estudos conduzidos com indivíduos apresentando o mesmo *background* genético já relataram possíveis diferenças de progressão entre indivíduos infectados por diferentes subtipos de HIV-1. Estudos realizados em países da África demonstraram uma possível relação entre o subtipo D e a progressão mais acelerada para a aids em relação ao subtipo A (Kaleebu *et al.*, 2001 e 2002; Baeten *et al.*, 2007; Kiwanuka *et al.*, 2008; Easterbrook *et al.*, 2010). Fato corroborado em um estudo realizado em 2007 em Uganda, na África, onde foi observado uma maior número de aminoácidos carregados positivamente na alça V3 da região *env* acarretando numa alta proporção de vírus X4 em indivíduos infectados pelo subtipo D em relação aos infectados pelo subtipo A (Korber *et al.*, 1994; Kaleebu *et al.*, 2007). Essa emergência precoce de vírus que utilizam o correceptor CXCR4 pode estar relacionada com o rápido declínio de células TCD4⁺ e rápida evolução para a aids em infectados pelo subtipo D. Estudos demonstraram que indivíduos infectados pelo subtipo C utilizam majoritariamente o correceptor CCR5 e que possuem uma menor eficiência de replicação em macrófagos e linfócitos TCD4⁺ em relação aos outros subtipos, fatores estes que têm sido relacionados a uma progressão mais lenta para a aids (Ping *et al.*, 1999; Casper *et al.*, 2002; Cilliers *et al.*, 2003). Coetzer e colaboradores sugeriram que para a troca do uso

do correceptor na infecção pelo subtipo C, mais mutações seriam necessárias na região do envelope em comparação a outros subtipos (Coetzer *et al.*, 2011). Em um estudo de metanálise realizado em 2012, foi relatado que dentre os principais subtipos circulantes no mundo, os subtipos B, D e C são mais patogênicos do que os subtipos G, AE e AG, e o subtipo A foi considerado o menos agressivo de todos (Pant Pai *et al.*, 2012). Estudos conduzidos no Brasil demonstraram uma progressão mais lenta nos indivíduos infectados pela variante B” em relação ao subtipo B (Santoro-Lopes *et al.*, 2000; Casseb *et al.*, 2002; De Brito *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2010) e ainda o uso exclusivo do correceptor CCR5 por essa variante (Leal *et al.*, 2008). Apesar destes estudos terem nos fornecido conhecimento a respeito desta temática, alguns destes utilizaram ensaios sorológicos com peptídeos sintéticos para subtipagem, que são menos sensíveis do que os ensaios moleculares podendo resultar em falso-positivos. Estes ainda possuem tempo de acompanhamento reduzido e ausência de dados importantes para categorização quanto aos perfis de progressão. Além disso nenhum dos estudos realizados até o momento incluíram amostras do sub-subtipo F1.

Diante deste panorama, é possível concluir que os subtipos de HIV-1 apresentam características genéticas específicas que podem refletir na patogênese da infecção. Como o Rio de Janeiro apresenta uma cocirculação dos subtipos B, F1, recombinantes BF1, além da variante B” do subtipo B, e há um suporte do governo quanto a realização dos exames de rotina, o que permite o monitoramento dos pacientes HIV-1 positivos, nos possibilitou a caracterização desses quanto ao perfil de progressão para aids. Neste sentido, o presente estudo pretende contribuir para a compreensão de características virais que possam influenciar na progressão para a aids.

III. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a associação entre os subtipos do HIV-1 circulantes no Rio de Janeiro com os distintos perfis de progressão para a aids e com o uso do correceptor de entrada na célula.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Classificar os indivíduos HIV-1 positivos nos distintos perfis de progressão para a aids;
- ✓ Subtipar as amostras dos indivíduos HIV-1 positivos pertencentes aos três grupos estudados;
- ✓ Correlacionar o subtipo viral com os diferentes perfis de progressão para a aids;
- ✓ Analisar a mudança do uso do correceptor de entrada utilizado pelo subtipos virais circulantes no Rio de Janeiro em dois momentos da infecção, antes e após a progressão.

IV. Material e métodos

4.1. Casuística

Este é um estudo retrospectivo onde os 3840 indivíduos HIV-1 positivos acompanhados pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/IPEC-FIOCRUZ, no período de 1988 a 2011, tiveram seus dados clínicos e epidemiológicos avaliados visando a classificação dos mesmos nos distintos perfis de progressão para aids. Estes dados foram disponibilizados em um banco de dados fornecido pelo Setor de Estatística e Documentação do IPEC e analisados de forma conjunta com membros deste setor e do Laboratório de AIDS Imunologia Molecular/IOC. A classificação dos pacientes nos distintos perfis de progressão para a aids (Rápidos, Intermediários e Não progressores de longo termo) foi baseada nos seguintes eventos definidores de aids: contagem de linfócitos TCD4+ <350 células/mm³; presença de doença definidora de aids segundo o ministério da saúde brasileiro; início ao tratamento antirretroviral (ARV) ou óbito relacionado à aids. Também foi indispensável a data da primeira sorologia positiva para todos os pacientes, e a data da sorologia negativa no caso do Progressores Rápidos. De acordo com esses critérios, os pacientes foram classificados como:

Progressores Rápidos: indivíduos HIV-1 positivos que progrediram para a aids em até 3 anos após a infecção. Neste caso era indispensável que este possuísse a data da última sorologia negativa e o intervalo entre a mesma e a sorologia positiva fosse de no máximo três anos. O ponto médio entre essas datas foi adotado com a data da provável infecção.

Progressores Intermediários: indivíduos HIV-1 positivos que progrediram para a aids a partir de 4 anos de infecção. Para este caso não foi indispensável que o indivíduo apresentasse data de sorologia negativa, quando tínhamos este dado, o mesmo critério de ponto médio foi adotado para a provável data de infecção. Na ausência de sorologia negativa, foi adotada a data de seis meses antes da sorologia positiva como data da provável infecção.

Não progressores de longo termo (LTNPs): indivíduos HIV-1 positivos com todas as contagens de linfócitos TCD4+ >500 células/ mm³, sem uso ARV e sem doença definidora de aids por mais de 10 anos de infecção. Os critérios para a provável infecção foram os mesmo adotados para os Progressores intermediários.

Dos 3840 pacientes, 3243 não puderam ser classificados, desses, 282 apresentavam menos de 10 anos de acompanhamento e sem evolução para a aids até 2010, data de corte de análise do banco. Os demais (2961) não foram classificados pelos seguintes fatores:

- menos de dois ou nenhum exame de contagem de linfócitos TCD4+ antes do evento definidor de aids;
- data da provável infecção até a data aids condizente com perfil de progressão rápida, porém sem data da sorologia negativa;
- tempo entre a sorologia positiva e negativa maior que três anos;
- evento definidor de aids entre três e quatro anos – visto que foi aceita a inclusão de pacientes que possuíssem até três anos entre a sorologia negativa e a positiva, e que a data de provável infecção era o ponto médio entre estas datas. Achamos mais prudente excluir estes indivíduos da classificação por estarem no tempo limite entre os perfis de progressores rápidos e intermediários.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ sob o parecer número 16/2008.

As amostras biológicas utilizadas neste estudo foram coletadas no âmbito da rotina de contagem de células TCD4+ e Carga Viral do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular - IOC/FIOCRUZ, nos meses de outubro e novembro de 2008, setembro de 2009 e março de 2011.

4.2. Extração de DNA

O DNA proviral foi extraído a partir do sangue total, por método cromatográfico (colunas de sílica), utilizando-se o kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Alemanha) conforme instruções do fabricante. O DNA extraído foi identificado e estocado a -20°C.

4.3. Amplificação por “nested” PCR da região da gp120 do envelope viral

Com a finalidade de caracterizar o subtipo viral dos indivíduos, o DNA extraído foi submetido à técnica de “nested” PCR para a amplificação da região gênica C2-V3 da gp120 do envelope viral. Essa técnica consiste na utilização de dois pares de iniciadores utilizados em duas reações subsequentes. Para a amplificação da região escolhida foram utilizados os iniciadores externos ED5/ED12 e os internos ED31/ED33 (Tabela 1).

Os reagentes utilizados na primeira reação de PCR para cada amostra foram: 10µl do Tampão 5X da Enzima; 5µl de MgCl₂ 25mM; 0,6µl de dNTP 25mM; 0,5µl de cada iniciador na concentração de 25pmol/µl e 33,4µl de água DEPC. A essa solução adicionamos 5µl de DNA de cada amostra e 0,25µl da enzima GoTaq DNA Polymerase a 5U/µl (Promega, EUA). Para a segunda reação foram transferidos 5µl do produto da primeira sob um volume de 50µl de reação. A concentração dos reagentes foi a mesma da primeira reação.

As reações foram realizadas no termociclador Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a seguinte ciclagem de PCR: 3 ciclos de 97°C por 1 min, 55°C por 1min, 72°C por 2 min seguindo-se de 32 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 1 min, 72° por 2 min e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Para verificar se ocorreu amplificação do fragmento alvo, foram aplicados 5µl do produto da segunda reação de PCR com 1µl do corante Azul de Bromofenol em gel de agarose a 1%, este foi corado com brometo de etídeo e foi submetido à eletroforese por uma hora e meia a 80V, utilizando o TBE 1X como tampão de corrida. O fago ΦX174 digerido com a enzima Hae III foi utilizado como padrão de peso molecular, deste aplicamos 1,5µl no gel.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação da região da gp120 do envelope viral

<i>primers</i>	Sequência nucleotídica	Posição genômica relativa ao HXB2	Tamanho do fragmento
ED5 - ED12	ATGGGATCAAAGCCTAAARCCATGTG AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAG	6557 - 7543	986pb
ED31 - ED33	CCTCARYCATWACACARGCYTGTCCAAAG TTRCARTAGAAAAATTCYCCTC	6817 - 7381	564pb

4.4. Extração de RNA

Um subconjunto de amostras foram avaliadas quanto a predição do uso do correceptor, para esta análise dois momentos, antes e após a progressão para aids foram obtidos. As amostras de plasma do momento antes da progressão, foram submetidas à centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf) a 14000 rpm por 1 hora à temperatura de 4°C para que houvesse concentração do RNA, aumentando a eficiência da retrotranscrição subsequente. A extração do RNA plasmático foi realizada através do kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) conforme instruções do fabricante. O material extraído foi identificado e estocado a -70°C até sua utilização.

4.5. Reação de retrotranscrição e amplificação por “nested” PCR da região C2-V3 do envelope viral a partir do cDNA

A reação de retrotranscrição foi realizada utilizando-se o protocolo da enzima M-MLV. Para esta reação utilizamos um iniciador específico (ENV04AS) para região envelope viral ao invés de um random primer.

Para que houvesse a desnaturação do RNA, uma solução foi preparada contendo 1µl do iniciador ENV04AS a 4pmol/µl; 1µl de dNTPs 10mM e 10µl do RNA extraído a partir do plasma, aquecida a 65°C por 5 minutos e colocada imediatamente no gelo para evitar formação de estruturas secundárias nesta molécula. Em sequência, foram adicionados a essa solução 4µl do tampão da enzima M-MLV; 2µl de DTT 0,1M, 1µl do inibidor de RNAase 40U/µl e 1µl da enzima M-MLV a 200U/µl. As reações de retrotranscrição ocorreram em termociclador nas seguintes condições: 25°C por 5 minutos, 37°C por 90 minutos e 70°C por 15 minutos para a reação de ocorrer.

Após a retrotranscrição, 5 µl do cDNA foram submetidos ao mesmo protocolo de “nested” PCR descrito anteriormente, onde um fragmento de 564pb foi amplificado para a região C2-V3 do envelope viral.

4.6. Purificação e quantificação dos produtos de PCR para o sequenciamento

Os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando-se o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification com colunas de purificação (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

Para a quantificação do produto purificado, aplicamos no gel de agarose (2%, corado com brometo de etídeo) 2µl do produto purificado juntamente com 1µl do corante Azul de Bromofenol. Submetemos essas amostras à eletroforese a 80V por duas horas utilizando o tampão de corrida TBE1X. Utilizamos 2µl do Low DNA Mass Ladder como padrão de peso molecular (PM). Este padrão apresenta bandas de 100, 200, 400, 800, 1200 e 2000 pb que correspondem a 5, 10, 20, 40, 60 e 100 ng de DNA, respectivamente. Após a corrida, a intensidade das bandas das amostras foram comparadas com as bandas do padrão, assim, estimamos a concentração em nanogramas/µl, do produto purificado para posterior utilização na reação de sequenciamento.

