

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

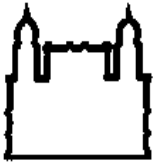
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**TESE DE DOUTORADO**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) – EPIDEMIOLOGIA  
MOLECULAR NO ESTADO DA BAHIA**

**JOANA PAIXÃO MONTEIRO**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**



FIOCRUZ

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

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

**JOANA PAIXÃO MONTEIRO**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA  
HUMANA (HIV) - EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR NO ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada ao Centro de Pesquisas Gonçalo  
Moniz como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Biotecnologia e Medicina Investigativa

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara

Salvador - Bahia – Brasil  
2009

*Este trabalho é dedicado aos milhões de pessoas infectadas pelo HIV no mundo, e à todas aquelas que abraçaram a causa de combate à doença.*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Izabel Maria, por ser a minha melhor amiga e o meu porto seguro.

Ao meu pai, José Maurício, por todo incentivo e amor.

Ao Victor, pelo mais importante apoio durante esta trabalho, pelo companheirismo e pelos momentos de alegria.

Ao Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara pelo apoio e incentivo constantes, pela orientação deste trabalho e pelo exemplo profissional

Ao Dr. Bernardo Galvão, por todos os ensinamentos e pelas oportunidades oferecidas durante os sete anos de trabalho no Laboratório Avançado de Saúde Pública.

Ao Dr. Mario Stevenson pela forma tão acolhedora e carinhosa como me recebeu na Universidade de Medicina do Massachusetts (UMASS), pela amizade e pelo exemplo de dedicação à pesquisa do HIV.

Aos colegas Geraldo Ferraro e Marco Mello, pela contribuição fundamental no desenvolvimento do projeto “Vigilância do Polimorfismo do HIV-1 em Salvador e Avaliação da Prevalência em População de Anônimos não vinculados”.

Ao Antônio Marcos Oliveira pelo auxílio com a técnica de HMA.

À Daniela Prates e à Diana Queiroz pela ajuda com a coleta das informações nos prontuários médicos.

Ao Dr. Carlos Brites, médico responsável pelos pacientes do Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

Ao colega Adriano Fernando da Silva Araújo pelo seqüenciamento dos isolados virais de Feira de Santana.

Ao mestrando da EBMSP Edson de Souza Santos, de cujo projeto veio as amostras dos pacientes de Feira de Santana.

À Dra. Maria Fernanda Rios Grassi pela orientação na primeira fase do doutorado

À Elizabeth Vasconcelos, Eugênia Góes, Cláudio Paulo e Rodrigo Gaspar pela solicitude.

À Taise Coutinho e à todos da Coordenação de Ensino pela solicitude e presteza.

**“Reduzir o estigma e a discriminação é ainda  
uma das principais medidas para uma resposta  
eficaz e eficiente à epidemia de AIDS”**

*Ministério da Saúde*

## RESUMO

O grupo M do HIV-1 envolve a maioria das infecções mundiais e é composto por nove subtipos, denominados de A-K. Esta intensa variabilidade genética reflete-se no surgimento partículas virais com diferentes comportamentos biológicos. Estes representam os principais obstáculos para a eficiência da resposta imune humana e para o desenvolvimento de vacinas e terapias universais. O estudo molecular e biológico do HIV pode contribuir para o melhor entendimento de suas propriedades, para a escolha adequada de estratégias terapêuticas e para a vigilância da epidemia de HIV/AIDS. O objetivo deste trabalho foi investigar o perfil epidemiológico e molecular do HIV-1 no estado da Bahia. Para tanto, foram estudadas amostras de DNA provenientes de 261 indivíduos infectados pelo HIV, acompanhados em um hospital de Salvador, a capital do estado. Destas, 228 e 208 amostras foram analisadas através de HMA nos genes *gag* e *env*, respectivamente, e 175 foram caracterizadas em ambos os genes. Adicionalmente, 32 amostras de subtipos F e recombinantes BF foram seqüenciadas e analisadas através de métodos filogenéticos. Uma proporção significativa de resultados divergentes entre o HMA e as análises filogenéticas foi observada (84.4%). Os resultados combinados mostraram sete diferentes genótipos de HIV-1: 147 (84%) B/B, 4 (2.3%) F/F, 3 (1.7%) B/F, 1 (0.6%) F/B, 1 (0.6%) F/D, 1 (0.6%) BF/F e 18 (10.3%) BF/B. As seqüências recombinantes BF não foram relacionadas à Forma Recombinante Circulante (CRF) CRF12, enquanto apenas duas foram relacionadas à CRF28 e à CRF29. 19 variantes BF compartilharam o mesmo ponto de recombinação em *gag*. Em adição, 7 recombinantes BF circulantes na região de Feira de Santana apresentando padrão similar de recombinação, mostraram-se filogeneticamente relacionados aos recombinantes encontrados em Salvador. Em conclusão, o subtipo B é o genótipo predominante, entretanto, a prevalência (13.1%) de variantes BF divergentes entre si e uma possível nova CRF sugerem que recombinação genética está ocorrendo freqüentemente nesta região do país. O uso da técnica de HMA não é apropriado em regiões onde diferentes subtipos estão co-circulando e onde a presença de vírus recombinantes é esperada. A epidemia de HIV/AIDS local caracteriza-se por um crescente número de casos entre mulheres e associada a transmissão por via heterossexual. Em particular, a epidemia de subtipo F na Bahia está relacionada aos indivíduos do sexo feminino e à via de transmissão heterossexual. A presença de um vírus recombinante F/D foi reportado pela primeira vez no Brasil.

Palavras-Chave: HIV-1. Subtipos. Epidemiologia. Bahia.

## ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) is characterized by high levels of genetic variability. The majority of the HIV-1 infections worldwide is caused by group M strains, which have been classified into 9 different genetic subtypes (A-K). As a result of this great genetic variability, the virus is also characterized by a diversity of phenotypes, which represents a major obstacle to the immune system function and to the long-term efficiency of antiretroviral therapy. Therefore, studies involving molecular and biological aspects of HIV-1 can contribute to the understanding of its properties, the development of therapeutic and control strategies, and the monitoring of the HIV/AIDS epidemic. The aim of this study is to investigate the epidemiological and genetic variability of HIV-1 in the Brazilian state of Bahia. DNA samples from 229 and 213 HIV-1-infected individuals followed at a hospital in Salvador, the capital of Bahia, were analyzed using the Heteroduplex Mobility Assay (HMA) in *gag* and *env* genes, respectively. Out of these, 175 samples were characterized in both genes. Thirty-two subtype F and BF recombinant viruses were sequenced and analyzed by phylogenetic methods. The combined data showed that seven different HIV-1 genotypes comprised this sample: 147 (84%) B/B, 4 (2.3%) F/F, 3 (1.7%) B/F, 1 (0.6%) F/B, 1 (0.6%) F/D, 1 (0.6%) BF/F, and 18 (10.3%) BF/B. A significant divergence was observed between the HMA and the sequencing results (84.4%). This could be explained by the low accuracy of the HMA for detecting recombinant viruses. These variants were unrelated to CRF12, while two sequences were related to CRF28 and CRF29. Nineteen BF mosaics shared the same *gag* breakpoint. In addition, 7 BF recombinants from the city Feira de Santana presenting the same recombination pattern were related to the variants found in Salvador in the phylogenetic analysis. In conclusion, subtype B is the most common genotype, however, an increasing prevalence (13.1%) of different BF variants and a potentially new CRF suggest that recombination is occurring frequently in Bahia. The use of HMA may be inappropriate in regions where different subtypes are co-circulating. The local HIV/AIDS epidemic follows the national epidemiological trends being mainly associated with heterosexual transmission and with an increasing number of cases among women. The subtype F epidemic was associated with women infected heterosexually. Finally, this study identified the presence of an F/D recombinant HIV-1 in Brazil.

Keywords: HIV-1. Subtypes. Epidemiology. Bahia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.5.1:</b> Desenho esquemático da estrutura morfológica do HIV-1. ....	8
<b>Figura 1.5.2:</b> Representação esquemática do genoma do HIV-1 e do HIV-2. ....	8
<b>Figura 1.5.3:</b> Representação esquemática da gp120 do HIV-1. ....	10
<b>Figura 1.7.1:</b> História natural da infecção pelo HIV-1. ....	14
<b>Figura 1.8.1:</b> Representação esquemática de genomas recombinantes de HIV-1. ....	17
<b>Figura 1.9.1:</b> História evolutiva dos lentivírus de primatas. ....	22
<b>Figura 1.10.1:</b> Distribuição mundial das principais formas genéticas de HIV-1. ....	25
<b>Figura 1.10.2:</b> Prevalência dos subtipos e formas recombinantes de HIV-1 no mundo. ....	26
<b>Figura 1.11.1:</b> Distribuição das principais formas genéticas de HIV-1 no Brasil. ....	28
<b>Figura 3.4.1:</b> Esquema dos fragmentos dos genes <i>gag</i> e <i>env</i> amplificados na PCR. ....	39
<b>Figura 3.4.2:</b> Foto do gel de acrilamida do HMA <sub>gag</sub> . ....	39
<b>Figura 4.2.1.1:</b> Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando as relações filogenéticas dos diferentes padrões de recombinação entre os subtipos B e F dentro das seqüências de <i>gag</i> . ..	59
<b>Figura 4.2.1.2:</b> As seqüências do gene <i>gag</i> de isolados de Feira de Santana. ....	60
<b>Figura 4.2.1.3:</b> Isolados recombinantes BF circulantes na população do estado da Bahia. ...	62
<b>Figura 4.2.2.1:</b> Distribuição dos 261 indivíduos estudados de acordo com o sexo.....	63
<b>Figura 4.2.2.2:</b> Distribuição dos indivíduos estudados de acordo a categoria de exposição de risco. ....	64
<b>Figura 4.2.2.3:</b> Prevalência das categorias de exposição de risco nos sexos feminino e masculino separadamente.....	65
<b>Figura 4.2.2.4:</b> Prevalência dos sexos feminino e masculino nas diferentes exposições de risco separadamente.....	66
<b>Figura 4.2.2.5:</b> Distribuição dos indivíduos estudados de acordo a faixa etária. ....	67
<b>Figura 4.2.2.6:</b> Prevalência das faixas etárias nos sexos feminino e masculino. ....	68
<b>Figura 4.2.2.7:</b> Prevalência dos sexos feminino e masculino nas diferentes faixas etárias. ...	69



<b>Figura 4.2.2.8:</b> Distribuição dos indivíduos estudados de acordo a cor/raça. ....	70
<b>Figura 4.2.3.1:</b> Estratificação dos indivíduos de acordo com genótipo de HIV e sexo. ....	71
<b>Figura 4.2.3.2:</b> Prevalência dos genótipos B e F do HIV-1 nas populações feminina e masculina separadamente. ....	72
<b>Figura 4.2.3.3:</b> Estratificação dos indivíduos de acordo com genótipo de HIV e exposição de risco. ....	73
<b>Figura 4.2.3.4:</b> Prevalência dos genótipos B e F do HIV-1 nas diferentes categorias de exposição de risco. ....	73
<b>Figura 4.2.3.5:</b> Estratificação dos indivíduos de acordo com genótipo de HIV e faixa etária. ....	74
<b>Figura 4.2.3.6:</b> Prevalência dos genótipos B e F do HIV-1 nas diferentes faixas etárias. ....	75
<b>Figura A.1:</b> Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando as relações filogenéticas das seqüências de <i>gag</i> (a) e <i>env</i> (b) das amostras da Bahia com seqüências de referência dos subtipos do grupo M. ....	105
<b>Figura A.2:</b> Isolados recombinantes BF circulantes no estado da Bahia. ....	109
<b>Figura A.3:</b> Relações filogenéticas das seqüências <i>gag</i> (a) e <i>env</i> (b) de recombinantes BF da Bahia comparadas com seqüências de vírus dos subtipos B, F e recombinantes BF circulantes em outras regiões geográficas. ....	111
<b>Figura A.4:</b> Árvore NJ com base nos fragmentos concatenados de <i>gag</i> e <i>env</i> mostrando as relações filogenéticas dos recombinantes BF circulantes no Brasil com outros subtipos e cepas recombinantes. ....	112
<b>Figura B.1:</b> Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando as relações filogenéticas das seqüências de <i>pol</i> das amostras de Feira de Santana com seqüências de referência dos subtipos do grupo M. ....	113
<b>Figura B.2:</b> As seqüências do gene <i>pol</i> de isolados de Feira de Santana. ....	114

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.8.1:</b> Resumo das Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) atualmente conhecidas .....	19
<b>Tabela A.1</b> (Tabela 2 do artigo - ampliada): Dados clínicos e epidemiológicos das amostras de indivíduos infectados com o subtipo F do HIV-1. ....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APOBEC3G	Enzima (“apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like”) indutora da deaminação das citidinas em uridinas
AZT	Azidotimidina
B”	subtipo B brasileiro
C1	Primeira região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C2	Segunda região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C3	Terceira região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C4	Quarta região constante da gp120 do envelope do HIV-1
C5	Quinta região constante da gp120 do envelope do HIV-1
CA	proteína do capsídeo
CCR2b	Receptor para $\beta$ quimiocinas
CCR3	Receptor para $\beta$ quimiocinas
CCR5	Receptor para $\beta$ quimiocinas
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CD8	Grupamento de diferenciação 8
cDNA	DNA complementar
CDST/HIV/AIDS	Centro de Referência em Doenças Sexualmente Transmissíveis e HIV/AIDS
CN/DST/AIDS/MS	Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Ministério da Saúde
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
cpx	“complex”
cpz	Chimpanzé
CRF	Forma recombinante circulante
CTL	Linfócitos T citotóxicos
CXCR4	Receptor para $\alpha$ quimiocinas
ddNTP	Dideoxynucleosídeos-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dr	Doutor
dNTP	Deoxynucleosídeo-trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético

ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<i>env</i>	Gene do envelope do HIV
F81	Felsenstein 81
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
G	Glicina
(G)	Distribuição gama
<i>gag</i>	Gene do grupo antígeno do HIV
gp120	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 120 kD
gp160	Glicoproteína precursora do envelope do HIV-1 com massa molecular de 160 kD
gp41	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 41 kD
GTR	“General Time-Reversible”
H <sub>2</sub> O	Água
HAART	“Highly Active Anti-Retroviral Therapy”
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HMA	Ensaio de Mobilidade de Heteroduplexes
HLA	<i>Antígeno Leucocitário Humano (“Human Leukocyte Antigen”)</i>
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
(I)	Proporção de sítios invariáveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IN	Integrase
kb	Kilobase
kd	kilodalton
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus
LTR	Longas regiões terminais repetidas
M	Molar
MA	Proteína da matriz viral
M:F	Razão do sexo masculino:feminino
min	Minuto
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$

MIP-1 $\beta$	Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ l	Microlitro
ml	Mililitro
ML	Maximum Likelihood
mM	Milimolar
NC	proteína do nucleocapsídeo
Nef	Negative Factor
NIH	“National Institute of Health
NJ	Neighbor-Joining
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	“Odds Ratio”
P	Prolina
p11	Proteína Protease do HIV
p17	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 17 kd
p24	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 24 kd
p31	Proteína Integrase do HIV
p6	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 6 kd
p66/51	Proteína transcriptase reversa do HIV
p7	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 7 kd
pb	Pares de base
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol
PR	Protease
<i>pol</i>	Gene da polimerase do HIV
R	Arginina
RANTES	Regulated upon activation normal T-expressed and secreted
Rev	Anti-repression transactivator protein

RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-Derived Factor -1 $\alpha$
seg	Segundo
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SM	“sooty mangabey”
SU	Glicoproteína da superfície do envelope viral
TAE	Tampão acetato EDTA
Taq	Enzima DNA polimerase extraída do termófilo <i>Thermus aquaticus</i>
Tat	Trans-acting transcription transactivator
TBE	Tampão borato EDTA
T CD4+	Linfócitos T expressando o receptor CD4
T CD8+	Linfócitos T expressando o receptor CD8
TM	Glicoproteína transmembranar do envelope viral
TR	Transcriptase reversa
TRis-HCl	tris(hidroximetil)aminometano- hidrocloreto
TrN	Tamura-Nei
TVM	“Transversion model”
U	Unidades Internacionais
UDEV	Usuário de drogas endovenosas
URF	Forma recombinante única
UV	Ultra-violeta
V1	Primeira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V2	Segunda região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V3	Terceira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V4	Quarta região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V5	Quinta região variável da gp120 do envelope do HIV-1
Vif	Virion Infectivity Factor
Vpr	Viral Protein R
Vpu	Viral Protein U
Vpx	Viral Protein X
W	Triptofano
$\chi^2$	Qui quadrado

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.....Epidemiologia da AIDS no mundo e no Brasil</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.....Epidemiologia da AIDS na Região Nordeste do Brasil</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3.....Epidemiologia da AIDS no estado da Bahia</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 O Vírus da Imunodeficiência Humana.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5.....Estrutura e Genoma do HIV</b> .....	<b>7</b>
<b>1.6.....Ciclo de Infecção/Replicação</b> .....	<b>11</b>
<b>1.7.....Aspectos Clínicos e Imunológicos da Infecção pelo HIV</b> .....	<b>12</b>
<b>1.8.....Classificação</b> .....	<b>15</b>
<b>1.9.....Origem do HIV</b> .....	<b>20</b>
<b>1.10 Epidemiologia Molecular do HIV-1 no mundo.....</b>	<b>22</b>
<b>1.11 Epidemiologia Molecular do HIV-1 no Brasil.....</b>	<b>26</b>
<b>1.12 Variabilidade Fenotípica do HIV-1.....</b>	<b>28</b>
<b>1.13 Racional / Justificativa.....</b>	<b>29</b>
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>

<b>2.1 Gerais</b> .....	31
<b>2.2 Específicos</b> .....	31
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1 Amostras Clínicas</b> .....	33
3.1.1 <i>Critérios de Inclusão</i> .....	33
3.1.2 <i>Banco de Dados</i> .....	34
3.1.3 <i>Coleta do sangue</i> .....	34
<b>3.2 Amostras Adicionais</b> .....	35
<b>3.3 Extração de DNA genômico</b> .....	35
<b>3.4 Identificação dos subtipos de HIV-1 pela técnica de HMA (Ensaio de Mobilidade de Heteroduplexes) dos genes <i>gag</i> e <i>env</i></b> .....	36
3.4.1 <i>HMA gag</i> .....	36
3.4.1 <i>HMA env</i> .....	37
<b>3.5 Identificação de possíveis amostras recombinantes</b> .....	40
<b>3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para seqüenciamento do DNA</b> .....	40
<b>3.7 Purificação e Seqüenciamento</b> .....	41
<b>3.8 Reconstruções Filogenéticas</b> .....	42
3.8.1 <i>Determinação do subtipo das amostras</i> .....	42
3.8.2 <i>Análise de recombinação</i> .....	43
3.8.3 <i>Análise das relações intra-subtipos</i> .....	43
3.8.4 <i>Determinação da diversidade genética</i> .....	44
3.8.5 <i>Análise das seqüências de aminoácidos</i> .....	44
3.8.6 <i>Análise comparativa dos diferentes padrões de recombinação entre isolados de HIV-1 dos subtipos B e F</i> .....	45
<b>3.9 Análises Estatísticas</b> .....	45



<b>4 – RESULTADOS</b> .....	46
<b>4.1 Artigo publicado</b> .....	47
<b>4.2 Análises complementares</b> .....	57
<i>4.2.1 Relações filogenéticas entre isolados de HIV-1 recombinantes BF provenientes de duas distintas populações do estado da Bahia: Salvador e Feira de Santana.</i> .....	57
<i>4.2.2 Perfil epidemiológico dos pacientes</i> .....	63
<i>4.2.3 Associações entre os subtipos de HIV-1 e variáveis epidemiológicas</i> .....	71
<b>5 – DISCUSSÃO</b> .....	76
<b>6 – CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84
APÊNDICE A .....	104
APÊNDICE B .....	113
ANEXO A .....	115
ANEXO B .....	116
ANEXO C .....	117
ANEXO D .....	118

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

Monteiro, Joana Paixão  
M772a Análise da variabilidade genética do vírus da imunodeficiência humana (HIV)-  
Epidemiologia molecular no estado da Bahia / Joana Paixão Monteiro. - 2009.  
118 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Medicina Investigativa) – Universidade Federal  
da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. 2009.

Orientador: Prof. Luiz Carlos Junior Alcântara.

1. HIV. 2. Subtipos. 3.Epidemiologia. 4.Bahia I.Título.

CDU 616.98-08:614.4(813.8)

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia da AIDS no mundo e no Brasil

A síndrome da imunodeficiência adquirida (“Acquired Immune Deficiency Syndrome” - AIDS) representa um problema de saúde pública de dimensões sem precedentes para a espécie humana. Desde que os primeiros casos de AIDS foram diagnosticados no início dos anos 80, a disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocorreu rapidamente por todas as regiões do mundo, como consequência do crescente movimento de globalização e da expansão do turismo. Estima-se que cerca de 60 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV no mundo e destas, mais de 25 milhões foram a óbito (UNAIDS, 2008). De acordo com os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 33,2 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus, incluindo dois milhões de crianças com menos de 15 anos. Desse total, aproximadamente 95% vive em países em desenvolvimento, sobretudo na África subsaariana, onde 6% da população está contaminada, somando cerca de 67% de todas as infecções e 72% das mortes por AIDS no mundo. Apesar dos inúmeros esforços e recursos investidos por entidades e cientistas de todo o mundo, até o momento não existe nenhuma vacina eficaz e nem medicamentos que levem à cura da doença. Ao contrário, embora a prevalência global de pessoas vivendo com o HIV tenha se estabilizado desde o ano 2000, o número total de pessoas infectadas tem aumentado como resultado do contínuo número de novas infecções a cada ano e dos efeitos benéficos da terapia anti-retroviral a qual se tornou mais amplamente disponível. Só no ano de 2007, cerca de 2,7 milhões de novas infecções pelo HIV foram estimadas no mundo. Neste mesmo ano, mais de dois milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS (UNAIDS, 2008). Estes fatos fazem desta síndrome uma das mais destrutivas epidemias na história da humanidade.

A AIDS foi primeiramente relatada em 1981 nos Estados Unidos e esteve associada a indivíduos adultos do sexo masculino os quais apresentavam alguns aspectos em comum, como sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, comprometimento do sistema imune e comportamento homossexual, o que levou à conclusão de que se tratava

de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível. Logo após a identificação da AIDS, as pesquisas se voltaram para a identificação do agente etiológico desta síndrome. Em 1983, o HIV foi isolado pela primeira vez por um grupo de pesquisadores liderados por Luc Montaignier do Instituto Pasteur de Paris, França, sendo então denominado LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983). Um ano depois, a equipe do pesquisador norte americano Robert Gallo também identificou o vírus (GALLO et al., 1984). A partir de então, os esforços foram direcionados para o desenvolvimento de testes de diagnóstico laboratorial, vacinas e medicamentos para combater a doença. Em 1987 surgiu a primeira droga terapêutica contra o HIV, conhecida como zidovudina (azidotimidina - AZT), um análogo nucleosídico, o qual age inibindo a atividade da enzima transcriptase reversa e, portanto, impedindo a replicação do vírus (EZZELL, 1987). Apesar de ter se mostrado eficaz inicialmente, reações adversas e a resistência a esta droga foram complicações importantes. Anos depois, surgiram novas substâncias que impediam a atividade de outra enzima, como os inibidores da protease que impedem a maturação de novas partículas virais. Estas substâncias, associadas ao AZT (terapia dupla), aumentaram discretamente a sobrevivência das pessoas afetadas (RICHMAN, 2001). Em 1996, surgiu uma nova proposta terapêutica, conhecida como “Coquetel Anti-Aids” ou terapia anti-retroviral de alta potência (“Highly Active Anti-Retroviral Therapy” - HAART), baseada na combinação de três agentes inibidores. O “coquetel” se mostrou eficaz na redução da mortalidade e na indução da supressão da carga viral. Atualmente, o desenvolvimento de novas drogas é constante e existem pelo menos 20 drogas que compõem o arsenal contra o HIV, entretanto, nenhuma delas isoladamente ou em combinação é capaz de eliminar completamente o vírus.

O comportamento homossexual foi o principal fator de risco para a infecção pelo HIV nos primeiros anos da epidemia de AIDS nos países desenvolvidos. Secundariamente, o uso de drogas injetáveis passou a exercer um papel importante na transmissão do vírus, particularmente em regiões como a Ásia e leste da Europa. Outra via que passou a contribuir para a disseminação do HIV nesse período foi a transmissão através de transfusão sanguínea, que diminuiu drasticamente na maioria dos países desenvolvidos com a implantação de testes sorológicos nos bancos de sangue (GAYLE; KOPLAN, 2001). Nos últimos anos, um grande aumento do número de casos por exposição heterossexual vem sendo observado. Este fato se reflete no número de 15,4 milhões de mulheres vivendo com HIV no mundo (UNAIDS, 2008).