4.7. Reação de Sequenciamento

Após a purificação e quantificação, esses produtos foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1. Utilizamos 1µl do BigDye, 1,5µl do tampão de diluição 5X, 1µl do iniciador a 5pmol/µl e a essa solução adicionamos de 60 a 100ng da amostra purificada. Para completar a reação para um volume final de 10µl, foi adicionada água Mili-Q.

Os iniciadores utilizados no sequenciamento da região *env* (gp120) foram: ED31/ED33/ES7/ENV04AS (Tabela 2). A termociclagem consistiu em 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min. Os produtos sequenciados foram precipitados com Isopropanol 75% (80µl por amostra). A placa foi incubada protegida da luz por 15min e então centrifugada a 4000rpm por 45min. Após a centrifugação, a placa foi vertida para que o Isopropanol fosse removido e o excesso retirado através da centrifugação da placa invertida a 900rpm por 1 min. A placa então foi completamente seca a 75°C por 5 min e mantida protegida da luz, até o dia em que foram submetidas ao sequenciamento. Previamente a submissão ao sequenciador, as amostras foram ressuspenas em 10µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA), aquecidas em

termociclador por 5 min a 95°C, e então colocadas imediatamente no gelo. As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático ABI Prism 3100.

Tabela 2: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento da região da gp120 do envelope viral

<i>primers</i>	Sentido	Sequência nucleotídica
ED31	SENDO	CCTCARYCATWACACARGCYTGCCAAAG
ES7	SENDO	CTGCTGTAAATGGCAGTCTAG
ED33	ANTI-SENDO	TTRCARTAGAAAAATTCYCCTC

4.8. Análise e edição das sequências

Após o sequenciamento automático de cada amostra, os cromatogramas gerados foram visualizados e editados utilizando-se o pacote de programas DNASTAR 4.00 (DNASTAR Inc., EUA). Através do uso do *software* SeqMan 4.00, as sequências geradas foram alinhadas e editadas manualmente gerando uma sequência consenso correspondente à região amplificada.

O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi realizado através do programa ClustalX do programa MEGA 5.0 - Molecular Evolutionary Genetic Analysis (Kumar, Tamura, Nei, 2011). As sequências editadas foram alinhadas juntamente com sequências de referência correspondentes aos diferentes subtipos de HIV-1 obtidas do banco de dados de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>) para posterior análise filogenética para a determinação do subtipo viral e análise de predição do uso dos correceptores.

4.9. Determinação dos subtipos virais

A análise filogenética para a determinação do subtipo de HIV-1 foi realizada utilizando o programa MEGA 5.0 (Kumar, Tamura, Nei, 2011) utilizando os arquivos correspondentes aos alinhamentos. O método de análise utilizado foi o método de distância de agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining), com método de correção da

substituição de nucleotídeos foi Tamura Nei. Para a detecção de possíveis recombinações, utilizamos o programa Simplot 3.5.1 (Lole *et al.*, 1999).

4.10. Predição dos correceptores CCR5 e/ou CXCR4

A análise temporal do uso do correceptor utilizado pelo vírus para entrada na célula hospedeira foi realizada em dois momentos da infecção, sendo um antes e outro após a progressão dos indivíduos para a aids. A predição do uso do correceptor foi realizada com base na sequência de aminoácidos da região V3 da gp120 do envelope viral para todas as amostras que possuíamos as duas visitas. Para tal, utilizamos os programas webPSSM (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>) para as amostras de subtipos B, B' e C; Geno2pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de>) com três taxas conservativas de predição de CXCR4 (5%, 10% e 20%); além da regra das posições 11 e 25 do topo da alça V3 para todos os subtipos, que baseia-se no princípio da presença dos aminoácidos K (Lisina) ou R (Arginina) nas posições 11 e/ou 25 predizerem o uso do correceptor CXCR4. O resultado final considerado foi o detectado pela maioria das metodologias utilizadas.

4.11. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Qui Quadrado e do teste exato de Fisher utilizando-se o programa EpiInfo 3.5.4.

V. Resultados

5.1. Classificação dos pacientes nos três perfis de progressão para aids e análise dos seus dados clínicos e epidemiológicos

A primeira etapa deste estudo consistiu na classificação dos pacientes de acordo com o seu perfil de progressão para a aids.

De acordo com os critérios descritos na casuística, de 3840 pacientes incluídos no banco, 486 indivíduos foram classificados, sendo 285 (58,6%) progressores intermediários (PI), 179 (36,8%) progressores rápidos (PR) e 22 (4,5%) não progressores de longo termo (LTNP).

As informações epidemiológicas de todos os indivíduos classificados neste estudo estão sumarizadas na tabela 3. Destes, 323 (65,5%) são homens e 163 (33,5%) são mulheres (razão homem/mulher igual a 1,98:1). Com relação às diferentes categorias de exposição ao risco, 204 (42%) informaram ser heterossexuais, 144 (29,6%) homens que fazem sexo com homens (HSH), 70 (14,4%) bissexuais, 68 (14%) pertencem a outras categorias. Os valores correspondentes a cada perfil de progressão estão indicados na tabela 1. Uma associação estatisticamente significativa entre homens e progressores rápidos foi verificada ($p=0,0051$). Não houve significância estatística para os outros parâmetros descritos na tabela ($p>0,05$).

Tabela 3: Dados epidemiológicos dos pacientes classificados de acordo com o seu respectivo perfil de progressão para a aids.

	Total (n=486)	Progressores Intermediários (n=285)	Progressores Rápidos (n=179)	Não progressores de longo termo (n=22)
Sexo				
Homens	323 (66,5%)	179 (62,8%)	133 (74,3%)	11 (50,0%)
Mulheres	163 (33,5%)	106 (37,2%)	46 (25,7%)	11 (50,0%)
Categoria de exposição				
Heterossexuais	204 (42,0%)	128 (44,9%)	64 (35,7%)	12 (54,4%)
HSH ¹	144 (29,6%)	66 (23,2%)	73 (40,8%)	5 (22,7%)
Bissexuais	70 (14,4%)	38 (13,3%)	30 (16,8%)	2 (9,1%)
Outros ²	68 (14,0%)	53 (18,6%)	12 (6,7%)	3 (13,6%)

¹ Homens que fazem sexo com homens

² Usuários de drogas injetáveis, Transfusão, Transmissão vertical, Acidente de trabalho, Não-informado

5.2. Caracterização dos subtipos virais

Com o intuito de identificar os subtipos de HIV-1 das amostras de DNA obtidas dos indivíduos classificados nos diferentes perfis de progressão para a aids, foi utilizada a região C2-V3 da gp120 do envelope viral.

De um total de 486 pacientes classificados quanto ao perfil de progressão e selecionados para este estudo, foi possível obter amostra e caracterizar quanto ao subtipo 238, destas, 92 eram PI; 131 PR e 15 LTNP. As amostras dos 248 pacientes restantes não estavam estocadas e/ou viáveis em nosso laboratório (95,2%) ou não amplificaram para a região alvo (4,8%). Esses pacientes foram excluídos dos próximos passos do estudo. Dos 238 pacientes caracterizados quanto ao subtipo, 75 já apresentavam amostras previamente subtipadas na região do envelope viral através da técnica de HMA (“Heteroduplex mobility assay”) devido ao uso em projetos anteriores em nosso laboratório.

Neste contexto, realizamos a análise filogenética da região C2-V3 da gp120 de 163 amostras (Figura 12). Pudemos observar que as amostras se agruparam de forma consistente com as respectivas sequências de referência dos diferentes subtipos do grupo M obtidas do Banco de Los Alamos. Algumas amostras agruparam-se entre si e apresentaram agrupamento filogenético em ramo adjacente ao grupo B na análise, sugerindo possíveis genomas recombinantes. As três referidas amostras foram então submetidas à análise de recombinação através do método de *bootscan* presente no programa Simplot (Figura 13). Com base nestas análises, foi possível caracterizar as amostras PR21764, PR23159 e PI22953 como recombinantes BF1. Assim, a caracterização molecular obtida através da filogenia e *bootscan* evidenciou 133 como subtipo B (81,6%); 19 como sendo F1 (11,7%); 6 como C (3,7%); 1 como CRF01_AE (0,6%); 1 como D (0,6%) e 3 caracterizadas como recombinantes BF1 (1,8%).

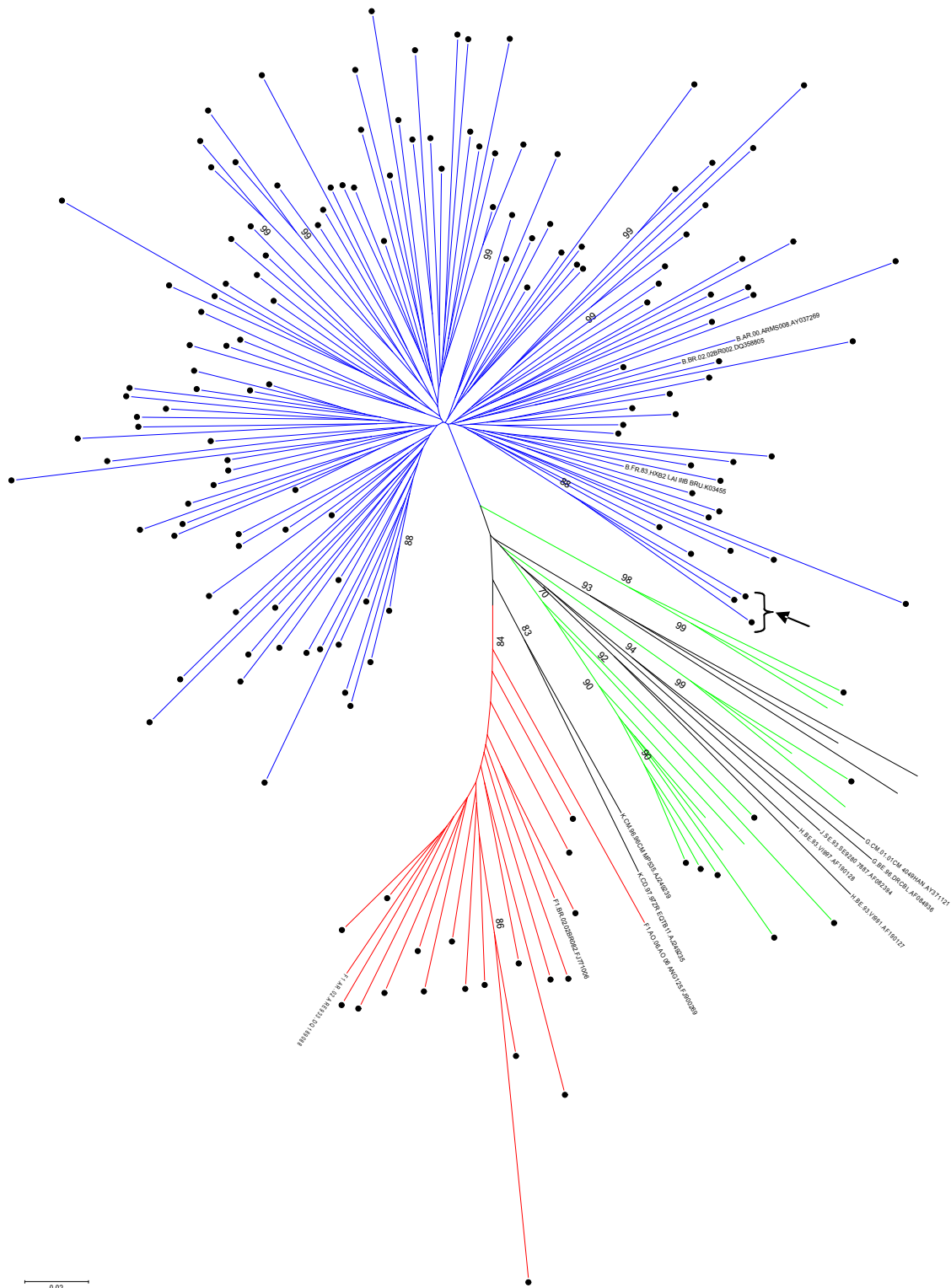


Figura 12: Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral de 163 amostras de HIV-1. Os círculos em preto representam as amostras obtidas neste estudo. Os ramos em azul são referentes as amostras do subtipo B, em vermelho amostras referentes ao sub-subtipo F1 e em verde aos subtipo C, D e CRF01_AE. A seta indica as amostras recombinantes BF1. As seqüências foram alinhadas com seqüências de referência dos diferentes subtipos obtidas do banco de Los Alamos. Valores de bootstrap acima de 70 estão representados na figura. A barra de escala indica 2% de divergência nas seqüências de nucleotídeos.