No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2008, já foram notificados cerca de 506 mil casos da doença e cerca de 205 mil óbitos devido à AIDS. As regiões mais afetadas pela doença são as Regiões Sudeste e Sul que juntas somam cerca de 79% do total de casos. Do total de casos registrados, a maior parte envolveu indivíduos com idade entre 15 a 49 anos, com predomínio de indivíduos do sexo masculino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Entretanto, nos últimos anos, observaram-se mudanças na dinâmica de transmissão do HIV, com algumas tendências notáveis. Após uma primeira fase de maior incidência de casos de AIDS entre adultos homossexuais masculinos, seguida por aumento entre usuários de drogas injetáveis, tem havido, assim como na epidemia mundial de AIDS, um aumento significativo de casos associados à transmissão heterossexual (heterossexualização). Esse fato se refletiu no incremento marcante de casos entre mulheres (feminização), com conseqüente aumento do número de casos de transmissão vertical, os quais, entretanto, diminuíram nos últimos anos, graças aos programas de controle implantados pelo Ministério da Saúde. Associado a isso está o crescimento da epidemia entre indivíduos de baixo poder aquisitivo (pauperização), a crescente incidência no interior do país (interiorização) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998) e entre indivíduos com mais de 50 anos (envelhecimento) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O Brasil foi um dos primeiros países a adotar políticas de saúde significativas para a melhoria da assistência aos indivíduos infectados pelo HIV. Estas incluem, entre outras iniciativas, um programa de distribuição universal e gratuita dos medicamentos anti-retrovirais na rede pública de saúde. Esta medida do Ministério da Saúde representou um marco importante na epidemia de AIDS do país, possibilitando uma melhoria na qualidade de vida dos indivíduos infectados pelo HIV, com a redução da morbidade e mortalidade e o conseqüente aumento da sobrevida dessas pessoas. No entanto, segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde de 2008, a taxa de incidência de AIDS no país mantém-se, ainda, em patamares elevados (19 casos por 100 mil habitantes, em 2006), basicamente devido à persistência da tendência de crescimento entre as mulheres. Ainda, apesar de estabilizada, a mortalidade por AIDS no país permanece alta (cerca de 11 mil óbitos anuais desde 1997), observando-se também, o crescimento entre as mulheres e entre indivíduos categorizados como de raça/cor “Preta” e “Parda”, expondo a iniquidade no acesso aos serviços de saúde para diagnóstico e tratamento das populações menos favorecidas socioeconomicamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Estes fatores refletem a necessidade de medidas de prevenção e assistência aos portadores do vírus voltadas para estes

focos de infecção, além de estudos que contribuam para o desenvolvimento de vacinas e terapias eficazes e mais acessíveis, para a contenção da epidemia no Brasil.

## **1.2 Epidemiologia da AIDS na Região Nordeste do Brasil**

A região Nordeste é a terceira região em extensão territorial e a segunda do país em população, abrigando cerca de 52 milhões de habitantes, o que corresponde à quase 30% da população brasileira. No entanto, é a região do Brasil que apresenta o maior nível de pobreza, apresentando os piores indicadores sócio-econômicos (IBGE, 2007). A Bahia é o estado mais povoado da região, seguida pelos estados de Pernambuco e Ceará. Levando em consideração o total de casos notificados de AIDS na região, estes são também os três estados mais afetados. De acordo com os números do Ministério da Saúde (2008), foram notificados entre 1980 e junho de 2008, 58.348 casos de HIV/AIDS no Nordeste. A taxa de incidência de AIDS na região como um todo no ano de 2005 foi de 10,8 casos por 100 mil habitantes e taxa de mortalidade de 3,5 óbitos por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O alto índice de pobreza da região Nordeste reflete-se na vulnerabilidade local à disseminação do HIV. Além disto, o Nordeste brasileiro é a região que possui a maior costa litorânea e o maior número de capitais, levando a uma grande concentração de turistas nacionais e estrangeiros. Assim, além da pobreza, outro importante fator que favorece a disseminação do vírus, é o turismo sexual, no qual as vítimas geralmente são crianças e adolescentes carentes.

## **1.3 Epidemiologia da AIDS no estado da Bahia**

A Bahia é o quinto estado do Brasil em extensão territorial, sendo o quarto estado mais populoso abrigando cerca de 14 milhões de habitantes distribuídos nos seus 417 municípios, atrás apenas dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (IBGE,

2007). A Bahia é o estado do Nordeste mais rico e com maior exploração do turismo. Quando se considera o total de casos de AIDS notificados no estado, a Bahia ocupa o oitavo lugar no quadro nacional e o segundo da região nordeste. O primeiro caso de AIDS identificado na Bahia ocorreu em 1984, e de acordo com dados do Ministério da Saúde (2008) foram notificados até junho de 2008, 14.198 casos. O estado apresentou em 2008 uma taxa de incidência de 9,2 casos por 100.000 habitantes, a segunda menor da região, maior apenas do que a do estado do Rio Grande do Norte na qual este número foi de 9,0 e uma taxa de mortalidade de 3,3 óbitos por 100.000 habitantes, menor apenas do que as dos estados de Pernambuco e Maranhão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A capital da Bahia, Salvador, teve uma população estimada no ano de 2006 em cerca de 2.892,625 habitantes e é a terceira mais populosa cidade do Brasil (IBGE, 2007). Através de um estudo pioneiro realizado por Dourado e colaboradores (2007), a prevalência de HIV na população geral de Salvador foi estimada em 0,55%, sendo 0,8% entre homens e 0,36% entre mulheres.

Na Bahia, embora a transmissão sexual seja a principal via de disseminação do vírus, o uso de drogas injetáveis, principalmente na capital, tem ajudado a contribuir para o aumento do número de casos de HIV/AIDS. Em 1991, do total de casos notificados, 25,5% estava associado a usuários de drogas injetáveis, entretanto devido às medidas preventivas adotadas pela secretaria estadual de saúde, no ano 2000 esse número foi reduzido para 12,1% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Semelhante ao observado em outras regiões do país, a epidemia de AIDS no estado vem sofrendo uma tendência a “feminização” e a “pauperização” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Assim como as outras grandes capitais nacionais, Salvador sofre de problemas sociais como consequência do crescimento acelerado e da falta de planejamento urbano: a maioria da população é pobre e o acesso aos programas de escolarização e saúde de qualidade é precário. A cidade é um importante destino turístico e assim como acontece com outras capitais nordestinas, há um intenso fluxo de turismo sexual. Desta forma, estas características provavelmente contribuem para o aumento do número de casos e da complexidade da epidemia de HIV/AIDS.

## 1.4 O Vírus da Imunodeficiência Humana

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

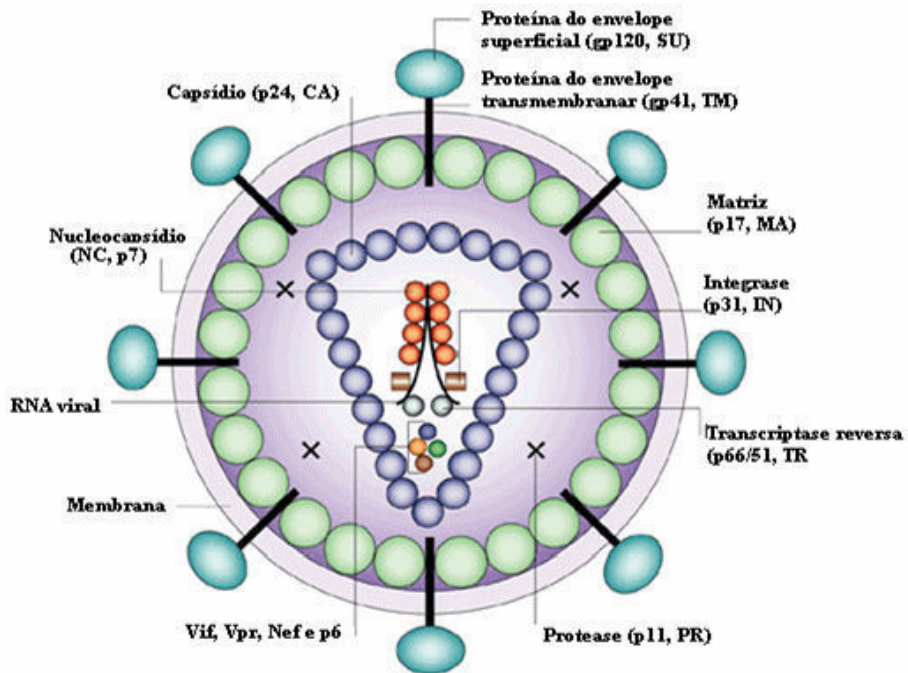
As células utilizadas pelo HIV para a infecção e replicação são aquelas que apresentam o receptor de membrana CD4 (linfócitos T CD4<sup>+</sup>, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langherans e microgliais), o qual faz parte do processo de interação do vírus com a célula hospedeira (COHEN et al., 1999). Além da ligação ao receptor CD4, durante o processo de penetração na célula hospedeira, o HIV liga-se a um dos receptores de quimiocinas que são denominados correceptores. Os correceptores mais utilizados pelo HIV-1 são o CCR5 e o CXCR4 (CORMIER et al., 2000; DRAGIC et al., 2000), expressos tanto em células T, como em macrófagos. O CCR5 é um receptor natural para  $\beta$  – quimiocinas como RANTES, MIP - 1 $\alpha$  e MIP - 1 $\beta$  (COCCHI et al., 1995), enquanto o CXCR4 é receptor para  $\alpha$  – quimiocinas como o SDF - 1 $\alpha$  (BLEUL et al., 1996; OBERLIN et al., 1996). Embora com menor freqüência, os receptores CCR2b (DORANZ, 1996), CCR3 (CHOE et al., 1996), STRL33/BONZO/TYMSTR (DENG et al., 1997; LIAO et al., 1997),



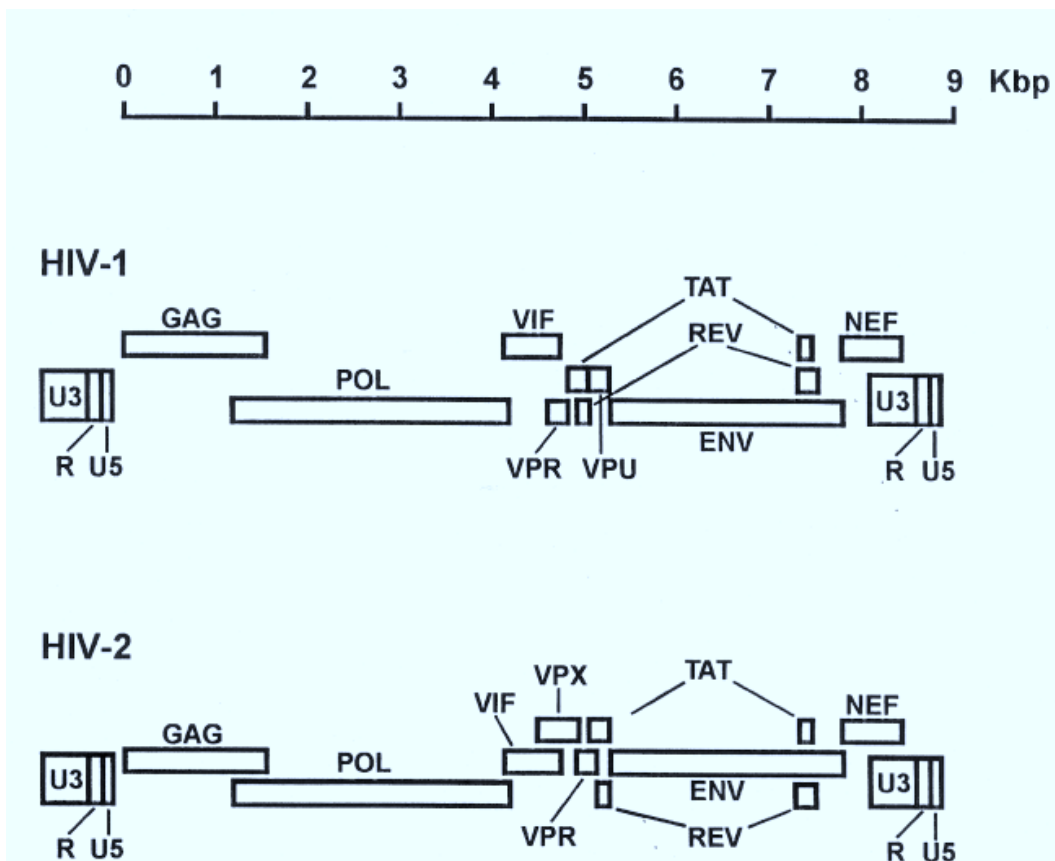
BOB/GPR15 (MARX; CHEN, 1998) e Apj (CHOE et al., 1998) também podem ser utilizados como mediadores da infecção pelo HIV.

### 1.5 Estrutura e Genoma do HIV

O HIV é uma partícula constituída de uma camada lipídica ou envelope que envolve o nucleocapsídeo (Figura 1.5.1) onde estão abrigadas as duas fitas simples de RNA. Sua estrutura viral possui formato icosaédrico medindo cerca de 110 nm de diâmetro, e apresenta estruturas protuberantes na camada exterior – são as glicoproteínas do envelope. O genoma de RNA possui cerca de 9,5 Kb de comprimento e é ocupado em grande parte pelos três genes estruturais: *gag* (grupo antígeno), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), que são delimitados por duas regiões contendo seqüências repetitivas, denominadas longas regiões terminais repetidas (LTR – long terminal repeat region), onde estão as principais seqüências promotoras para a transcrição dos genes virais. Há ainda, seis outros genes acessórios e regulatórios no genoma, sendo os cinco: *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef* comuns ao HIV-1 e HIV-2 e, *vpu* e *vpx* para o HIV-1 e HIV-2, respectivamente (ZEICHNER, 1994) (Figura 1.5.2).



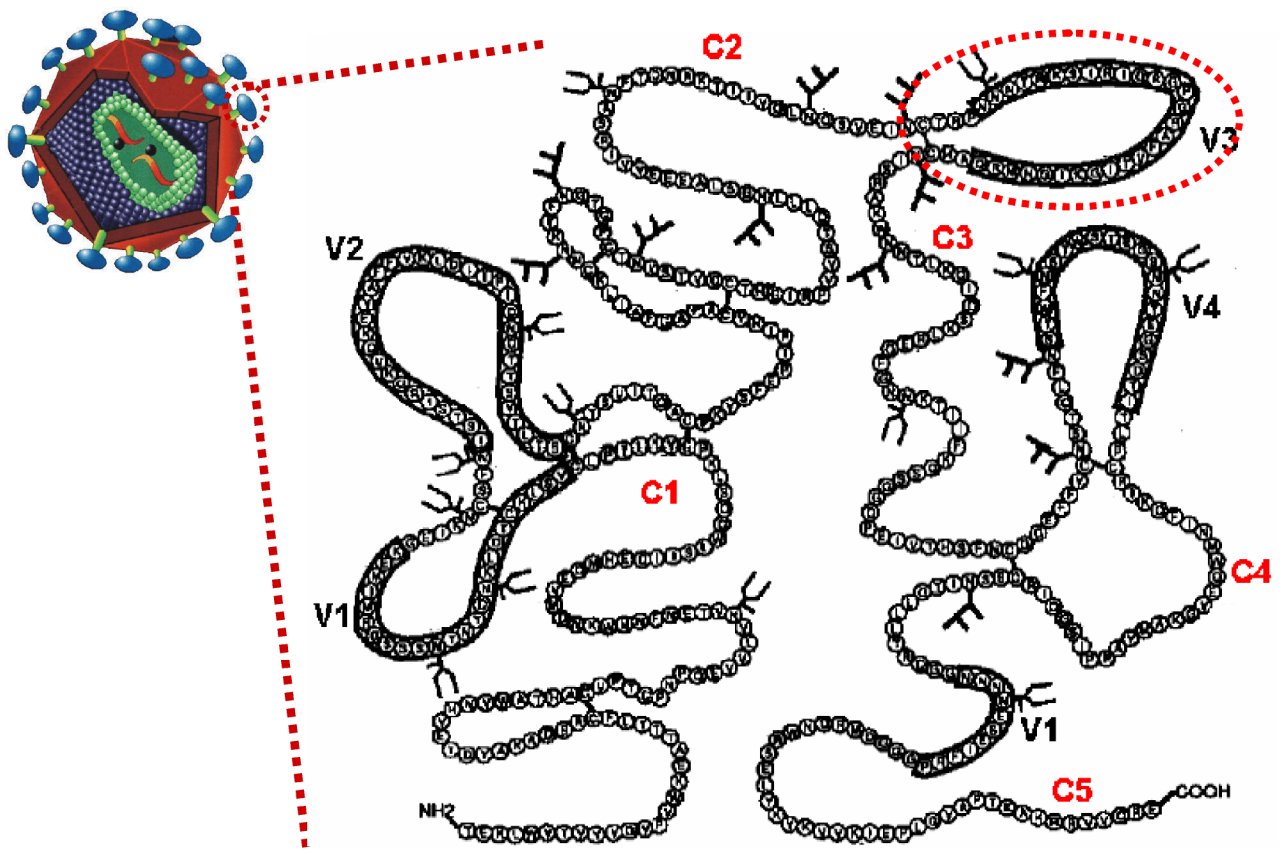
**Figura 1.5.1:** Desenho esquemático da estrutura morfológica do HIV-1. Adaptado de [http://www.nature.com/nri/journal/v2/n4/slideshow/nri776\\_F1.html](http://www.nature.com/nri/journal/v2/n4/slideshow/nri776_F1.html).



**Figura 1.5.2:** Representação esquemática do genoma do HIV-1 e do HIV-2.

O envelope viral de natureza lipoprotéica é derivado da membrana celular do hospedeiro e formado por duas glicoproteínas extensivamente glicosiladas: gp120 e gp41 (CHAN; KIM, 1998). A estrutura da gp120 apresenta cinco regiões variáveis (V1-V5) intercaladas por cinco regiões conservadas (C1-C5) (STARCICH et al., 1986) (Figura 1.5.3). Uma das regiões variáveis, designada V3, é formada por uma alça composta de 35 aminoácidos e unida por pontes dissulfeto. Essa região é imunodominante e contra ela são produzidos anticorpos neutralizantes (GOUDSMIT et al., 1988). Na superfície do vírus, as proteínas do envelope estão estruturadas em complexos triméricos que promovem a ligação e fusão à membrana celular (CHAN; KIM, 1998). A localização da gp120 é totalmente exterior e a gp41 tem localização transmembranar. Ambas são produzidas a partir da clivagem de uma glicoproteína precursora, a gp160, codificada pelo gene *env*. Abaixo da bicamada lipídica está a proteína da matriz p17 (MA) que é codificada pelo gene *gag*. Além da p17, são codificadas também por *gag*, as proteínas: p24 (CA) que envolve o cerne ou capsídeo viral, p7 (NC) e p6 que se localizam no nucleocapsídeo. O gene *pol* codifica as enzimas envolvidas no processo de replicação e integração do genoma viral: protease (p11), transcriptase reversa (p66/p51) e integrase (p31). As proteínas dos genes *gag* e *pol* são traduzidas como precursores que devem ser clivados pela protease nas subunidades distintas (ZEICHNER, 1994). As longas regiões terminais repetidas (LTR) não codificam proteínas, mas são essenciais para a regulação da expressão viral. Fatores transcricionais do hospedeiro e outros codificados pelo vírus ligam-se a regiões específicas da LTR e promovem a expressão dos genes do HIV (GREENE; PETERLIN, 2002). As regiões LTR contêm regiões com sinais para poliadenilação (KAO et al., 1987), TATA Box, seqüências promotoras e sítios de ligação para dois fatores transcricionais: NFκ-B e SP1 (KARN, 1999). A proteína Tat ("transacting transcription transactivator") é uma transativadora da transcrição do genoma viral e é essencial para a replicação do HIV (PUGLISI et al., 1992). Vpr medeia o processo de transporte do complexo de pré-integração viral para o núcleo da célula hospedeira (COHEN et al., 1996) e Rev está relacionada com o processo de exportação de transcritos não processados do núcleo para o citoplasma (HOPE, 1997). A proteína Nef parece estar relacionada com a redução da expressão de CD4 (AIKEN et al., 1994) e das moléculas HLA de classe I e II (COLLINS et al., 1998) na superfície das células infectadas, o que pode representar um mecanismo de escape importante do vírus à ação das células T citotóxicas e para evitar o reconhecimento pelas células T CD4<sup>+</sup>. A Nef pode também interferir com a ativação das células T por ligação a várias proteínas que estão envolvidas nas vias intracelulares de transdução de sinal (PETER, 1998). A proteína Vpu relaciona-se com a etapa de produção e brotamento das partículas

virais e com a regulação negativa de moléculas CD4 pelas células infectadas (KLIMKAIT et al., 1990; SCHUBERT et al., 1996). A Vif é importante para os mecanismos intracelulares de transporte dos componentes virais, além de se ligar ao inibidor antiviral APOBEC3G, o qual pertence a uma família de enzimas intracelulares que desaminam especificamente a citosina em uracila no RNAm ou no DNA, resultando numa acumulação de mutações G-para-A que levam à degradação do DNA viral. Ao formar um complexo com a APOBEC3G, a Vif bloqueia a atividade inibitória da APOBEC3G (MARIANI et al., 2003).



**Figura 1.5.3:** Representação esquemática da gp120 do HIV-1 mostrando as cinco regiões conservadas (C1-C5) e as cinco regiões variáveis (V1-V5). No detalhe a região V3 imunodominante. As pontes dissulfeto são mostradas como traços entre aminoácidos e as cadeias laterais dos N-oligossacarídeos são mostradas como estruturas ramificadas. Adaptado de Leonard et al. (1990).

## 1.6 Ciclo de Infecção/Replicação

Como todos os vírus, o HIV se reproduz utilizando a maquinaria genética da célula hospedeira. O início do ciclo de infecção do HIV ocorre através da ligação da partícula viral, através da proteína gp120, com o receptor CD4 na superfície da célula-alvo (GREENE; PETERLIN, 2002; UGOLINI et al., 1999). Esta reação leva à mudanças conformacionais e à subsequente participação de uma das moléculas da família dos receptores de quimiocinas (CCR5 e CXCR4 principalmente) no processo. A formação do resultante complexo ternário (UGOLINI et al., 1999) (gp120/CD4/receptor de quimiocina) resulta em uma segunda mudança na conformação das proteínas do envelope viral, levando à exposição da gp41, que se ancora na membrana plasmática da célula através de um de seus sítios hidrofóbicos (GREENE; PETERLIN, 2002; UGOLINI et al., 1999). Ocorre então a fusão entre o envelope viral e a membrana celular permitindo a entrada do capsídeo na célula (DOMS; PEIPER, 1997; GREENE; PETERLIN, 2002). A eficiência de entrada do vírus na célula, devida provavelmente à avidéz de ligação às moléculas de CD4 e do correceptor, parece estar diretamente relacionada com o “fitness” da partícula viral (MAROZSAN et al., 2005). Variações na eficiência de entrada são provavelmente conseqüências da grande variabilidade no gene do envelope que por sua vez está relacionada com as fortes pressões seletivas do ambiente hospedeiro (RICHMAN et al., 2003; WEI et al., 2003). Após a fusão, o capsídeo é então desencapado levando à liberação do seu conteúdo, o RNA genômico e enzimas virais, no citoplasma da célula. Em seguida, a enzima transcriptase reversa promove a síntese de uma molécula de DNA de fita dupla a partir do RNA viral. Esta recém-sintetizada molécula de DNA, juntamente com a enzima integrase, forma um complexo de pré-integração viral, o qual é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira. Através da atividade da integrase, ocorre a integração estável do cDNA viral no DNA cromossômico da célula, estabelecendo um provírus (KATZ; SKALKA, 1994). O provírus tem uma tendência de manter-se no estado latente nos cromossomos da célula infectada sem produzir vírus até ser ativado por um determinado evento mitogênico; esta capacidade de latência complica enormemente as tentativas de tratamento da infecção com drogas antivirais. Quando a célula é ativada, através do uso da maquinaria biossintetizadora da célula e da regulação adicional pelas proteínas virais (FRANKEL; YOUNG, 1998), o provírus é repetidamente transcrito. O conjunto de RNAs transcritos é então transportado para o citoplasma, onde será traduzido em

suas proteínas. As proteínas virais são clivadas pela ação das proteases, migrando em seguida para os sítios de maturação, nas imediações da membrana plasmática, de onde brotam as novas partículas virais.

## **1.7 Aspectos Clínicos e Imunológicos da Infecção pelo HIV**

A infecção pelo HIV ocorre através do contato de um indivíduo não-infectado com o sangue, sêmen ou outros fluidos corporais de um indivíduo infectado. Aproximadamente de três a seis semanas após esse período, inicia-se a fase de infecção primária (Figura 1.7.1), caracterizada por altos índices de replicação viral (acima de  $10^7$  cópias de RNA/ml de plasma) e conseqüente disseminação do vírus para os linfonodos e no sangue periférico. Como conseqüência, ocorre uma diminuição do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (PANTALEO; FAUCI, 1996). Estudos mostram que esta depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ocorre de forma mais acentuada na mucosa do trato gastrointestinal do que no sangue periférico durante a infecção primária pelo HIV-1 (GUADALUPE et al., 2003; MEHANDRU et al., 2004). De fato, a mucosa gastrointestinal abriga a maioria dos linfócitos T presentes no organismo, enquanto o sangue periférico contém apenas entre 2% e 5% dos linfócitos totais (SMIT-MCBRIDE et al., 1998). Além disso, comparando-se com os linfócitos circulantes, uma maior percentagem dos linfócitos CD4<sup>+</sup> presentes na mucosa expressam o receptor de quimiocina CCR5 o qual é utilizado preferencialmente durante a fase inicial da infecção (CONNOR et al., 1997). Assim, o trato gastrointestinal tem sido descrito como um reservatório viral persistente (KOTLER et al., 1991; NANNINI et al., 2002) e como tendo um papel importante na patogênese do HIV-1, uma vez que é fortemente sugerido que os eventos virológicos e imunológicos durante a infecção aguda e inicial pelo HIV-1 têm um papel crucial na determinação da velocidade da progressão para doença (LEFRERE et al., 1998; MELLORS et al., 1996). Durante a fase de infecção primária, cerca de 50% a 70% dos indivíduos infectados desenvolvem uma síndrome clínica com sintomas que se assemelham aos de uma gripe e têm duração de uma ou mais semanas (COHEN et al., 1997). Em resposta à infecção, ocorre um aumento significativo de células TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico (FAUCI, 1993), provavelmente, o principal responsável pelo controle da viremia (BORROW et al.,