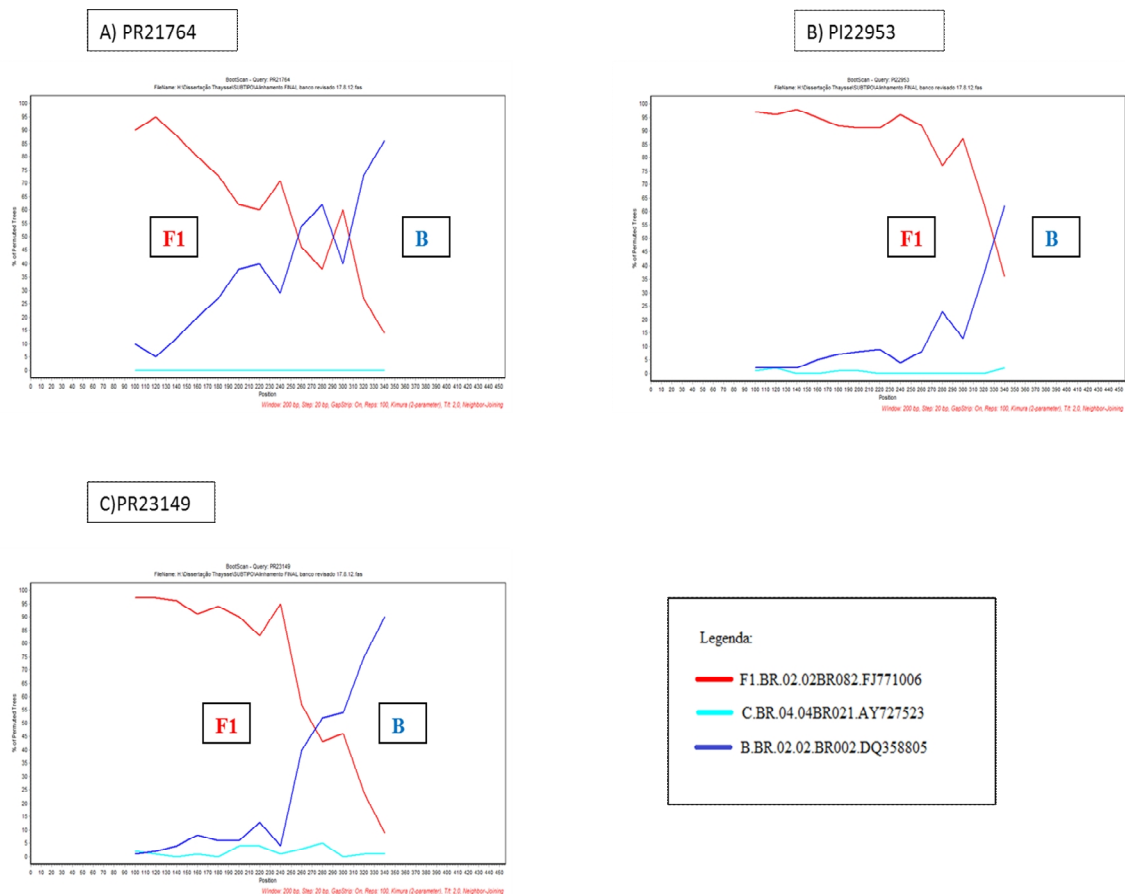


Figura 13: Análise por bootscan das amostras PR21764 , PI22953 e PR23149 na região C2-V3 do envelope viral. Os parâmetros utilizados foram janela de 200pb e passos de 20pb. As seqüências de referência utilizadas encontram-se representadas na legenda.

Assim, juntando-se as 163 amostras subtipadas no presente estudo com as 75 previamente caracterizadas tivemos, 201 (84,5%) foram classificados como pertencentes ao subtipo B; 22 (9,2%) ao sub-subtipo F1; 8 (3,4%) pertencentes ao subtipo C; 3 (1,3%) ao D, 3 (1,3%) caracterizadas como BF1 e 1 (0,4%) CRF01_AE. Através da tradução das seqüências de nucleotídeos, identificamos a presença do Triptofano (W) no lugar da Prolina (P) na posição 16 do topo da alça V3 da gp120 em 58 (28,9%) seqüências B, sendo essas então classificadas como variante B' do subtipo B (Figura 14).

O gráfico abaixo representa a distribuição dos subtipos de HIV-1 na população geral estudada (n=238):

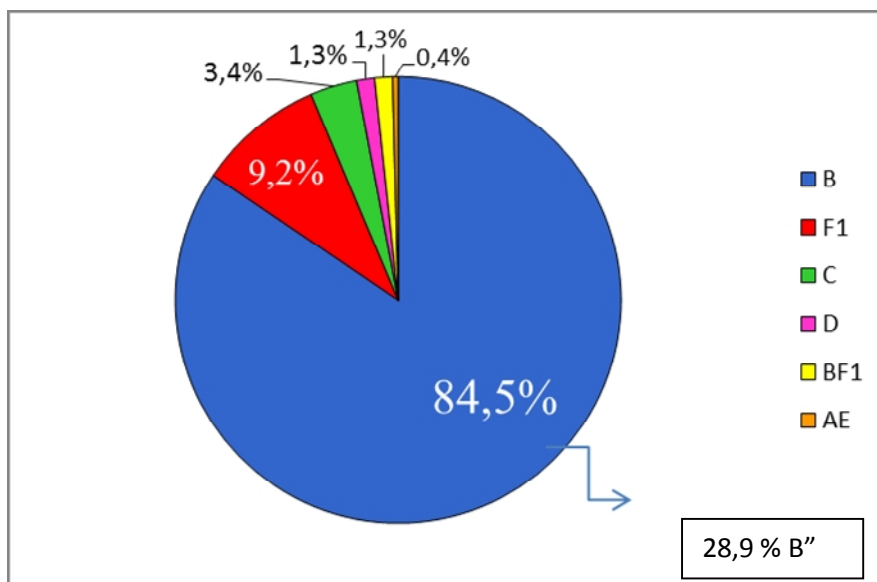


Figura 14: Distribuição dos subtipos encontrados na população estudada (n=238).

5.3. Análise da distribuição dos subtipos nos distintos perfis de progressão

Uma vez subtipadas todas as amostras, partimos para avaliação da possível correlação entre os subtipos detectados com os três perfis de progressão para a aids. A tabela 4 sumariza a distribuição dos subtipos nos diferentes perfis (131PI; 92 PR e 15 LTNP), onde pudemos observar que os subtipos tiveram uma distribuição equivalente entre os três perfis, dessa forma, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada ($p > 0,05$) (tabela 5). Contudo, foi possível observar uma maior representatividade do sub-subtipo F1 no grupo dos progressores rápidos. Destacamos que os três indivíduos caracterizados como subtipo D apresentaram progressão rápida.

Tabela 4: Distribuição dos subtipos de HIV-1 de acordo com os diferentes perfis de progressão para a aids.

	B	B''	F1	Outros*	Total (100%)
Progressores Rápidos	50 (54,3%)	21 (22,8%)	11 (12,0%)	10 (10,9%)	92
Progressores Intermediários	84 (64,1%)	32 (24,4%)	10 (7,6%)	5 (3,8%)	131
Não progressores de longo termo	9 (60,0%)	5 (33,3%)	1 (6,7%)	0	15
Total	143	58	22	15	238

* PR: 4C, 3D, 1CRF01_AE, 2BF1; PI: 4C, 1BF1

Tabela 5: Análise estatística entre os principais subtipos e os três perfis de progressão.

Subtipo	Perfil de progressão	Valor de p^*
B	PR x PI	0,454
	PR x LTNP	0,888
	PI x LTNP	0,591
B''	PR x PI	0,974
	PR x LTNP	0,531
	PI x LTNP	0,537
F1	PR x PI	0,2
	PR x LTNP	0,684
	PI x LTNP	1

* valor de p não significativo no Teste do Qui quadrado e Teste exato de Fisher ($p > 0,05$)

PR - Progressores rápidos; PI - Progressores intermediários; LTNP - Não progressores de longo termo

A fim de avaliarmos se alguma linhagem de vírus subtipo-específica poderia estar circulando em algum dos três perfis de progressão, destacamos nas figuras a seguir a análise filogenética das amostras por subtipo de acordo com o perfil de progressão, figura 15 (subtipo B), figura 16 (variante B'') e figura 17 (sub-subtipo F1). De acordo com essas análises, nenhum agrupamento subtipo-específico pode ser detectado de acordo com o perfil de progressão.

B

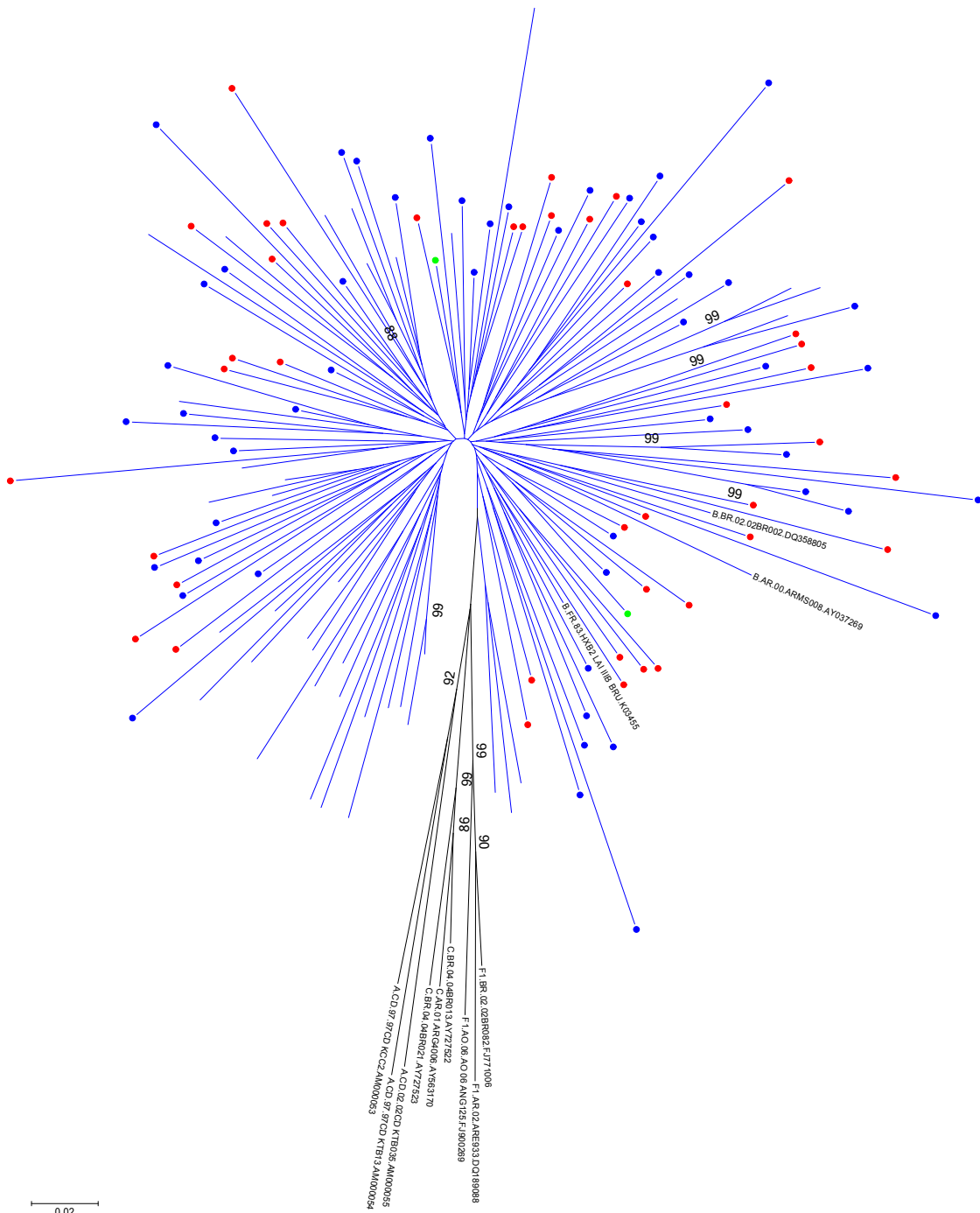


Figura 15: Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras de HIV-1subtipadas como B. Os círculos em azul representam as amostras de Progressores intermediários; e os círculos em vermelho as amostras de Progressores rápidos e em verde as amostras de Não progressores de longo termo. As sequências foram alinhadas com sequências de referência dos diferentes subtipos obtidas do banco de Los Alamos. Valores de bootstrap acima de 70 estão representados na figura. A barra de escala indica 2% de divergência nas sequências de nucleotídeos.