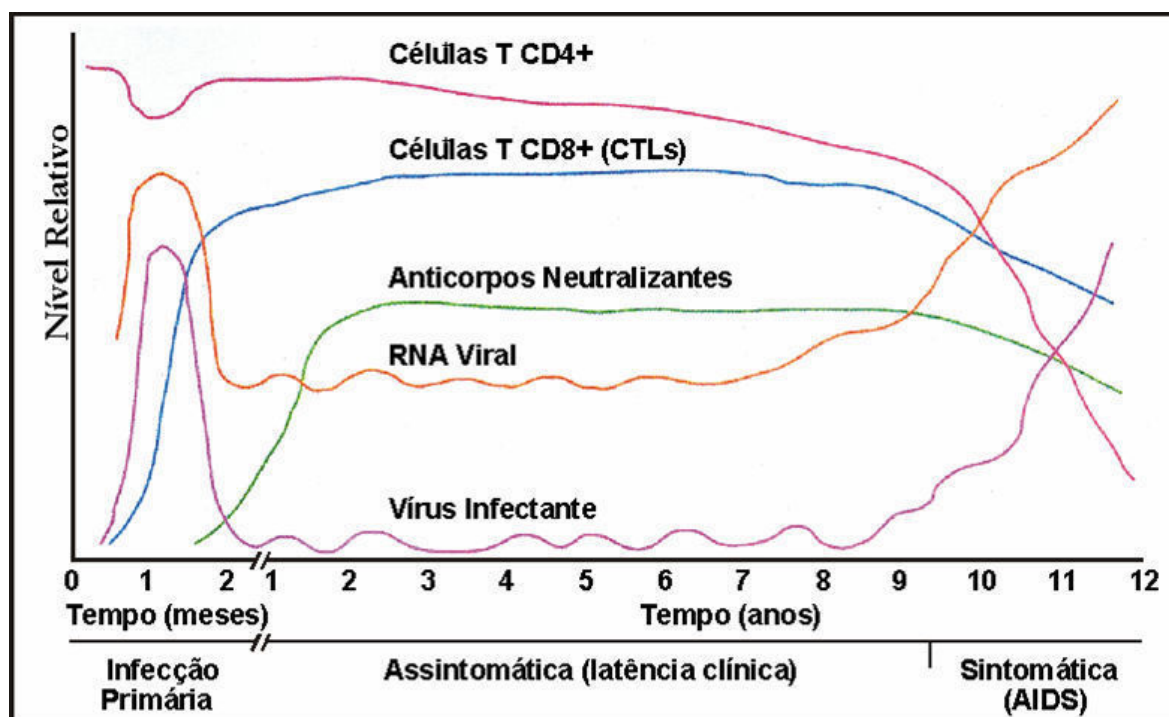
1994; PANTALEO et al., 1994). Estas células, através da atividade citotóxica HIV - específica eliminam células infectadas, e através da produção de fatores solúveis contribuem para a supressão da replicação viral (MACKEWICZ et al., 1991). Neste período, os testes para detecção de anticorpos normalmente não conseguem diagnosticar a infecção, pois, embora os títulos virais estejam altos, os níveis de anticorpos durante a fase aguda ainda são inexpressivos (FAUCI, 1993) (Figura 1.7.1). O controle da viremia resulta então na resolução da síndrome aguda viral. Entretanto, é nesta fase que se formam os focos de células infectadas latentes que representam um dos potenciais mecanismos de escape da resposta imune e de medicamentos, além da persistência da infecção. Assim, embora ocorra uma dramática queda da viremia, a replicação viral não é totalmente controlada (PANTALEO; FAUCI, 1996).

Após o período da infecção primária, inicia-se uma fase conhecida como latência clínica, quando todos os parâmetros virológicos se mantêm em níveis baixos ou indetectáveis, como consequência da resposta imune específica. Conseqüentemente, ocorre uma recuperação do número de linfócitos TCD4+ que se mantém estável ou sofre um declínio gradual (COHEN et al., 1997); nesta fase, a maioria dos indivíduos infectados se mantém assintomática. Tanto a resposta celular como a resposta humoral HIV - específicas são detectadas em níveis elevados durante o período de latência clínica (Figura 1.7.1), entretanto, os níveis de replicação viral, embora baixos, não são totalmente controlados (PANTALEO; FAUCI, 1996). Os mecanismos responsáveis pela habilidade do vírus de escapar dessas respostas ainda não são bem entendidos. Um fator que parece contribuir é a propensão do HIV em gerar seqüências variantes que podem não ser reconhecidas pelo sistema imune (COFFIN, 1995). Existem alguns estudos demonstrando que cepas variantes podem resistir à neutralização por anticorpos ou não ser reconhecidas por linfócitos T citotóxicos induzidos por outra cepa viral (ARENDRUP et al., 1992; BONGERTZ et al., 1997; BORROW et al., 1997).

Após um período que varia de três a dez anos, como consequência do efeito citopático direto do vírus sobre as células infectadas e de mecanismos imunológicos que causam a destruição destas células, como a apoptose e a citotoxicidade, ocorre uma perda considerável de células TCD4+, atingindo níveis inferiores a 200 células/ $\mu$ l, e a destruição da maioria do tecido linfóide no indivíduo infectado pelo HIV (COHEN et al., 1999). A resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) HIV - específica é geralmente perdida e anticorpos neutralizantes são raramente detectados. Concomitantemente, ocorre um novo aumento da replicação viral culminando com o surgimento dos sintomas da AIDS. Portanto, esta síndrome

se caracteriza por uma imunossupressão acentuada, tornando o indivíduo infectado suscetível a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (COFFIN et al., 1995; KAHN et al., 1998).

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



**Figura 1.7.1:** História natural da infecção pelo HIV-1. Adaptado de Pognard et al. (1996).



## 1.8 Classificação

O HIV é classificado em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é formado por oito subtipos genéticos, ordenados de “A” a “H”. Entre estes, os subtipos A e B encontram-se circulantes na população humana enquanto que os subtipos C-H representam apenas um pequeno número de infecções (CHEN et al., 1997; DAMOND et al., 2004; HOLMES et al., 2001; YAMAGUCHI et al., 2000). O HIV-2 apresenta distribuição mais restrita ao Oeste da África, sendo prevalente também em países como Índia (ALAEUS et al., 2000; KANDATHIL et al., 2005) e Portugal (SORIANO et al., 2000). Parece ser menos patogênico (ALAEUS et al., 2000) e menos transmissível do que o HIV-1 (KANKI et al., 1994; MARLINK et al., 1994), estando associado com um período assintomático mais longo (MARLINK et al., 1994). Sua disseminação permanece estabilizada ou em fase decrescente (VAN DER LOEFF; AABY, 1999). Em contraste, é observada a disseminação do HIV-1 por todas as regiões do mundo.

O HIV-1 apresenta um alto grau de diversidade de seqüências genéticas e tem sido classificado em três grupos distintos denominados M, N e O. O grupo M (major) envolve a maioria das infecções em todo o mundo e é composto por nove subtipos filogeneticamente distintos, denominados A, B, C, D, F, G, H, J e K, dos quais as seqüências dos genes do envelope diferem entre si em cerca de 24% (ROBERTSON et al., 1999a). O grupo O (outlier) diverge do grupo M em cerca de 50% das seqüências de aminoácidos do gene *env* (SUBBARAO; SCHOCHETMAN, 1996) e é prevalente na República dos Camarões, Gabão e Guiné Equatorial, na África (GÜRTLER, 1996). O grupo N (non-M/non-O) apresenta a menor dispersão, tendo sido documentado em poucos indivíduos da República dos Camarões (SIMON et al., 1998) e relacionado com o vírus da imunodeficiência símia deste país (CORBET et al., 2000).

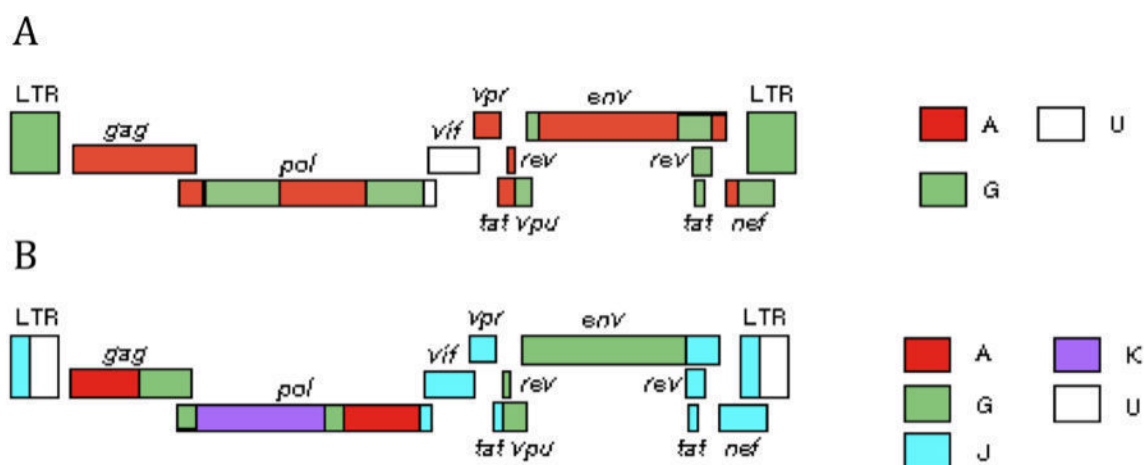
A co-circulação de múltiplas variantes de HIV numa mesma região geográfica favorece episódios de co-infecção, os quais, por sua vez, podem levar à emergência de cepas virais recombinantes, que podem ser viáveis e transmissíveis (ALAEUS et al., 2000). No HIV-1, a recombinação foi detectada pela primeira vez em 1989 (CALVEL et al., 1989), mas a sua importância na evolução do HIV-1 e na epidemia de AIDS só começou a ser apreciada dez anos mais tarde (ROBERTSON et al., 1999b). A frequência de recombinação no HIV-1 é

de  $2.4 \times 10^{-4}$  por nucleotídeo e por ciclo de replicação, o equivalente a 2-3 eventos de recombinação por genoma e por ciclo de replicação, e ocorre ao longo de todo o genoma (JETZ et al., 2000). Isto significa que a recombinação é um mecanismo mais importante para a geração de diversidade no HIV-1 do que as mutações pontuais. A recombinação no HIV pode também representar um mecanismo importante de aquisição de genes, como terá sido, por exemplo, na aquisição do gene *vpx* pelo SIVsm e HIV-2 (SHARP et al., 1996), e de reparação genômica no HIV-1 quando ocorrem mutações ou alterações tão drásticas numa das cadeias de RNA viral que tornem o vírus incapaz de se replicar (CALVEL et al., 1989).

Esta capacidade de recombinação das fitas RNA durante a síntese proviral tem sido demonstrada entre diferentes genomas de HIV do mesmo subtipo ou de subtipos distintos infectando uma célula simultaneamente (SUBBARAO; SCHOCHETMAN, 1996). A recombinação no HIV-1, tal como com em todos os retrovírus, é um processo que ocorre em duas fases. A primeira fase inicia-se quando dois vírus infectam a mesma célula. Se ambos forem idênticos em termos genéticos, por exemplo, do mesmo subtipo, a descendência originada será também idêntica. Se cada um dos vírus possuir genomas de RNA distintos, por exemplo, vírus de subtipos ou grupos diferentes, será produzida descendência de três tipos. Dois tipos serão homozigotos, tendo duas cadeias de RNA idênticas provenientes dos dois vírus parentais. O terceiro tipo de vírion será heterozigoto, tendo duas cadeias diferentes de RNA, uma proveniente de cada vírus parental. A segunda fase inicia-se quando uma célula é infectada por vírions heterozigotos. Durante a retrotranscrição, a TR vai saltar de cadeia de RNA para a outra, produzindo um DNA proviral que é um mosaico constituído por genes e fragmentos de cada um dos vírus parentais. A descendência viral será necessariamente recombinante. (WONG et al., 1973, WYKE et al., 1975, HU; TEMIN, 1990, KATZ; SKALKA, 1990).

Um vírus recombinante que é identificado em um único indivíduo ou em um pequeno grupo de pessoas com relações epidemiológicas é denominado URF (“*Unique Recombinant Form*”) Entretanto, quando os vírus recombinantes são transmitidos entre diferentes hospedeiros e originam novas infecções, são designados de formas recombinantes circulantes (“*Circulating Recombinant Forms*” - CRFs). Para a classificação de uma CRF é necessária a sua identificação em pelo menos três indivíduos não relacionados epidemiologicamente através do seqüenciamento de pelo menos 3 genomas completos ou pelo menos 2 genomas completos e um terceiro genoma parcial apresentando relações filogenéticas próximas aos dois genomas completos. A designação de uma CRF é feita a

partir de um número de identificação e a partir das letras dos subtipos que lhe deram origem (por exemplo, CRF02\_AG), contudo se três ou mais subtipos estão presentes, as letras são substituídas por cpx (*complex*) (Figura 1.8.1) (ROBERTSON et al., 2000). Inicialmente, não era esperado que eventos de recombinação entre os diferentes grupos de HIV-1 fossem possíveis devido ao alto grau de divergência genética entre eles, no entanto, casos de recombinação envolvendo os grupos M e O foram descritos em indivíduos da República do Camarões (PEETERS et al., 1999). Contrariamente, embora casos de dupla infecção com HIV-1 e HIV-2 sejam frequentemente descritos em regiões onde ambos os tipos co-circulam, ainda não foi identificado eventos de recombinação entre eles. Neste caso, especula-se que o alto nível de divergência genética entre os tipos de HIV seja uma barreira para o surgimento de variantes viáveis, contudo essa possibilidade não pode ser totalmente descartada (KANKI et al., 1997; PEETERS et al., 2000).



**Figura 1.8.1:** Representação esquemática de genomas recombinantes de HIV-1. Em A, a representação do genoma da CRF02\_AG e em B a representação do genoma da CRF06\_cpx. Adaptado de <http://www.hiv.lanl.gov>

Essa propriedade de recombinação do HIV representa mais um mecanismo que resulta no aumento de sua variabilidade genética. Desta maneira, é provável que vírus recombinantes apresentem algumas vantagens sobre cepas parenterais no que diz respeito a eventuais modificações no tropismo e na eficiência de replicação (“*fitness*”). Vários estudos indicam que sob pressões seletivas impostas por drogas anti-retrovirais, a recombinação entre

cepas com diferentes níveis de sensibilidade pode ocorrer, resultando em uma variante ainda mais resistente (MOUTOUH et al, 1996).

Até o presente já foram descritas 43 CRFs (Tabela 1.8.1) (<http://hiv-web.lanl.gov>) e este número tende a ser crescente na medida em que novas formas recombinantes vêm sendo identificadas a cada ano, uma vez que a distribuição geográfica dos subtipos é um processo dinâmico e imprevisível, o que torna os eventos de recombinação entre as variantes de HIV-1 muitas vezes inevitáveis (PEETERS et al., 2000).

Tabela 1.8.1: Resumo das Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) atualmente conhecidas

<b>Nome</b>	<b>Cepa de referência</b>	<b>Subtipos</b>	<b>Autor</b>
<a href="#">CRF01_AE</a>	CM240	A, E	J.K. Carr
<a href="#">CRF02_AG</a>	IbNG	A, G	J.K. Carr
<a href="#">CRF03_AB</a>	Kal153	A, B	K. Liitsola
<a href="#">CRF04_cpx</a>	94CY032	A, G, H, K, U	D. Paraskevis
<a href="#">CRF05_DF</a>	VI1310	D, F	T. Laukkanen
<a href="#">CRF06_cpx</a>	BFP90	A, G, J, K	R. B. Oelrichs
<a href="#">CRF07_BC</a>	CN54	B', C	R. Wagner
<a href="#">CRF08_BC</a>	GX-6F	B', C	F.E. McCutchan
<a href="#">CRF09_cpx</a>	96GH2911	A, G, U	F.E. McCutchan
<a href="#">CRF10_CD</a>	TZBF061	C, D	I.N. Koulinska
<a href="#">CRF11_cpx</a>	GR17	A, CRF01, G, J	M. Peeters
<a href="#">CRF12_BF</a>	ARMA159	B, F	J.K. Carr
<a href="#">CRF13_cpx</a>	96CM-1849	A, CRF01, G, J, U	K. Wilbe
<a href="#">CRF14_BG</a>	X397	B, G	R. Najera
<a href="#">CRF15_01B</a>	99TH.MU2079	CRF01, B	F.E. McCutchan
<a href="#">CRF16_A2D</a>	97KR004	A2, D	U. Visawapoka
<a href="#">CRF17_BF</a>	ARMA038	B, F	J.K. Carr
<a href="#">CRF18_cpx</a>	CU76	A1, F, G, H, K, U	M. Thomson
<a href="#">CRF19_cpx</a>	CU7	A1, D, G	M. Thomson
<a href="#">CRF20_BG</a>	Cu103	B, G	M. Thomson
<a href="#">CRF21_A2D</a>	99KE_KER2003	A2, D	F.E. McCutchan
<a href="#">CRF22_01A1</a>	CM001BBY	CRF01, A1	J.K. Carr
<a href="#">CRF23_BG</a>	CB118	B, G	M. Thomson
<a href="#">CRF24_BG</a>	CB378	B, G	M. Thomson
<a href="#">CRF25_cpx</a>	02CM_1918LE	A, G, U	J.K. Carr
<a href="#">CRF26_AU</a>	MBTB047	A, U	M. Peeters
<a href="#">CRF27_cpx</a>	04FR-KZS	A, E, G, H, J, K, U	M. Peeters
<a href="#">CRF28_BF</a>	BREPM12609	B, F	R. Diaz
<a href="#">CRF29_BF</a>	BREPM16704	B, F	R. Diaz
<a href="#">CRF30_0206</a>	NE36	CRF02, CRF06	M. Peeters
<a href="#">CRF31_BC</a>	04BR142	B, C	M. Soares
<a href="#">CRF32_06A1</a>	EE0369	CRF06, A1	M. Adojaan
<a href="#">CRF33_01B</a>	05MYKL007	CRF01, B	K.P. Ng & K.K. Tee
<a href="#">CRF34_01B</a>	OUR2275P	CRF01, B	F.E. McCutchan
<a href="#">CRF35_AD</a>	AF095	A, D	F.E. McCutchan
<a href="#">CRF36_cpx</a>	NYU830	A, G, CRF01, CRF02	R. Powell
<a href="#">CRF37_cpx</a>	NYU926	A, G, CRF01, CRF02, U	R. Powell
<a href="#">CRF38_BF</a>	GDJE	B, F	C. Lopez-Galindez
<a href="#">CRF39_BF</a>	03BRRJ103	B, F	M.G. Morgado
<a href="#">CRF40_BF</a>	05BRRJ055	B, F	M.G. Morgado
<a href="#">CRF41_CD</a>	CO6650V1	C, D	S. Tovanabutra
<a href="#">CRF42_BF</a>	luBF_13_05	B, F1	J-C. Schmit
<a href="#">CRF43_02G</a>	J11223	CRF02, G	C. Brennan

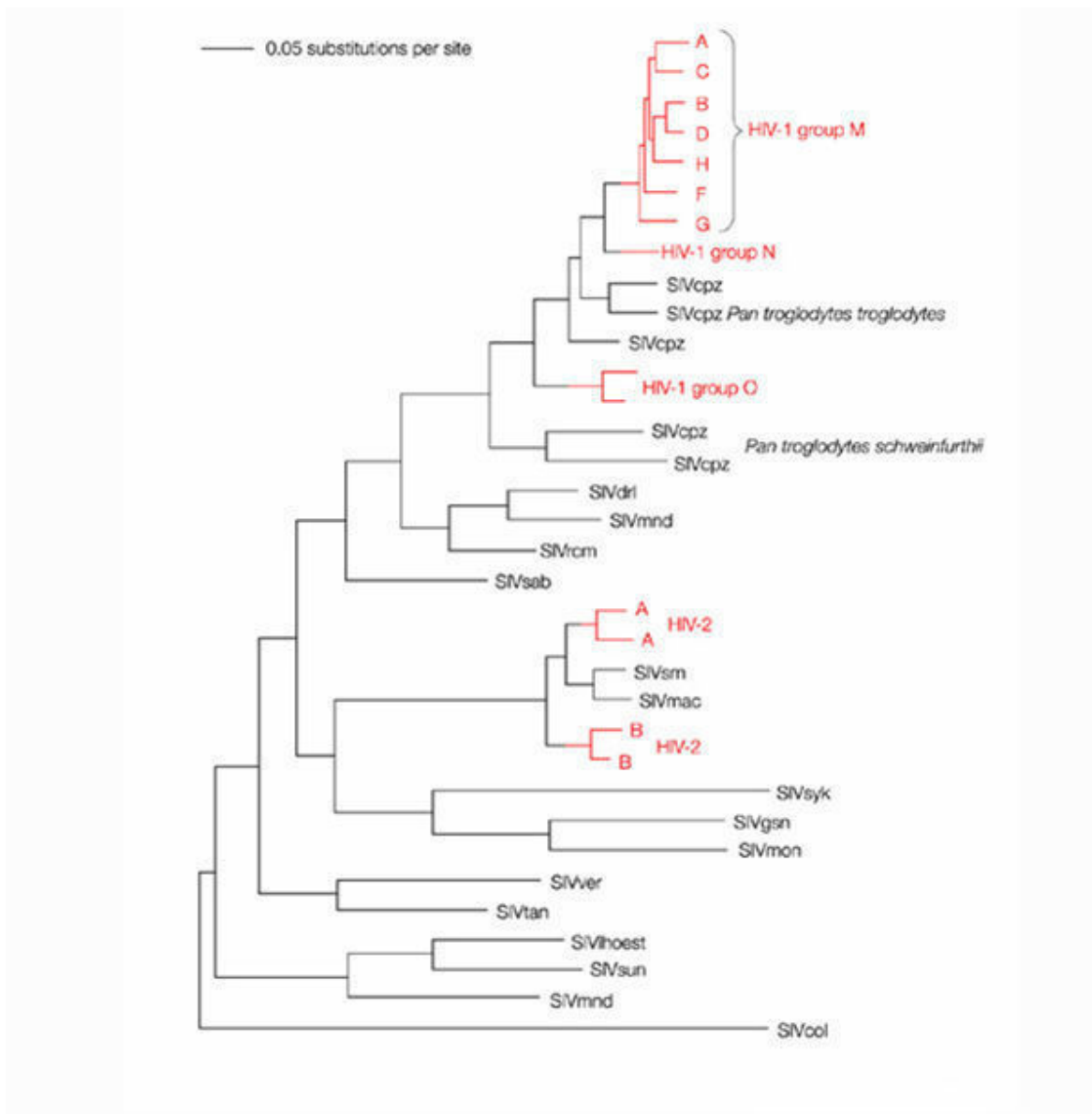
## 1.9 Origem do HIV

A respeito de suas origens, sabe-se que uma grande subfamília de retrovírus relacionada ao HIV está presente em primatas não-humanos, na África sub-sahariana. Todos os membros dessa subfamília de retrovírus possuem estrutura genômica semelhante, apresentando identidade em torno de 50%, além de todos apresentarem a capacidade de infectar linfócitos através do receptor CD4 (HIRSCH et al., 1986). Numerosos retrovírus de primatas não-humanos encontrados na África têm apresentado grande similaridade com HIV-1 e HIV-2. O vírus da imunodeficiência símia (“simian immunodeficiency vírus” - SIV), que infecta uma subespécie de chimpanzés africanos, apresenta uma estrutura genômica em torno de 98% similar ao HIV-1, sugerindo que ambos evoluíram de uma origem comum (HIRSCH et al., 1986; GAO et al., 1999). Muitas espécies de primatas estão infectadas com SIV na selva africana; entretanto, estes lentivírus de primatas não-humanos não são, em geral, patogênicos em seu reservatório natural (GAO et al., 1999). Observações de que contatos entre estes primatas e humanos são comuns na África, uma vez que estes animais são caçados para uso na alimentação ou criados como animais de estimação, somadas ao fato de que os primeiros casos documentados, tanto do HIV-1 em 1959, quanto de HIV-2, em 1986, ocorreram na África (ALAEUS et al., 2000), além da circulação de todos os tipos, grupos e subtipos do vírus neste continente, apontam para uma origem zoonótica do HIV ocorrida no continente africano. Ainda, estudos recentes baseados em distâncias genéticas entre seqüências de DNA sugerem que esta origem ocorreu dentro das primeiras duas décadas do século XX (DE SOUSA, 2009)

A história evolutiva do HIV-1 e HIV-2 tem sido reconstruída em grandes detalhes através da inferência de árvores filogenéticas de lentivírus de primatas. Através destas análises, foi descoberto que os dois vírus humanos são relacionados a diferentes SIVs e, por isso, têm origens evolutivas diferentes (Figura 1.9.1). Especificamente, o HIV-1 é mais estreitamente relacionado ao SIV cpz, que é encontrado em algumas subespécies de chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes* e *Pan troglodytes schweinfurthii*) que habitam partes do Oeste equatorial e África Central respectivamente (GAO et al., 1999). O SIV cpz isolado de *P. t. troglodytes* é de maior interesse, pois é o mais estreitamente relacionado com o

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

Estudos de filogenia molecular também demonstraram que aconteceram muitos eventos independentes de transmissões entre primatas e humanos, uma vez que uma mistura de linhagens do HIV e SIV foi observada (Figura 1.9.1). Embora seja difícil determinar exatamente quantos eventos de transmissão ocorreram, para o HIV-2 por exemplo, estima-se que cada um dos 8 subtipos tenha sido originado a partir de um evento distinto de transmissão entre as espécies (HAHN et al., 2000), enquanto três eventos de transferência do chimpanzé para a espécie humana são estimados para explicar a atual diversidade do HIV-1, tendo os grupos M, N e O origens independentes (GAO et al., 1999). Entretanto, eventos de recombinação interespecífica, os quais devem ser comuns entre os lentivírus de primatas, complicam enormemente esta análise. Por exemplo, o grupo N do HIV-1 parece ser um recombinante entre uma cepa do SIV cpz e um vírus relacionado ao ancestral do grupo M (GAO et al., 1999), mas este evento ocorreu antes do estabelecimento do grupo M e N em humanos (RAMBAUT et al., 2004).