B''

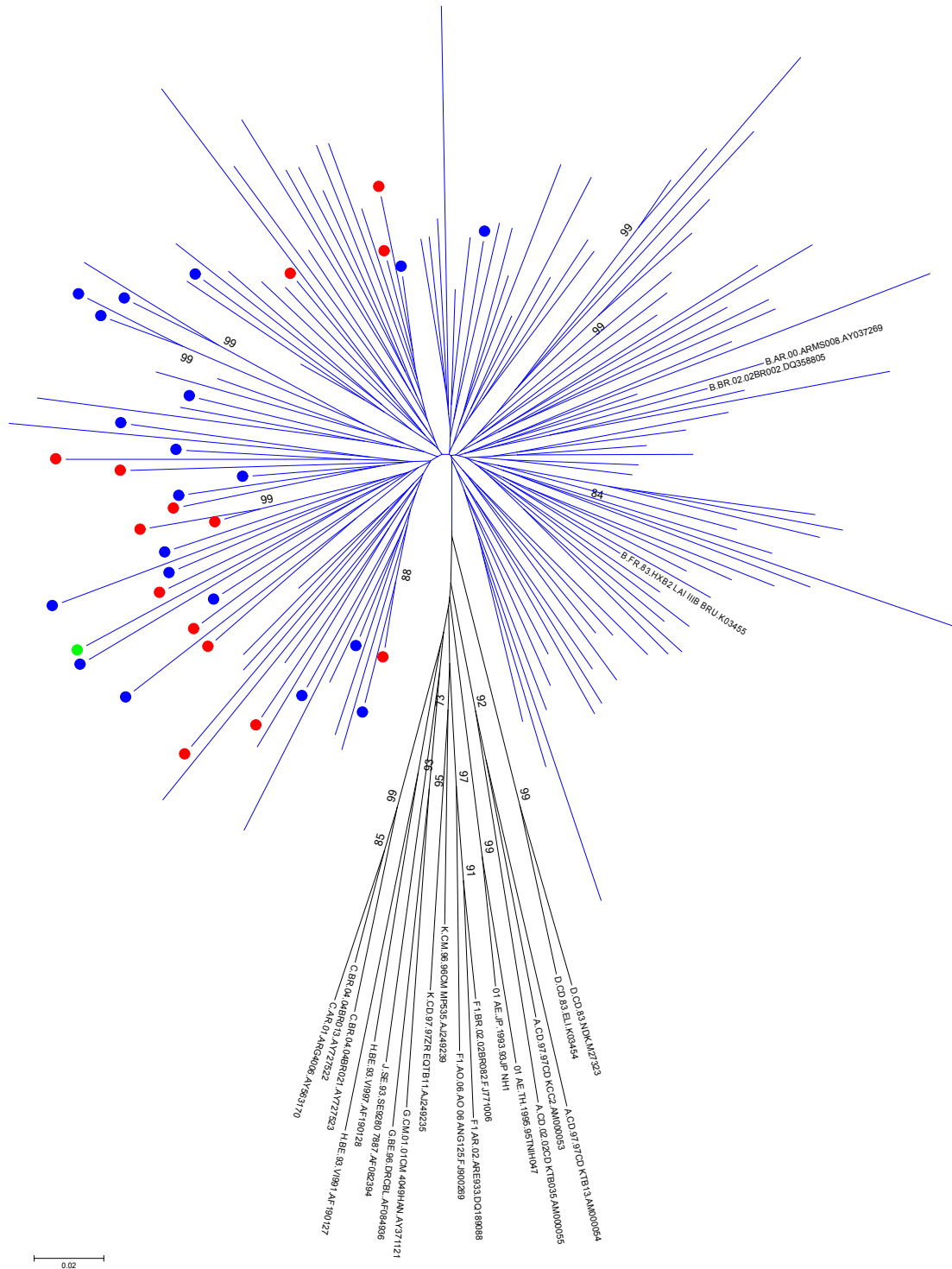


Figura 16: Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras de HIV-1subtipadas como B, onde apenas amostras pertencentes à variante B'' foram marcadas. Os círculos em azul representam as amostras de Progressores intermediários; e os círculos em vermelho as amostras de Progressores rápidos e em verde as amostras de Não progressores de longo termo. As seqüências foram alinhadas com seqüências de referência dos diferentes subtipos obtidas do banco de Los Alamos. Valores de bootstrap acima de 70 estão representados na figura. A barra de escala indica 2% de divergência nas seqüências de nucleotídeos.

F1

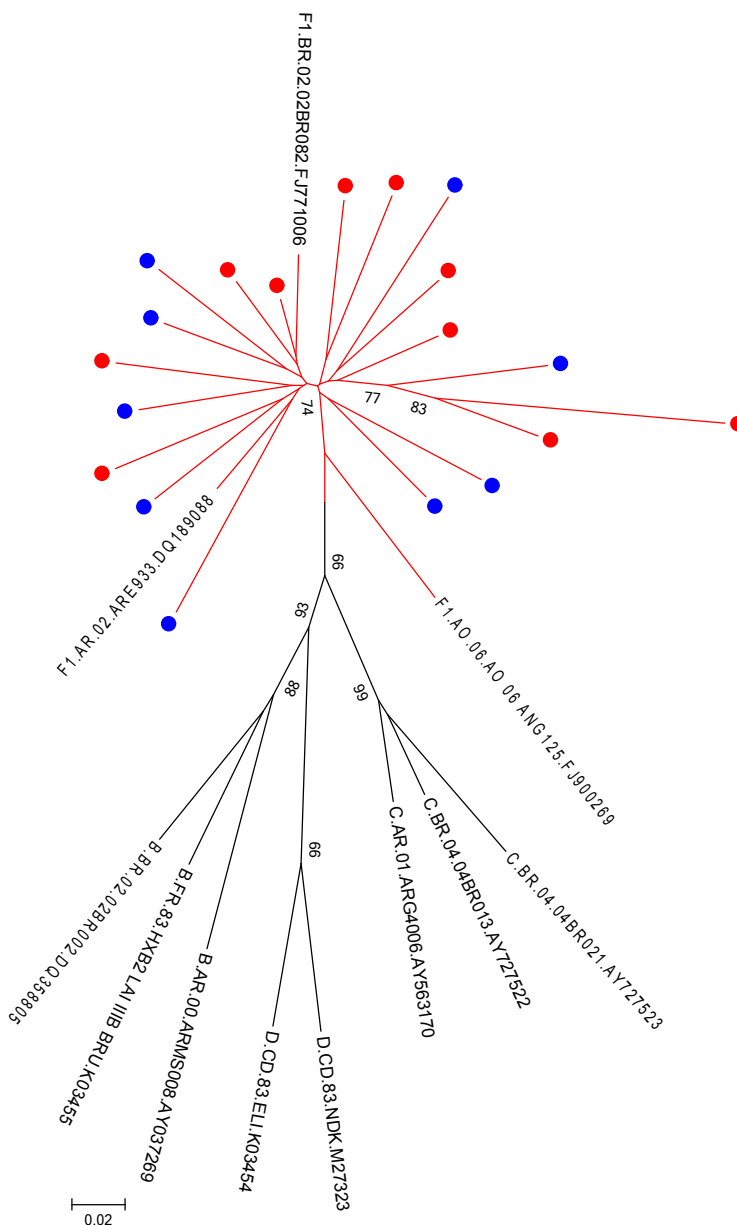


Figura 17: Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento de 456pb correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras de HIV-1 subtipadas como F1. Os círculos em azul representam as amostras de Progressores intermediários e os círculos em vermelho as amostras de Progressores rápidos. As sequências foram alinhadas com sequências de referência dos diferentes subtipos obtidas do banco de Los Alamos. Valores de bootstrap acima de 70 estão representados na figura. A barra de escala indica 2% de divergência nas sequências de nucleotídeos.

5.4. Análise temporal quanto ao uso do correceptor de entrada

Com a finalidade de analisar a troca do uso do correceptor de entrada utilizado pelo vírus nos três principais subtipos/variantes (B, B’ e F1) em dois momentos da progressão (antes e após), foi necessário observar a data de progressão de cada indivíduo analisado e verificar se o mesmo apresentava pelo menos uma amostra biológica com carga viral maior que 1000 cópias/ml em um momento antes e outro após

a progressão para a aids. Do total de indivíduos subtipados, apenas 29 apresentaram amostras estocadas em nosso laboratório nos dois períodos avaliados. Desses, 14 pertenciam ao subtipo B; 7 a variante B^{''}; 6 F1 e 2 pertenciam ao subtipo C. Uma análise filogenética das sequências obtidas antes e após a progressão dos indivíduos avaliados foi realizada e encontra-se apresentada na figura 18. Conforme o esperado, para cada indivíduo, as amostras pertencentes aos dois períodos se agruparam, além disso, foi possível observar que para alguns indivíduos a distância entre suas duas amostras foi curta, demonstrando que as mesmas quase não evoluíram ao longo do tempo.



Figura 18: Análise filogenética por “neighbor-joining”, modelo de substituição de Tamura-Nei, do fragmento correspondente à região C2-V3 do envelope viral das amostras dos indivíduos nos momentos antes (A) e após (P) a progressão. Os círculos em preto representam as amostras obtidas no presente estudo. Os ramos em azul, amostras referentes ao subtipo B, em vermelho amostras referentes ao sub-subtipo F1 e em verde aos subtipo C, D e CRF01_AE. As sequências foram alinhadas com sequências de referência dos diferentes subtipos obtidas do banco de Los Alamos. Valores de bootstrap acima de 70 estão representados na figura. A barra de escala indica 2% de divergência nas sequências de nucleotídeos.

As análises de predição do uso do correceptor realizadas para essas amostras, nos dois momentos, estão sumarizadas na tabela 6. De maneira geral, das 29 sequências de antes da progressão analisadas, 23 (79,3%) foram caracterizadas como vírus R5; 5 (17,2%) foram caracterizadas como vírus X4 e 1 (3,4%) não pode ser classificada devido ao resultado discordante nos distintos métodos de análise. Já em relação às sequências obtidas após a progressão, 20 (69%) foram caracterizadas como vírus R5; 8 (27,6%) como vírus X4 e 1 (3,4%) não classificada pelo mesmo motivo detectado anteriormente. Da análise do uso do correceptor de acordo com o subtipo, dos 14 indivíduos classificados como subtipo B, 10 (71,4%) apresentaram a forma viral R5 antes e após a progressão; 2 (14,3%) apresentaram vírus R5 antes da progressão e X4 após; 1 (7,1%) apresentou perfil X4 antes e após a progressão e, curiosamente, 1 (7,1%) indivíduo apresentou vírus X4 antes e R5 depois da progressão. Dentre os 7 caracterizados como B'', 4 (57,1%) apresentaram vírus R5 antes e após a progressão e 3 (42,9%) apresentaram vírus X4 nos dois momentos. Com relação ao sub-subtipo F1, em 3 (50%) indivíduos foram encontrados vírus R5 antes e após a progressão; 2 (33,3%) apresentaram vírus R5 antes e X4 após a progressão e 1 (16,7%) não pode ser classificado. Quanto aos dois indivíduos subtipados como C, ambos tiveram vírus R5 em nos momentos analisados.

Tabela 6: Análise da predição do uso do correceptor de entrada com base na região da alça V3 com a utilização dos programas Geno2pheno, webPSSM e Regra das posições 11/25.

Amostra	Alça V3	Subtipo	Geno2pheno			webPSSM	Regra das posições 11/25 do V3	Classificação final
			5%	10%	20%			
	(11) (25)							
P12857 A	CTRPSNNTRKGIHF G PGRALYTT- K IIGDIREAHC	B	R5	X4	X4	X4	X4	X4
P	CTRPSNNTRKGIYF G PGRALYTT- K IIGDIREAHC		X4	X4	X4	X4	X4	X4
P13971 A	CTRPNNNTRRGIHI G PGSAFYTT- N IVGDIRKAYC	B	R5	R5	X4	R5	R5	R5
P	CTRPNNNTRRGIIGI G PGRAAFVTT K IVGDIRKAYC		X4	X4	X4	X4	X4	X4
P16712 A	CTRPNNNTRKSIISF G PGSAFYTTG D IIGDIRQAHC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CTRPNNNTRKSIISF G PGSAFYTTG D IIGDIRQAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P17396 A	CTRPGNNTRRSIHI G PGSAWYTTG D IIGDIRQAHC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CTRPGNNTRRSIHI G PGSAWYTTG D IIGDIRQAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P18653 A	CTRPNNNTRKSIITI G PGAFF-TG E IIGNIRKAYC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CTRPNNNTRKSIITI G PGAFF-TG E IIGDIRRAYC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P18875 A	CTRPNNNTRKSIHM G PGRVFFAT- D IIGNIRRAHC	B	R5	X4	X4	X4	R5	X4
P	CIRPNNNTRKSIIPM G PGKVFFAT- D IIGDIRRAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P19054 A	CTRPNNNTRKSIPI G PGRAFFTTG Q IIGDIRQAHC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CTRPNNNTRKRISI G PGRAFFTTG Q IIGDIRQAHC		X4	X4	X4	X4	X4	X4
PR19268 A	CTRPNNNTRRSITI G PGRAFYAT- N IIGNIRDAHC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CTRPNNNTRRSITI G PGRAFYTT- N IIGNIRDAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
PR20042 A	CTRPNNNTRKGIHI G PGRAFYATG Q IIGDIRQAHC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CTRPNNNTRKGIHI G PGRAFYATG Q IIGDIRQAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P20168 A	CTRPNNNTRKSIHF A PGSALYTT- E IIGDIRQAHC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CARPNNNTRKSIHF A PGSAWYTT- E IIGDIRQAHC		R5	R5	X4	R5	R5	R5
PR20791 A	CTRPNNNTRKSIIRI G PGSAFYATG D IIGDIRQAHC	B	R5	R5	X4	R5	R5	R5
P	CSRPNNNTRKSIIRI G PGRAFYATG D IIGDIRQAHC		R5	R5	X4	R5	R5	R5
P21068 A	CTRPNNNTRKSIHM G PGKAFFATG Q IIGDIRKAYC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
P	CTRPNNNTRKSIHM G PGRAFFATG D IIGDIREAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5

P21125	A	CTRPNNNTRKSIHTAFGRITLYATGAIIGDIRKAYC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHTAFGRITLYATGAIIGDIRKAYC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P24503	A	CTRPNNNTRRSIPMGPGKAFFATGDIIGDIRKAHC	B	R5	R5	R5	R5	R5	R5
	P	CTRPNNNTRRSIPMGPGKAFFATGDIIGDIRKAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P13229	A	CTRPNNNTRKSIHIWGGRSLYTVGEIIGNIRQAHC	B"	R5	R5	R5	R5	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHIWGGRSLYTVGEIIGDIRQAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P13707	A	CTRPNNNTSKGIHLGWGRAFYATERITGDIRKAYC	B"	X4	X4	X4	X4	X4	X4
	P	CTRPNNNTSKGIHLGWRRSFFVTEKITGDTRK AFC		X4	X4	X4	X4	X4	X4
P15963	A	CTRPNNNTRKSIHMGWGRAFYATGEIIGDIRQAHC	B"	R5	R5	R5	R5	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHMGWGRAFYATGEIIGDIRQAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
P16290	A	CTRPNNNTRKSIHMGWGRAFYATGEIIGDIRKAYC	B"	R5	R5	X4	R5	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHMGWGRAFYATGEIIGDIRKAYC		R5	R5	X4	R5	R5	R5
P18947	A	CTRPNNNTAKSIHMGWGRVVFHATGRIIGDIRQAHC	B"	X4	X4	X4	X4	X4	X4
	P	CTRPNNNTAKSIHMGWGRVVFHATGRIIGDIRQAHC		X4	R5	X4	X4	X4	X4
P19534	A	CTRPGNYTRKSIYLGWGRALYATGDIIGDKRKAHC	B"	X4	X4	X4	R5	R5	X4
	P	CTRPGNYTRKSIYLGWGRAVYATGDIIGDKRKAHC		X4	X4	X4	X4	R5	X4
P22091	A	CTRPNNNTRKSIHIWGGRALFTTGEIIGEIRKAYC	B"	R5	R5	R5	R5	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHIWGGRALFTTGEIIGEIRKAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
PR13399	A	CTRPNNNTRKSIHI GPGQAFYATGDIIGDIRKAHC	F1	R5	R5	R5	Nr	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHI GPGQAFYATGDIIGDIRKAHC		R5	R5	R5	Nr	R5	R5
P14811	A	CTRPNNNTRKSIHL GPGQAFYATGDIIGDIRKAHC	F1	R5	R5	R5	Nr	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHF GPGHAFHATGNIIGDIRKAHC		R5	R5	R5	Nr	R5	R5
P17862	A	CTRPNNNTRKSIIRI GPGSAFYATGEIIGDIRKAHC	F1	R5	X4	X4	Nr	R5	NÃO CLASSIFICADO
	P	CTRPNNNTRKSIIRI GPGSAFYATGEIIGNIRKAHC		R5	X4	X4	Nr	R5	NÃO CLASSIFICADO
P19378	A	CTRPNNNTRKSIIRI GPGQAFYTTGDIIGDIRKAHC	F1	R5	R5	X4	Nr	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIIRI GPGQAFYTTGDIIGDIRKAHC		X4	X4	X4	Nr	R5	X4

P20393	A	CTRPNNNTRKSIPIGPGRAFYATGDIIGDIRRAHC	F1	R5	R5	R5	Nr	R5	R5
	P	CTRPYKNTRKSIPIGPGRAFYTTGEIIGDIRKAHC		X4	X4	X4	Nr	R5	X4
P21555	A	CTRPNNNTRKSIIRI GPGQAFYATGSIIGDIRKAHC	F1	R5	R5	X4	Nr	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSIHI GPGQAFYATGDIIGDIRKAHC		R5	R5	R5	Nr	R5	R5
PR19552	A	CTRPNNNTRKSMRI GPGQTFYATGDIIGDIRQAHC	C	R5	R5	R5	R5	R5	R5
	P	CTRPNNNTRKSMRI GPGQTFYATGDIIGDIRQAHC		R5	R5	R5	R5	R5	R5
PR20396	A	CVRPNNNTRKSMRI GPGQTFYATGDIIGDIRQAHC	C	R5	R5	R5	R5	R5	R5
	P	CIRPNNNTRKSLRI GPGQTFYATGDIIGDIRQAHC		R5	R5	X4	R5	R5	R5

nr = não realizado

A = sequência antes da progressão; P = sequência após a progressão

As posições 11 e 25 estão destacadas em verde, assim como o topo da alça v3 está em amarelo.

VI. Discussão

6.1. Identificação dos perfis de progressão para a aids

O presente estudo é parte de um projeto maior em desenvolvimento em nosso laboratório, o qual tem como finalidade a avaliação da influência da diversidade viral e dos marcadores genéticos do hospedeiro em indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes perfis de progressão para a aids. Diversos fatores relativos tanto ao perfil genético quanto ao perfil imunológico do hospedeiro, bem como características inerentes ao vírus têm sido associados à progressão, no entanto, a influência viral, ainda é um assunto controverso e poucos estudos abordam essa temática apesar de sua importância. Esse tipo de estudo é de difícil condução, pois em países onde se verifica uma co-circulação bem representativa de subtipos de HIV, não se dispõem de um fluxo regular de exames de contagem de células TCD4⁺ e carga viral para o acompanhamento dos pacientes HIV positivos e de um banco de dados dos pacientes em acompanhamento pelo longo período de infecção, e em países onde há uma boa estrutura para acompanhamento de pacientes, geralmente é observada a prevalência de um subtipo viral, geralmente o subtipo B. No Rio de Janeiro existe uma co-circulação dos subtipos B, F1, recombinantes BF1, além da variante B'' do subtipo B, e há um suporte do governo quanto aos exames de rotina acima citados, os quais são em parte realizados pelo Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/IOC. Além disso, temos uma parceria de longa data com o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), o que nos possibilitou a obtenção de dados clínicos e epidemiológicos para classificação dos pacientes quanto aos distintos perfis de progressão. Neste sentido, o presente estudo nos permite avaliar a associação entre características virais, como o subtipo viral e o uso do correceptor de entrada na célula utilizado pelo vírus, com o curso da infecção.

O primeiro objetivo deste trabalho foi classificar os pacientes HIV positivos em acompanhamento no IPEC, de acordo com os dados clínicos, segundo os perfis de progressão já descritos na literatura: progressores intermediários (PI), progressores rápidos (PR) e não progressores de longo termo (LTNP). Do total de indivíduos analisados, classificamos 486 pacientes. Desses, 58,6% foram classificados como PI; 36,8% como PR e 4,5% como LTNP. De fato, a literatura prevê cerca de 80% de PI, 15% de PR e 5% de LTNP (Pantaleo e Fauci, 1996; revisado por Langford *et al.*, 2007;

Casado *et al.*, 2010), ou seja, a nossa casuística ficou bastante acrescida de PR. Entretanto, é importante destacar que este é um estudo retrospectivo, e que o banco de dados contendo as informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes não foi desenhado exclusivamente para esse estudo, desta forma, muito pacientes tiveram seu acompanhamento comprometido por não retornarem ao hospital para a realização dos exames de rotina. Outros fatores que acarretaram a não classificação foram: ausência de informações importantes para classificação em muitos dos casos, como datas de sorologia negativa e positiva e exames de contagem de células TCD4+; o diagnóstico tardio em muitos casos e uma porcentagem considerável de pacientes que ainda não haviam evoluído para aids até a data de corte de análise do banco, dezembro de 2010.

Os estudos prévios que buscaram uma associação entre os subtipos virais e a progressão para aids foram em grande parte baseados em coortes com pouco tempo de acompanhamento (Amornkul *et al.*, 1999; Kaleebu *et al.*, 2002; Laurent *et al.*, 2002; Kaleebu *et al.*, 2007; Easterbrook *et al.*, 2010); alguns não apresentavam a data da sorologia positiva dos pacientes (Kaleebu *et al.*, 2002; Kaleebu *et al.*, 2007; Vasani *et al.*, 2006); e ainda, alguns utilizaram a sorologia por peptídeos sintéticos como metodologia para subtipagem (Santoro-Lopes *et al.*, 2000; Casseb *et al.*, 2002; De Brito *et al.*, 2006), sendo essa menos fidedigna que os métodos moleculares, com a possibilidade de reatividade cruzada.

Diante deste panorama, esta etapa do presente trabalho foi realizada de forma criteriosa tendo em vista a importância de uma classificação bem consistente dos diferentes perfis de progressão para estudos da possível associação desses perfis com características virais, tais como: subtipo e correceptor utilizado para entrada na célula hospedeira.