**Figura 1.9.1:** História evolutiva dos lentivírus de primatas. Adaptado a partir de Rambaut et al. (2004).

### 1.10 Epidemiologia Molecular do HIV-1 no mundo

Uma característica relevante do HIV-1 é a forma particular de dispersão dos diferentes subtipos nas diversas regiões geográficas (Figura 1.10.1). Facilitada pela globalização e pelo turismo, a constante circulação geográfica dos grupos, subtipos e CRFs do



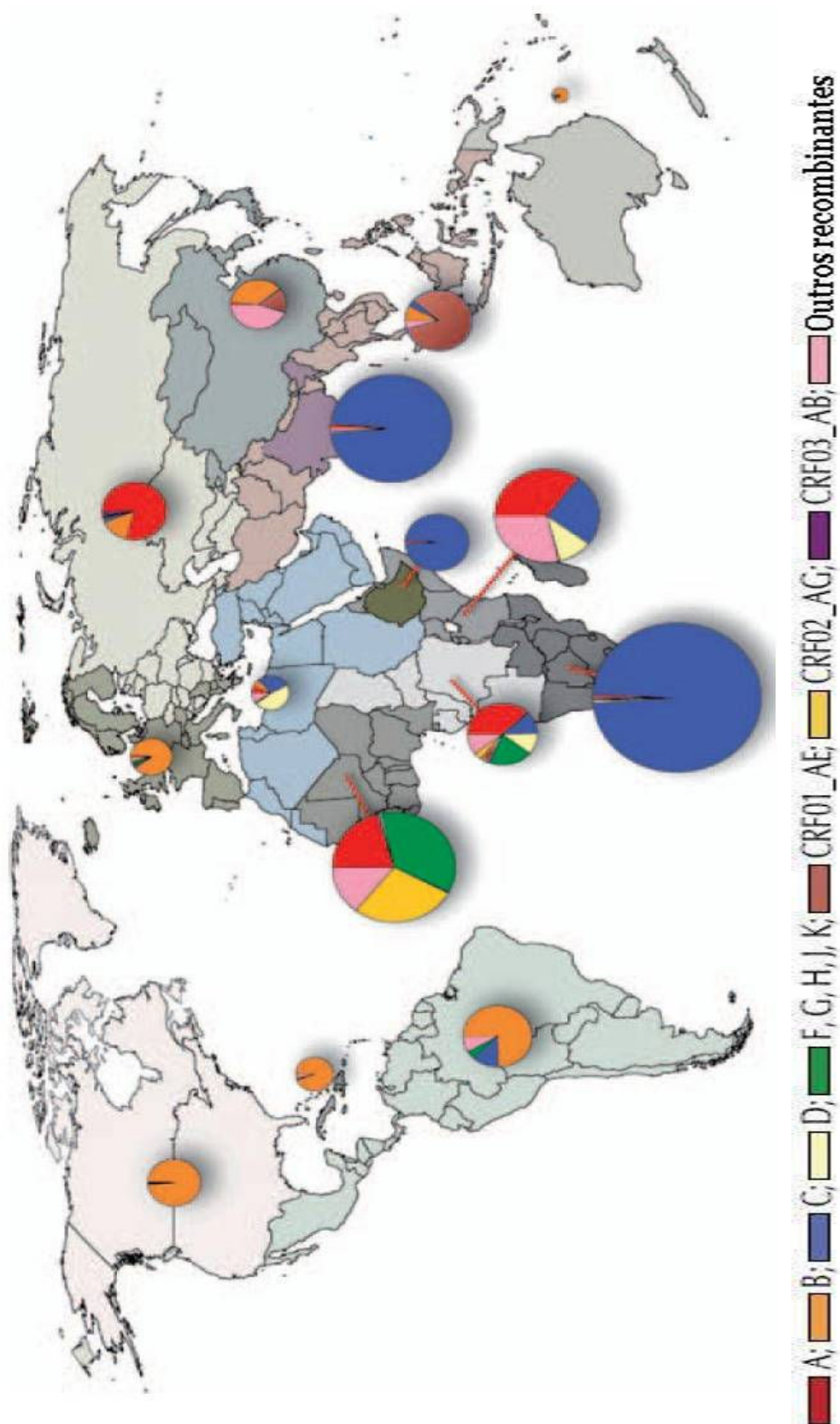
HIV-1 tem permitido que estas variantes sejam empregadas como poderosos marcadores epidemiológicos para acompanhar o curso da pandemia de AIDS. A caracterização das cepas circulantes em cada região geográfica tem se tornado útil aos programas locais de vigilância epidemiológica para o controle e para a elaboração de estratégias preventivas (HEMELAAR et al., 2006; MCCUTCHAN, 2006; PEETERS et al., 2000).

O subtipo B é o mais estudado e isso se deve ao fato deste subtipo predominar nas epidemias da América do Norte, Europa, Austrália e leste Asiático. Na África Central, todos os vírus do grupo M são encontrados, bem como os grupos O e N. No oeste da África predominam o subtipo A e a CRF02\_AG, enquanto que nos países do leste, como Uganda, predominam os subtipos A e D. No sudeste e sul da África, como na África do Sul, Etiópia, Tanzânia, Malawi, Botsuana, Eritreia, Zâmbia, Namíbia e Somália, predomina o subtipo C. A epidemia de AIDS na Índia, assim como em outros países do sudeste da Ásia, é caracterizada pela predominância do subtipo C, mas a CRF AE é também importante, especialmente na Tailândia, juntamente com o subtipo B. Na região central da Ásia e no leste europeu predomina o subtipo A. Na América do Sul, o subtipo B predomina, mas o subtipo F, bem como esporádicos casos de subtipo C, também ocorrem. O subtipo D tem importante participação em diversas epidemias da África, principalmente nas regiões norte, leste e centro-leste. O subtipo F tem sido identificado em diversos países da América do Sul, bem como na Romênia, na República Democrática do Congo, na República do Camarões e em Angola. O subtipo G é encontrado principalmente no oeste e centro da África, enquanto que os subtipos H, J e K são encontrados quase que exclusivamente na África central (revisto por ALAEUS et al., 2000 e por KANDATHIL et al., 2005). Entre as diversas formas genéticas de HIV, o subtipo C do grupo M é atualmente a mais disseminada mundialmente, contribuindo com cerca de 56% de todas as infecções pelo vírus (ESPARZA; BHAMARAPRAVATI, 2000) (Figura 1.10.2).

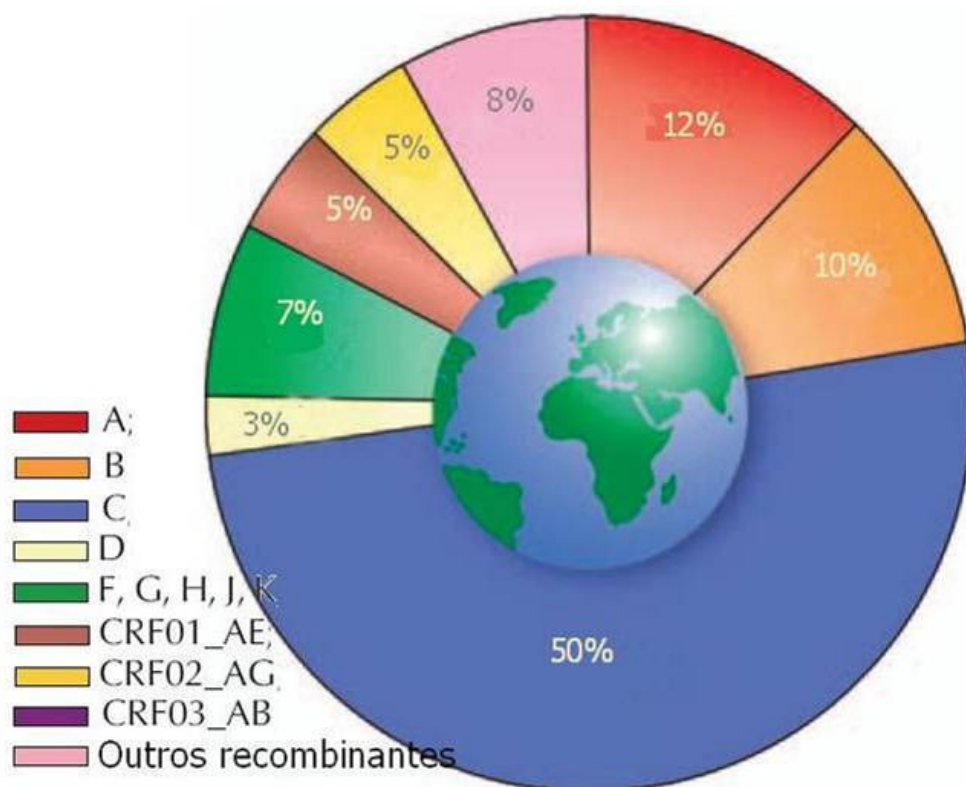
Estima-se que as CRFs são responsáveis por aproximadamente 18% das infecções no mundo (BUONAGURO et al., 2007) (Figura 1.10.2), sendo que entre elas, as duas mais prevalentes são as CRF01\_AE e CRF02\_AG (HEMELAAR et al., 2006). De uma forma geral a prevalência das CRFs tem aumentando no resto do mundo como uma consequência do crescimento global da AIDS, e de fato algumas formas recombinantes vêm adquirindo vantagens epidemiológicas sob cepas parenterais e têm se destacado entre as principais cepas virais circulantes em determinadas localidades, como é o caso da CRF01\_AE no sul e sudeste da Ásia, da CRF02\_AG no oeste da África, bem como da CRF12\_BF na Argentina

(MCCUTCHAN, 2006; HEMELAAR et al., 2006).

Os subtipos do HIV-1 também apresentam dispersão diferenciada entre os diferentes grupos de risco e/ou modos de transmissão. Por exemplo, o subtipo B é predominantemente associado com as epidemias ligadas a usuários de drogas injetáveis e pessoas com comportamento homossexual no mundo Ocidental, enquanto a CRF01\_AE e o subtipo C estão relacionados com a transmissão heterossexual na Tailândia, Índia e África subsaariana (BURKE; MCCUTCHAN, 1996; KUNANUSONT *et al.*, 1995; WENIGER et al., 1994). Uma observação que possivelmente está relacionada com estas características da epidemiologia molecular do HIV-1 é a replicação mais eficiente do subtipo C e da CRF AE em células de Langerhans, importantes na transmissão heterossexual, comparados com o subtipo B (SOTO-RAMIREZ et al., 1996). Entretanto, esta associação não foi confirmada em estudos posteriores (BALL et al., 2003; ARIEN et al., 2005). Uma outra tentativa de associação foi feita em um estudo realizado por Sabino e colaboradores (1994) no qual foi sugerido que o subtipo F estava associado a usuários de drogas injetáveis, uma vez que, nesta amostragem, o subtipo F foi detectado em 6% dos casos totais enquanto que entre usuários de drogas endovenosas este subtipo foi detectado em 33% dos casos. No entanto, um estudo subsequente (MORGADO et al., 1998a) não encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa entre subtipos B e F e categorias de exposição, sexo ou modo de transmissão ao estudar 131 amostras do Rio de Janeiro. Apesar de todas estas observações, deve se ter em mente que a disseminação global dos subtipos de HIV-1 é um processo dinâmico, e associações entre modos de transmissão e subtipos são provavelmente devido a eventos históricos, como migrações, fatores sociais, comportamentais e econômicos associados provavelmente a fatores biológicos do hospedeiro e virais.



**Figura 1.10.1:** Distribuição mundial das principais formas genéticas de HIV-1. Adaptado a partir de Hemelaar et al. (2006) – revisado em abril de 2009.



**Figura 1.10.2:** Prevalência dos subtipos e formas recombinantes de HIV-1 no mundo. Adaptado a partir de Hemelaar e cols., 2006. ) – revisado em abril de 2009.