6.2. Caracterização molecular e distribuição dos subtipos no Rio de Janeiro

Após a classificação dos indivíduos HIV-1 positivos nos diferentes perfis de progressão para a aids, nosso próximo objetivo consistiu na caracterização molecular das amostras classificadas. Para este fim, utilizamos a região C2-V3 da gp120 do envelope viral, que é uma região bastante polimórfica e, rica em informações

filogenéticas. Além disso, esta é uma região determinante no tropismo de células T e macrófagos (Shioda *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 1991), onde com base nas posições 11 e 25 da alça V3 da gp120 podemos prever o correceptor utilizado pelo vírus para entrada na célula (Fouchier *et al.*, 1992; De Jong *et al.*, 1992); contém o epítipo reconhecido pelos anticorpos que neutralizam a infecção pelo HIV *in vitro* (Palker *et al.*, 1988; Larosa *et al.*, 1990) e estimula uma potente resposta imunológica citotóxica e auxiliar por linfócitos T (Takahashi *et al.*, 1992; Palker *et al.*, 1989). Logo, a região *env* fornece subsídios importantes para o entendimento de forças seletivas que podem influenciar na taxa de progressão da doença, além de ser importante nos estudos de subtipagem do HIV-1.

De acordo com a caracterização molecular das amostras com relação ao subtipo viral, constatamos uma alta prevalência do subtipo B (84,5%), seguido em menor frequência do sub-subtipo F1 (9,2%); e pela detecção de alguns casos dos subtipos C; D; e recombinantes BF1 e CRF01_AE. Estes achados concordam com os previamente descritos em estudos iniciais no Rio de Janeiro com base na região do envelope, os quais demonstram uma prevalência de 75-80% do subtipo B, enquanto que em torno de 10-15% são caracterizados como sub-subtipo F1 (Morgado *et al.*, 1994; Morgado *et al.*, 1998; Tanuri *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2002). É importante ressaltar que atualmente a maioria dos estudos baseia-se na região da polimerase viral e ainda sim um alto percentual de B é descrito, porém, um acréscimo de recombinantes BF1 e diminuição do sub-subtipo F1 é observado (Guimarães *et al.*, 2010).

Casos isolados de subtipos C ,D (Morgado *et al.*, 1998; Couto- Fernandez *et al.*, 2006) já haviam sido descritos no Rio de Janeiro, no entanto esta é a primeira descrição do CRF01_AE. É importante ressaltar a recente disseminação do subtipo C para outras regiões além do Sul (Cardoso *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Brígido *et al.*, 2011). Destacamos ainda uma manutenção da frequência de amostras da variante B” dentro do grupos de amostras caracterizadas como subtipo B, que foi de 28,9% neste estudo e 30 a 40% em estudos prévios (Potts *et al.*, 1993; Morgado *et al.*, 1994; Morgado *et al.*, 1998).

Alguns estudos realizados na região Sudeste demonstram correlação entre o sub-subtipo F1 e a categoria dos usuários de drogas injetáveis (UDIs), apontando uma alta proporção de F1 (19-23%) nesses indivíduos, o que indica que a frequência deste pode

diferir de acordo com a categoria de exposição (Rossini *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2004; Maia Teixeira *et al.*, 2006). Entretanto, essa associação não foi observada no presente estudo.

Frente a essa cocirculação dos subtipos B e F1 do HIV-1 no Rio de Janeiro, os eventos de recombinação se mostram frequentes, e bastante documentados em estudos baseados na região da polimerase viral, ou envolvendo mais de uma região genômica. Nesse estudo encontramos 1,3% de recombinantes BF1, uma taxa bem menor se comparada a detectada (4 a 7,6%) em estudos realizados no Rio de Janeiro com base na região polimerase (Ramos *et al.*, 1999; Eyer-Silva e Morgado, 2007; Sa Ferreira *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010). Essa baixa representatividade de recombinantes já era esperada, visto que a região do envelope viral possui um alto polimorfismo e consequentemente uma baixa frequência de recombinações (Magiorkinis *et al.*, 2003).

Através de uma análise preliminar de Neighbor-Joining não foi possível verificar indícios de circulação de linhagens de vírus subtipo-específicas entre os diferentes perfis de progressão, no entanto temos como perspectiva a realização de uma análise de máxima verossimilhança ou bayesiana, as quais são mais robustas para esta análise.

Estudos prévios realizados com base na região do envelope descreveram um agrupamento entre as amostras da variante B” demonstrando relação filogenética entre essas, assim como foi verificado no presente estudo.

6.3. Análise da distribuição dos subtipos nos perfis de progressão

Apesar de alguns estudos terem sugerido a associação da variante B” com um perfil mais lento de progressão (Santoro-Lopes *et al.*, 2000; Casseb *et al.*, 2002; De Brito *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2010), no presente estudo não verificamos esta associação. Nossos resultados estão de acordo com os achados de um estudo recentemente publicado (Sucupira *et al.*, 2012) que também não encontra associação entre a variante B” e a progressão mais lenta. Vale ressaltar, que diferentemente do nosso estudo, a maioria desses trabalhos utilizaram técnicas de subtipagem das amostras baseadas em ensaios sorológicos com peptídeos sintéticos, que são técnicas menos sensíveis podendo resultar em falso-positivos, o que não ocorre em ensaios moleculares. No trabalho de Santoro-Lopes (2000), dos 331 indivíduos pertencentes ao subtipo B,

mais de 60% foram caracterizados como B”, porcentagem muito acima do esperado para essa variante.

Uma frequência aumentada do sub-subtipo F1 nos grupos dos progressores rápidos foi observada, porém, esta não reflete em significância estatística. Entretanto, até o presente momento não temos relato de nenhum estudo sobre progressão e subtipo F.

Observamos ainda, que as três amostras de subtipo D detectadas nesse estudo apresentaram um perfil rápido de progressão, concordando com estudos que descrevem uma progressão mais acelerada em infectados por esse subtipo (Kaleebu *et al.*, 2001 e 2002; Baeten *et al.*, 2007; Kiwanuka *et al.*, 2008; Easterbrook *et al.*, 2010).

6.4. Análise temporal do uso do correceptor de entrada utilizado pelo vírus

Diversos estudos tem sugerido que a troca do uso do correceptor CCR5 para CXCR4 está relacionada com a progressão para aids (Berger *et al.*, 1999; Brumme *et al.*, 2005; Kaleebu *et al.*, 2007; Coetzer *et al.*, 2006; Thielen *et al.*, 2010), sendo assim, com o objetivo de avaliar essa dinâmica, um subconjunto de amostras foi avaliado em dois momentos da infecção.

Na análise temporal quanto ao uso do correceptor de entrada verificamos que a maior parte dos indivíduos infectados pelo subtipo B manteve o perfil de vírus R5 ao longo da infecção e que 14,3% fizeram a troca de R5 para X4. Este resultado difere do observado em estudos prévios nos quais mais de 50% dos infectados pelo subtipo B apresentam uma emergência de vírus X4 (Connor *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 1999; revisto por Araújo *et al.*, 2010). Os demais 7,1% apresentaram vírus X4 em ambos os momentos avaliados concordando com relatos de artigos que detectaram a presença destes em 4 a 15,9% dos casos (De Mendonza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Frange *et al.*, 2009). Estes dados demonstram que a progressão para aids não está relacionada somente ao perfil biológico do vírus. Com relação às amostras analisadas do sub-subtipo F1, três (50%) apresentaram vírus R5 em ambos os momentos analisados e duas (33,3%) fizeram a troca do correceptor de CCR5 para CXCR4. Dentre aqueles infectados pela variante B”, uma porcentagem considerável (42,9%) apresentou vírus

X4 já no início da infecção. Essa porcentagem encontrada é superior ao esperado para o início da infecção, e não concorda com os estudos que descreveram que vírus B²⁷ utilizam exclusivamente o correceptor CCR5, apontando para uma progressão mais lenta para a aids nesses indivíduos (Leal *et al.*, 2008).

Ainda com relação a variante B²⁷, em um trabalho recente, Sucupira e colaboradores (2012) sugeriram que o Triptofano pode ser substituído por outro aminoácido ao longo do tempo, visto que este é codificado pelo códon TGG e o HIV-1 apresenta um processo de hipermutação do nucleotídeo G para A, comum aos retrovírus. E atribuíram a este fato, a ausência de correlação entre a variante B²⁷ e a progressão lenta para a aids em seu estudo. No entanto, na análise temporal das amostras avaliadas de indivíduos infectados pela variante B²⁷, não verificamos mudando do Triptofano por outro aminoácido.

As duas amostras de subtipo C analisadas apresentaram vírus R5 tanto antes quanto após a progressão, concordando com estudos prévios que relatam o uso preferencial deste correceptor para este subtipo (Ping *et al.*, 1999; Cecilia *et al.*, 2000; Coetzer *et al.*, 2011). A reduzida incidência de vírus X4 nesses indivíduos pode ser atribuída ao fato deste requerer mais mutações no V3 do que outros subtipos. Desta forma, os subtipos podem desenvolver estratégias distintas para a mudança da utilização do correceptor (Coetzer *et al.*, 2011).

Com relação às análises de predição do uso dos correceptores, esperávamos ter um número de amostras mais representativo de amostras por subtipo avaliado, entretanto, encontramos alguns problemas na inclusão dessas amostras, tais como: condições de armazenamento; carga viral abaixo de 1000 cópias/ml, não disponibilidade de amostras para utilização. Tínhamos como objetivo inicial selecionar amostras com tempo equivalente entre elas nos dois momentos estudados a fim de viabilizar uma comparação mais acurada da troca do correceptor utilizado pelo vírus ao longo da infecção. Diante do exposto, ficamos limitados a incluir todas as amostras que apresentassem qualquer visita antes e após a progressão, sem nos preocuparmos que todas tivessem o mesmo intervalo de tempo. Como perspectiva, pretendemos aumentar o número de amostras analisadas através da inclusão de indivíduos não classificados por ainda não terem evoluído para aids.

As análises a partir de assinaturas específicas do topo da alça V3 (posições 11 e 25) da gp120 são bastante comuns para inferir a predição do uso dos correceptores utilizados pelo vírus para entrada na célula. Apesar da técnica padrão-ouro ser o ensaio fenotípico, alguns programas facilitam a predição e são amplamente utilizados, como o webPSSM e Geno2pheno. Entretanto, esses programas não discriminam os vírus R5X4. Além da região V3, já foi descrito que outras regiões da gp120 também podem influenciar nesse sentido. Vale ressaltar que estudos de predição dos correceptores utilizados pelos vírus são de extrema importância para estudos terapêuticos.

O presente estudo nos permitiu melhor entendimento sobre a variante B” do subtipo B tipicamente brasileira, onde observamos a manutenção desta na população de indivíduos infectados no Rio de Janeiro e uma não-associação desta com a progressão para aids. Enfatizamos ainda a importância de novos estudos com maior amostragem para verificar a possível influência do sub-subtipo F1 com a progressão mais acelerada para a aids. Além disso, reforçamos a possível associação entre o uso do correceptor de entrada pelo vírus ao longo da infecção e o subtipo viral. No seu conjunto, os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de melhor se compreender características virais que possa apontar marcadores de prognóstico para a aids.

VII. Conclusões

- ✓ A prevalência dos subtipos verificados nesse estudo concorda com os previamente descritos no Rio de Janeiro;
- ✓ Não foi verificada a circulação de linhagens de vírus subtipo-específicas nos diferentes grupos de progressores;
- ✓ Detectamos uma maior frequência do sub-subtipo F1 no grupos dos progressores rápidos, embora sem significância estatística;
- ✓ Não observamos associação da variante B” e a progressão mais lenta para a aids;
- ✓ Uma porcentagem considerável de vírus X4 no início da infecção em indivíduos infectados pela variante B” foi observada. Fato que corrobora a ausência de associação dessa variante com a progressão mais lenta para a aids.

VIII. Referências Bibliográficas

Aguayo N, Laguna-Torres VA, Villafane M, Barboza A, Sosa L, Kochel T *et al.* Epidemiological and molecular characteristics of HIV-1 infection among female commercial sex workers, men who have sex with men and people living with AIDS in Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 May-Jun;41(3):225-31.

Aids Epidemic Update, UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World Health Organization, 2009. [on line] [Capturado em agosto de 2012]. Disponível em <http://www.unaids.org>

Alaeus A. Significance of HIV-1 genetic subtypes. *Scand J Infect Dis* 2000; 32(5):455-463.

Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Mar;29(3):216-26.

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science.* 1996 Jun 28;272(5270):1955-8.

Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES, Hecht FM, Lee PK, Vogel M, Yu XG, Draenert R, Johnston MN, Strick D, *et al.* Influence of HLA-B*57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2003, 17: 2581–2591.

Amornkul PN, Tansuphasawadikul S, Limpakarnjanarat K, Likanonsakul S, Young N, Mastro TD *et al.* Clinical disease associated with HIV-1 subtype B' and E infection among 2104 patients in Thailand. *AIDS.* 1999 Oct 1;13(14):1963-9.

Araujo AF, Brites C, Monteiro-Cunha J, Santos LA, Galvao-Castro B, Alcantara LC. Lower prevalence of human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B found in northeastern Brazil with slower progression to AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010 Nov;26(11):1249-54. Epub 2010 Sep 21.

Archary D, Gordon ML, Green TN, Coovadia HM, Goulder PJ, Ndung'u T. HIV-1 subtype C envelope characteristics associated with divergent rates of chronic disease progression. *Retrovirology.* 2010 Nov 4;7:92.

Aulicino PC, Bello G, Guimaraes ML, Ruchansky D, Rocco C, Sen L *et al.* Longitudinal analysis of HIV-1 BF1 recombinant strains in vertically infected children from Argentina reveals a decrease in CRF12_BF pol gene mosaic patterns and high diversity of BF unique recombinant forms. *Infect Genet Evol.* 2011 Mar;11(2):349-57. Epub 2010 Dec 3.

Aulicino PC, Gómez-Carrillo M, Bello G, Rocco C, Mangano A, Carr J, Sen L, Foley B. Characterization of full-length HIV-1 CRF17_BF genomes and comparison to the prototype CRF12_BF strains. *Infect Genet Evol.* 2012 Mar;12(2):443-7. Epub 2012 Jan 12

Aulicino PC, Bello G, Rocco C, Romero H, Mangano A, Morgado MG, Sen L. Description of the first full-length HIV type 1 subtype F1 strain in Argentina: implications for the origin and dispersion of this subtype in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Oct;23(10):1176-82.

Ayouba A *et al.* HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg. Infect. Dis.* 2001. 7, 466–467

Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, *et al.* HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis.* 2007 Apr 15;195(8):1177-80. Epub 2007 Mar 2.

Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, *et al.* Control of viremia and prevention of clinical Aids in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science.* 2000 Oct;290(5491):486-92.

Barreto CC, Nishyia A, Araújo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 Mar;41(3):338-41.

Bello G, Zanotto PM, Iamarino A, Gräf T, Pinto AR, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Phylogeographic analysis of HIV-1 subtype C dissemination in Southern Brazil. *PLoS One.* 2012;7(4):e35649. Epub 2012 Apr 18.

Bello G, Aulicino PC, Ruchansky D, Guimarães ML, Lopez-Galindez C, Morgado MG *et al.* Phylodynamics of HIV-1 circulating recombinant forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology.* 2010 Mar 22;7:22.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:657-700.

Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de DST e AIDS. Ministério da Saúde. [online]. Brasil; 2011 (julho de 2010 a junho de 2011). [capturado em 7 de julho de 2012]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary Human-Immunodeficiency-Virus type-1 infection. *J Virol.* 1994 Sep;68(9):6103-10.

Brander C, Frahm N, Walker BD: The challenges of host and viral diversity in HIV vaccine design. *Curr Opin Immunol* 2006, 18:430-437

Brígido LF, Ferreira JL, Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG, Estevam DL, Rodrigues R; São Paulo HIV Salvage Workgroup. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Mar;27(3):339-44. Epub 2010 Oct 15

Brígido LF, Nunes CC, Oliveira CM, Knoll RK, Ferreira JL, Freitas CA, *et al*. HIV type 1 subtype C and CR1 recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec;23(12):1579-86.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Tanuri A *et al*. Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIVBResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17(7):1063-1069.

Brummer ZL, Goodrich J, Mayer HB, *et al*. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. *J Infect Dis* 2005; 192:466–474.

Cabral VP, Cunha CB, Magalhaes EF, Pinto-Neto LF, Couto-Fernandez JC, Dietze R, *et al*. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Dec;101(8):881-5.

Caffrey M, Cai M, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield PT, Covell DG. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *The Embo Journal*. 1998 Aug 17;17(16):4572-84.

Cardoso LP, Pereira GA, Viegas AA, Schmaltz LE, Stefani MM. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil. *J Med Virol*. 2010 Mar;82(3):351-7.

Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E *et al*. Drug resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing 99 HAART. *Virology* 2000; 275(1): 107-115.

Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, Salomon H, Hierholzer J, Watanaveeradej V, McCutchan FE *et al*. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS*. 2001 Oct 19;15(15):F41-7.

Casado C, Colombo S, Rauch A, Martínez R, Günthard HF, Garcia S, *et al*. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* 2010, 5:e11079.

Casper C, Navér L, Clevestig P, Belfrage E, Leitner T, Albert J, *et al*. Coreceptor change appears after immune deficiency is established in children infected with different HIV-1 subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002 Mar 20;18(5):343-52.

Casseb J, Komninakis S, Abdalla L, Brigido Lf, Rodrigues R, Araújo F, *et al.* HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *Int J Infect Dis.* 2002;6:164-9.

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 Jun 5;271(2):253-8.

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

Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997;89(2):263-73.

Chandramouli B, Chillemi G, Abbate I, Capobianchi MR, Rozera G, Desideri A J. Importance of V3 Loop Flexibility and Net Charge in the Context of Co-Receptor Recognition. A Molecular Dynamics Study on HIV gp120. *Biomol Struct Dyn.* 2012 Apr;29(5):879-91.

Cherrington J, Ganem D. Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *EMBO J* 1992; 11(4):1513-1524.

Cicala C, Arthos J, Fauci AS. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *Journal of Translational Medicine* 2011. Jan 27;9 Suppl 1:S2.

Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, Morris L *et al.*, 2003. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol.* 2003 Apr;77(7):4449-56

Clapham PR, Weiss RA. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature* 1997; 388(6639): 230-231.

Clavel F, Guyader M, Guetard D, *et al.* Molecular cloning and polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 1986; 324(6098):691-695.

Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, Swanstrom R, Morris L. Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology.* 2006 Dec 5-20;356(1-2):95-105. Epub 2006 Aug 30.

Coetzer M, Nedellec R, Cilliers T, Meyers T, Morris L, Mosier DE. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011 Jan;56(1):9-15

Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N *et al.* Human immunodeficiency viruses. *Science* 1986; 232(4751):697.

- Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3(1):11-18.
- Cohen OJ, Kinter A, Fauci AS. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol Rev.* 1997 Oct;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, Kalams SA, 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, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med.* 1997 Feb 17;185(4):621-8.
- 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(1):73-78.
- Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Morgado MG *et al.* Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006 Feb;22(2):207-11
- Covas DT, Bísvaro 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 Sep 1;19(1):74-9
- De Brito A, Komninakis SC, Novoa P, De Oliveira RM, Fonseca LA, Duarte AJ, Casseb J. Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). *Clin Infect Dis.* 2006 Dec 1;43(11):1476-81. Epub 2006 Oct 26.
- 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
- De Mendoza C, Van Baelen K, Poveda E, Rondelez E, Zahonero N, Spanish HIV Seroconverter Study Group, *et al.* Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008 Jul 1;48(3):241-4.

De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro 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):1-13.

Delatorre EO, Bello G, Eyer-Silva WA, Chequer-Fernandez SL, Morgado MG, Couto-Fernandez JC. Evidence of Multiple Introductions and Autochthonous Transmission of the HIV Type 1 CRF02_AG Clade in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Apr 13

Delgado E, Ríos M, Fernández J, Pérez-Alvarez L, Nájera R, Thomson MM. Identification of a new HIV type 1 BF intersubtype circulating recombinant form (CRF44_BF) in Chile. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 Jul;26(7):821-6.

Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Jan;29(1):58-65. Epub 2011 Jan 5.

Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Mokili JL, Muldoon M, Denham SA, *et al*. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science*. 2004 Mar 26;303(5666):2019-22.

Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, *et al*. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc*. 2010 Feb 3;13:4.

Easterbrook PJ. Non-progression in HIV infection. *AIDS* 1994, 8:1179-82.

Eyer-Silva WA, Morgado MG. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Nov;102(7):809-15.

Ferreira AS, Cardoso LP, Stefani MM. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and high HIV-1 genetic diversity in patients from Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J Med Virol*. 2011 Aug;83(8):1301-7. doi: 10.1002/jmv.22128.

Ferreira JL, Thomaz M, Rodrigues R, Harrad D, Oliveira CM, Brigido LF *et al*. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Dec;103(8):800-8.

Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol*. 1992 May;66(5):3183-7.

Franca R, Castro-Jorge L, Fonseca B, *et al*. Genotypic characteristics of HIV Type 1 based on gp120 hypervariable region 3 of isolates from Southern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Aug;27(8):903-9.

Frange P, Galimand J, Goujard C, Deveau C, Ghosn J, Chaix ML, *et al.* High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jul;64(1):135-41

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

Freed EO. HIV-1 replication. *Somat cell mol Genet* 2001;26(1-6):13-33.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397(6718):436-441.

Gao F, Vidal N, Li Y, Trask S, Chen Y, Kostrikis L, *et al.* Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2001 May;17(8):675-88.

Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, *et al.* Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med.* 2001; 344(22):1668-75.

Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* 2001; 2(7):580-585.

Gomez C & Hope TJ. The ins and outs of HIV replication. *Cell. Microbio.* 2005; 7(5):621-626

Goto T, Ashina T, Nakai M. Projection structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) observed with high resolution electron cryo-microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo).* 1994 Feb;43(1):16-9.

Goto T, Nakai M, Ikuta K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron* 1998; 29(2-3):123-138.

Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(15):5781-5785.

Guimaraes ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado MG; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18(17):1261-1269.

Guimarães ML, Eyer -Silva WA, Couto - Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_{BF} in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS.* 2008 Jan 30;22(3):433-5.

- Guimarães ML, Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva Wde A, Teixeira SL, Chequer-Fernandez SL, Morgado MG. Analysis of HIV-1 BF pr/rt recombinant strains from Rio de Janeiro/Brazil reveals multiple unrelated mosaic structures. *Infect Genet Evol.* 2010 Oct;10(7):1094-100. Epub 2010 Jul 16.
- Guimarães ML, Velarde-Dunois KG, Segurondo D, Morgado MG. The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12_BF "family" strains. *Virol J.* 2012 Jan 16;9:19
- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000; 287(5453):607-614.
- Hartley, O., Klasse, P.J., *et al.* V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2005. 21 (2), 171–189.
- Hemelaar J, Gousws E, Ghys Pd, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006: 20(16):13-23.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS.* 2011 Mar 13;25(5):679-89.
- Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med.* 2012 Mar;18(3):182-92. Epub 2012 Jan 11.
- Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuane H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM, *et al.* New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol.* 1999; 162(11):6942-46.
- Hierholzer J, Montano S, Carr JK, *et al.* Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002 Dec 10;18(18):1339-50.
- HIV Sequence Database. The Circulating Recombinant Forms (CRFs). Los Alamos National Laboratory. [on line]. California,USA; [capturado em 7 de Julho de 2012]. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
- Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 1995; 69(11):6810-6818.
- Huang W, Toma J, Stawiski E, Fransen S, Wrin T, Petropoulos CJ, *et al.* Characterization of human immunodeficiency virus type 1 populations containing CXCR4-using variants from recently infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009 Aug;25(8):795-802.
- Hwang SS, Boyle TJ, Kim-Lyerly H and Cullen BR. Identification of the envelop V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991; 253:71-74

Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Katzenstein TL, et al: Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med* 2001, 135:782-795.

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

Kaleebu P, French N, Mahe C, *et al.* Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis.* 2002 May 1;185(9):1244-50.

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 Feb 16;15(3):293-9.

Kaleebu P, Nankya IL, Yirrell DL, Shafer LA, Kyosiimire-Lugemwa J, Whitworth JA *et al.* Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007 May 1;45(1):28-33.

Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med.* 1996; 2(4):405-11.

Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, McCutchan F, *et al.* Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2008 Mar 1;197(5):707-13.

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

Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull.* 2001;58:19-42

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011

Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Res Ther.* 2007 May 14;4:11.

Larosa GJ, Davide JP, Weinhold K, Waterbury JA, Profy AT, Shadduck P *et al.* Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 1990;249:932-935.

Laurent C, Bourgeois A, Faye MA, Mougnotou R, Seydi M, Delaporte E *et al.* No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02_AG strain and patients not infected with CRF02_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *J Infect Dis.* 2002 Aug 15;186(4):486-92. Epub 2002 Jul 19.

Leal E, Silva WP, Sucupira MC, Janini LM, Diaz RS. Molecular and structural characterization of HIV-1 subtype B Brazilian isolates with GWGR tetramer at the tip of the V3-loop. *Virology.* 2008 Nov 25;381(2):222-9. Epub 2008 Sep 23.

Leavitt SA, SchOn A, Klein JC, Manjappara U, Chaiken IM, Freire E. Interactions of HIV-1 proteins gp120 and Nef with cellular partners define a novel allosteric paradigm. *Curr Protein Pept Sci.* 2004 Feb;5(1):1-8.

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.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):367-77.

Locateli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcântara LC, Ferreira LG, Pinto AR *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol.* 2007 Oct;79(10):1455-63.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG *et al.* Full length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999;73(1):152-160.

Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(5):561-567.

Machado L, Ishak M, Vallinoto A, Lemos J, Azevedo V, Moreira M, *et al.* Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses.* 2009 Oct;25(10):961-6.

Magiorkinis G, Paraskevis D, Vandamme AM, Magiorkinis E, Sypsa V, Hatzakis A. In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J Gen Virol.* 2003 Oct;84(Pt 10):2715-22.

Maia Teixeira SL, Bastos FI, Hacker MA, Guimarães ML, Morgado MG. Trends in drug resistance mutations in antiretroviral-naïve intravenous drug users of Rio de Janeiro. *J Med Virol*. 2006 Jun;78(6):764-9.

Marx Pa, Munn Rj, Joy Ki. Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. *Lab Invest* 1988; 58(1):112-118.

Meloni S, Kim B, Sankalé J, Hamel D, Tovanabutra S, Mboup S, *et al*. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol*. 2004 Nov;78(22):12438-45.

Michael NL, Chang G, Louie LG, Mascola JR, Dondero D, Birx DL, Sheppard HW: The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997, 3:338-340.

Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:223-48.

Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(2): 143-150.

Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Neves Junior I, Costa CI, dos Santos VG *et al*. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(3):339-342.

Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBG, *et al*. Molecular epidemiology of HIV in Brazil: High prevalence of B subtype and identification of an HIV-1 subtype D infection in Rio de Janeiro city. *AIDS & Humam Retro* 1998; 488-494.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD *et al*. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(5): 569-576.

Palker TJ, Clark ME, Langlois AJ, Matthews TJ, Weinhold KJ, Haynes BF, *et al*. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 1988;85(6):1932-6.

Palker TJ, Matthews TJ, Langlois A, Tanner ME, Martin ME, Haynes BF, Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. *Journal of immunology* 1989;142(10):3612-9.

Pant Pai N, Shivkumar S, Cajas JM. Does genetic diversity of HIV-1 non-B subtypes differentially impact disease progression in treatment-naïve HIV-1-infected individuals?

- A systematic review of evidence: 1996-2010. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 Apr 1;59(4):382-8. Review.
- Pantaleo G. and Fauci A. Immunopathogenesis of Hiv Infection. *Annu. Rev. Microbiol*. 1996. 50:825–54.
- Pantaleo G. Immunology of HIV infection. *Res Immunol*. 1997 Jul-Aug;148(6):417-9.
- Pastore C., Nedellec R., *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J. Virol* 2006. 80 (2), 750–758.
- Peterlin Bm, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):97-107. Review.
- Piatak MJ, Saag M, Yang L, Clark S, Kappes J, Luk K, *et al*. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993 Mar;259(5102):1749-54.
- Ping LH, Nelson JA, Hoffman IF, Schock J, Lamers SL, Goodman M, *et al*. Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: underrepresentation of X4 variants. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):6271-81
- Pires IL, Soares MA, Speranza FAB, Ishii SK, Vieira MCG, Gouvea M, *et al*. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the Army Health Service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):426-30.
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, *et al*. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):871-2.
- Poignard P, Klasse P, Sattentau Q. Antibody neutralization of HIV-1. *Immunol Today*. 1996 May;17(5):239-46.
- Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA *et al*. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *AIDS* 1993; 7(9):1191-1197.
- Raboni SM, Almeida SM, Rotta I, Ribeiro CR, Rosario D, Ellis R, *et al*. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Dec; 105(8):1044-9.
- Ramos A, Tanuri A, Schechter M, Rayfield MA, Hu DJ, Pieniazek D, *et al*. Dual and recombinant infections: an integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 1999 Jan-Feb;5(1):65-74.

Roberts Jd, Bbenek K, Kuntel Ta. The accuracy of reverse transcriptase froHIV-1. Science 1988: 242(4882):1171-1173.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK *et al.* HIV-1 Nomenclature proposal. Science 2000; 288:55-56.

Robertson DL, Sharp PM, Mccutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. Nature 1995:374(6518):124-126.

Rodrigues R, Manenti S, Romao PR, de Paula Ferreira JL, Batista JP, Siqueira AF, de Macedo, Brigido LF. Young pregnant women living with HIV/AIDS in Criciúma, Southern Brazil, are infected almost exclusively with HIV type 1 clade C. AIDS Res Hum Retroviruses. 2010 Mar;26(3):351-7.

Rong R, Bibollet-Ruche F, Mulenga J, Allen S, Blackwell JL, Derdeyn CA. Role of V1V2 and other human immunodeficiency virus type 1 envelope domains in resistance to autologous neutralization during clade C infection. J Virol. 2007; 81(3):1350-9.

Roquebert B, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D. Diversité génétique des VIH et ses conséquences HIV genetic diversity and its consequences. Pathologie Biologie 2009; Mar;57(2):142-8.

Roques P *et al.* Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. AIDS 2004. 18, 1371–1381.

Rossini MA, Diaz RS, Caseiro M, Turcato G, Accetturi CA, Sabino EC. HIV-1 subtypes among intravenous drug users from two neighboring cities in São Paulo State, Brazil. Braz J Med Biol Res. 2001 Jan;34(1):45-7.

Rubbert A, Ostrowski M. In: Third Edition, Chapter 4- Pathogenesis of HIV-1 infection. 2005; 59-82. Editores: Christian Hoffmann, Jurgen K. Rockstroh, Bernd Sebastian Kamps. HIV Medicine 2005 Editora Flying Publisher.com, Paris

Ruchansky D, Casado C, Russi JC, Arbiza JR, Lopez-Galindez C. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38_BF1) in Uruguay. AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 Mar;25(3):351-6.

Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V *et al.* Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. J Virol 1994; 68(10):6340-6346.

Sá-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A, Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors. Transfusion. 2007 Jan;47(1):97-102.

Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *J Virol*. 2010 Apr 16;74:74.

Sanabani SS, Pastena ER, da Costa AC, Martinez VP, Kleine-Neto W, Kallas EG *et al*. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(10):e25869. Epub 2011 Oct 14.

Santoro-Lopes G, Harrison LH, Tavares MD, Xexeo A, Dos Santos AC, Schechter M. V3-binding serotypes and HIV disease progression in Brazil: is B different from B'?" *AIDS Res Hum Retrov* 2000; 16:953-958.

Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E *et al*. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS* 2006; 20(16):2011-2019.

Sattentau QJ, Moore JP, Vignaux F, Traincard F, Poignard P. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* 1993; 67(12): 7383-7393.

Sengupta S, Jana S, Roy P, Sarkar K, Bhattacharya Sk, Chakrabarti S. Phylogenetic analysis of the p24-p7 region of the human immunodeficiency virus type 1 gag gene to determine subtype distribution among female sex workers in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5787-91.

Shioda T, Levy JA, and Cheng-Mayer C. Macrophage and T-cell line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120. *Nature (London)* 1991; 349:167-169.

Silva MM, Telles FQ, da Cunha CA, Rhame FS. HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010 Sep-Oct; 14(5): 495-501

Simon F *et al*. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med*. 4, 1998. 1032–1037.

Simon D, Béria JU, Tietzmann DC, Carli R, Stein AT, Lunge VR. Prevalence of HIV-1 subtypes in patients of an urban center in Southern Brazil. *Rev Saude Publica*. 2010 Dec;44(6):1094-101. Epub 2010 Oct 8. Portuguese.

Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; 19 Suppl 4:S81-86.

Stein MC, Wang B, Dwyer DE, Saksena NK. HIV-1 co-infection, superinfection and recombination. *Sex Health* 2004;1(4):239-50.

Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 1987; 328(6132):728-730.

Strebel K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS*. 2003;17 Suppl 4:S25-34

Sucupira MC, Sanabani S, Cortes RM, Giret MT, Tomiyama H, Diaz RS, *et al.* Faster HIV-1 disease progression among Brazilian individuals recently infected with CXCR4-utilizing strains. *PLoS One*. 2012;7(1):e30292. Epub 2012 Jan 26.

Takahashi H; Nakagawa Y; Pendleton CD; Houghten RA; Yokomuro K; Berzofsky JA, *et al.* Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing an HIV-1 envelope determinant. *Science* 1992;355:333-336.

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(1):60-66.

Teixeira SL, Bastos FI, Telles PR, Hacker MA, Brigido LF, de F Oliveira CA *et al.* HIV- 1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity. *J Clin Virol* 2004; 31(3):221-226.

Thielen A, Sichtign N, Kaiser R, Lam J, Harrigan PR, Lengauer T. Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010; 202(9): 1435-1443.

Toledo PV, Carvalho DS, Rossi SG, Brindeiro R, de Queiroz-Telles F. Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Paraná, Brazil. *Braz Infect Dis*. 2010 May-Jun; 14(3):230-6.

Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, *et al.* High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology*. 1999 Jun;259(1):99-109.

Varella RB, Ferreira SB, Castro MB, Tavares MD, Zalis MG. Prevalence of resistance associated mutations in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals failing HAART in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2008 Oct;12(5):380-4.

Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, Chaplin B, Msamanga G, Hunter D *et al.* Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 15;42(6):843-52. Epub 2006 Feb 9. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2006 Sep 1;43(5):671.

Velarde-Dunois KG, Guimarães ML, La Fuente C, Andrade R, Arévalo R, Pantoja S, *et al.* Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1-infected

individuals from bolivia reveals the presence of two distinct genetic subtypes B and F. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000 Nov 20;16(17):1921-6.

Veras NMC, Veras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brigido MM, *et al*. HIV type 1 genetic variability in Central Brazil. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec;23(12):1481-9.

Vicente AC, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Tanuri A, *et al*. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000 Apr 1;23(4):327-31.

Vidal N, Mulanga C, Bazepeo S, Lepira F, Delaporte E, Peeters M. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. *Aids Res Hum Retroviruses*. 2006 Feb;22(2):182-7.

Walensky R, Rosenberg E, Ferraro M, Losina E, Walker B, Freedberg K. Investigation of primary human immunodeficiency virus infection in patients who test positive for heterophile antibody. *Clin Infect Dis*. 2001 Aug;33(4):570-2.

Walker BD, Burton DR: Toward an AIDS vaccine. *Science* 2008, 320:760-764.

World Aids Day Report 2011. UNAIDS. Published by UNAIDS and the World Health Organization. [on-line], 2011. [capturado em 7 de julho de 2012]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.

Yu H, Jetzt AE, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. The nature of human immunodeficiency virus type 1 strand transfers. *J Biol Chem* 1998; 273(43):28384-28391.

Yu X, Yuan X, Matsuda Z, Lee TH, Essex M. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* 1992; 66(8):4966-4971.

Zhang M, Foley B, Schultz A, Macke J *et al*. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 2010, 7:25