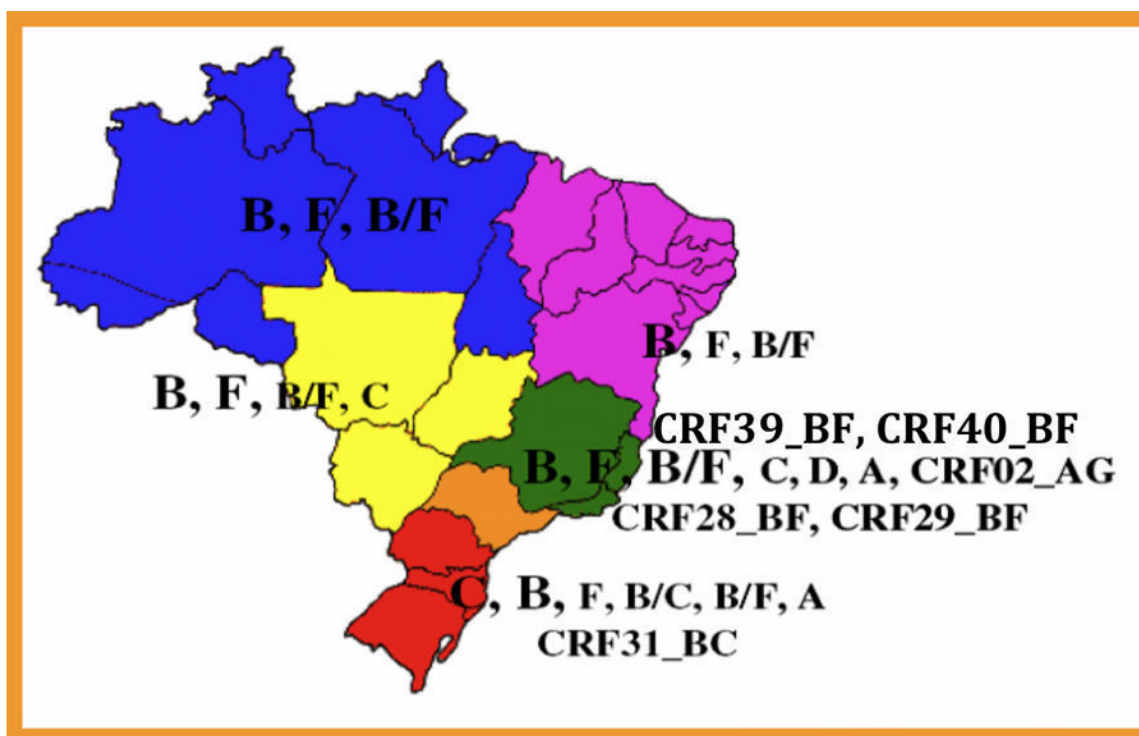
### 1.11 Epidemiologia Molecular do HIV-1 no Brasil

No Brasil, estudos da epidemiologia molecular do HIV-1 ao longo destes 28 anos de epidemia mostram a predominância do subtipo B, entretanto, a detecção de novas cepas virais como o subtipo F (MORGADO et al., 1994), o subtipo C (WHO, 1994), o subtipo D (MORGADO et al., 1998b), o subtipo A (CARIDE et al., 2001), e diversas formas recombinantes B/F, B/C, B/D, C/D (GAO et al., 1996; GUIMARÃES et al., 2001; SABINO et al., 1994; STEFANI et al., 2007) tem sido reportada cada vez mais frequentemente. Além destes genótipos, trabalhos de caracterização genotípica de isolados do subtipo B no Brasil descrevem uma variação na alça V3 do gene *env*, caracterizada por uma substituição do aminoácido prolina por triptofano (GPGR→GWGR), discriminando uma variante chamada de B” (B brasileiro) (MORGADO et al., 1996). Dos vírus do subtipo B circulantes na região Sudeste, aproximadamente 40% foram descritos como correspondentes a variante B”

(COVAS et al., 1998; MORGADO et al., 1998a,b).

Devido à grande extensão do território brasileiro, têm sido identificadas diferenças no padrão de distribuição dos subtipos entre as regiões geográficas (Figura 1.11.1). Na região Norte, foi observada uma proporção equivalente dos subtipos B e F (VICENTE et al., 2000). Na região Sudeste o subtipo B predomina, com prevalências variando entre 65% e 85%, entretanto outros genótipos vêm assumindo grande importância nesta região: a prevalência de subtipo F varia entre 4,8% e 15%, a de subtipo D está em torno de 2,3% e a de recombinantes BF varia de 5,7% a 29%, a depender da sub-região estudada (DE SA FILHO et al., 2008; DE SOUZA et al., 2008; EYER-SILVA et al., 2007; MORGADO et al., 1998a, 2002; TANURI et al., 1999). Além disto, registros de casos de subtipo C vêm sendo realizados no Sudeste do Brasil (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; DUMANS et al., 2002; TURCHI et al., 2002). Na região Nordeste, as prevalências estimadas foram maiores para o subtipo B, com variação entre 81% e 92% e variaram entre 1,6% e 22,6% para o subtipo F e entre 2,7% e 5,5% para os genótipos recombinantes BF (CAVALCANTI et al., 2007; COUTO-FERNANDEZ et al., 1999; DE MEDEIROS et al., 2006; GADELHA et al., 2003). Na região Centro-Oeste, um estudo observou 95% de prevalência do subtipo B e cerca de 5% de recombinantes BF (VERAS et al., 2007). Um outro estudo de amostras desta região relatou um perfil mais variado de genótipos: 69% de subtipo B, 1,7% de subtipo F, 1% de subtipo C, 12% de recombinantes BF, 1,2% de recombinantes BD, 1% de recombinantes BC e 0,25% de recombinantes CD (STEFANI et al., 2007). A região Sul do país tem demonstrado um padrão de distribuição dos subtipos de HIV-1 contrastante com aquele verificado para as outras regiões geográficas do Brasil, o qual está associado à diminuição da prevalência do subtipo B (cerca de 23% a 50%) acompanhada do aumento de subtipos não-B, particularmente do subtipo C, que apresenta frequência entre de 30%, a 48% bem como de subtipos recombinantes (BRINDEIRO et al., 2003; LOCATELI et al., 2007; SOARES et al., 2005).

Além das formas genéticas descritas previamente, até o momento cinco CRFs foram descritas circulando no Brasil, a saber: CRF28\_BF, CRF29\_BF, CRF31\_BC, CRF39\_BF, CRF40\_BF (CARR et al., 2001; DE SA FILHO et al., 2006; GUIMARAES et al., 2008; SANABANI et al., 2006; SANTOS et al., 2006), cada uma delas apresentando um padrão diferente de recombinação. Um estudo conduzido por De Sá filho e colaboradores (2008) detectou cerca de 24% de CRF28 e CRF29 entre indivíduos infectados numa coorte proveniente da cidade de Santos, estado de São Paulo.



**Figura 1.11.1:** Distribuição das principais formas genéticas de HIV-1 no Brasil. Ilustração gentilmente cedida pela Doutora Mariza Morgado, pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz – revisado em abril de 2009.

## 1.12 Variabilidade Fenotípica do HIV-1

Até o momento, não está claro se os diferentes genótipos de HIV possuem características fenotípicas distintas que levem a diferenças na transmissibilidade, infectividade e potencial patogênico. Entretanto, atualmente, inúmeros estudos vêm sendo feitos no intuito de se relacionar a variabilidade genotípica do HIV com suas propriedades biológicas. Entre as diferenças encontradas, está o uso quase exclusivo do receptor CXCR4 pelos vírus do subtipo D e contrariamente, a rara utilização deste correceptor pelas cepas do subtipo C, assim como o tropismo deste subtipo por células MT-2 (TSHERNING et al., 1998). Associado a utilização preferencial pelo CXCR4, um estudo demonstrou um aumento da taxa de declínio do número de células T CD4+ em indivíduos infectados com o subtipo D em comparação com o subtipo A (KALEEBU et al., 2001). Também tem sido descrito que os vírus do subtipo E são mais virulentos que os demais e que apresentam maior capacidade replicativa junto com o subtipo

C em células de Langerhans comparados com o subtipo B (SOTO-RAMIREZ et al., 1996). Outros estudos mostram uma progressão para doença mais lenta em indivíduos infectados com vírus do subtipo A (KALEEBU et al., 2001; KANKI et al., 1999) e que pode haver diferenças significativas na carga viral no pico de viremia logo após a infecção em comparações entre os subtipos B e C (RINKE DE WIT et al., 2002) e entre os subtipos B e E (HU et al., 2001). Quanto à transmissibilidade, alguns estudos demonstraram diferenças na eficiência de transmissão perinatal, nos quais os subtipos A e C foram cerca de 4 e 6 vezes mais transmissíveis do que o subtipo D respectivamente (BLACKARD et al., 2001; RENJIFO et al., 2001). Além destas, foram também relatadas diferenças fenotípicas claras entre vírus dos grupos M e O. Por exemplo, enquanto a incorporação da isomerase celular ciclofilina A durante a formação dos vírions é necessária para a replicação de vírus do grupo M do HIV-1 e para o SIV<sub>CPZ</sub>, não o é para isolados do grupo O (BRAATEN et al., 1996). Além desta diferença, um estudo demonstrou que um subgrupo filogeneticamente distinto de vírus do grupo O é resistente aos inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa enquanto que os vírus do grupo M isolados de pacientes virgens de tratamento são normalmente susceptíveis a estes inibidores (DESCAMPS et al, 1995).

### **1.13 Racional / Justificativa**

A grande variabilidade genética do HIV-1 levando à uma intensa diversidade de comportamentos biológicos dos isolados virais se constitui como o principal obstáculo para a eficiência do funcionamento do sistema imune do hospedeiro bem como para o desenvolvimento de vacinas e terapias universais. Infelizmente, até o momento, não está claro como alterações genéticas virais se traduzem em alterações comportamentais, mas provavelmente, através desta busca, muitas respostas a respeito da patogenia da infecção pelo HIV poderão ser alcançadas. Somando-se a estes obstáculos, os padrões diferenciados de disseminação geográfica dos diversos subtipos, pode-se notar a relevância de estudos envolvendo a caracterização molecular do HIV-1 para o melhor entendimento a respeito de suas propriedades, como transmissibilidade, infectividade, velocidade de progressão para a AIDS, além da geração de conhecimento que contribua para apoiar a escolha adequada de

futuros produtos vacinais anti-HIV/AIDS e de políticas de saúde pública.

No Brasil a presença de múltiplos subtipos, como é o caso dos subtipos A, B, C, D e F tem sido reportada nos últimos anos. O aumento na participação de diferentes subtipos de HIV-1 na epidemia de AIDS do país aumenta a probabilidade de ocorrência de co-infecção com vírus geneticamente diversos e assim contribui de forma significativa para o surgimento de vírus recombinantes que podem eventualmente ser resistentes às terapias atualmente no mercado e/ou escapar aos testes sorológicos para a detecção do vírus. Os métodos de classificação do subtipo de HIV-1 que utilizam a caracterização genética de um único fragmento genômico, como a região do envelope viral, dificultam a detecção de genomas mosaicos do HIV e podem, desta forma, estar representando um perfil epidemiológico não totalmente fidedigno. Portanto, a identificação destas variantes virais, através de caracterização molecular de mais de uma região genômica, se torna igualmente importante para a manutenção da vigilância da epidemia no país.

A utilização do Ensaio de Mobilidade de Heteroduplexes (HMA) como técnica para a caracterização dos subtipos de HIV-1 tem sido eficaz em áreas com índices elevados de infecção pelo HIV, pois além de ser rápida é economicamente mais viável (CABRAL et al., 2006; PEREIRA et al., 2004; RIOS et al., 2005; STEFANI et al., 2007). Além disso, o estudo de duas regiões genômicas, tais como *env* e *gag* (HEYNDRICKX et al., 2000) tem auxiliado na identificação de formas recombinantes. Entretanto, dado o número crescente de formas recombinantes circulantes e únicas sendo reportadas no país, se faz necessária uma reavaliação na eficiência deste método em identificar um amplo espectro de genomas virais. Por outro lado, a técnica de sequenciamento de DNA é atualmente a mais amplamente utilizada e reconhecida como padrão-ouro na determinação do genótipo de HIV-1. Uma vez que o estudo das relações filogenéticas entre isolados de HIV permite estabelecer padrões de transmissão entre pessoas, dentro de comunidades ou entre países, esta se constitui numa ferramenta importante para a vigilância da epidemia. Além disto, o conhecimento das bases evolutivas do vírus pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas e antiretrovirais mais eficientes. Finalmente, a realização deste estudo tem extrema relevância para a caracterização do perfil epidemiológico-molecular do HIV em Salvador, já que as informações atuais a este respeito são escassas. O conhecimento da prevalência e das mudanças temporais na incidência das variantes de HIV em diferentes áreas geográficas, é importante para a avaliação da dinâmica de propagação da epidemia nacional, podendo também ser útil para estudos futuros envolvendo o desenho de medidas de controle adaptadas especificamente para variantes do



HIV circulantes em cada área e para a atualização dos testes sorológicos de triagem.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Investigar o perfil epidemiológico e molecular das infecções pelo HIV-1 no estado da Bahia.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- a) Estimar a prevalência de subtipos genéticos de HIV-1 no estado da Bahia;
- b) Investigar a existência de eventos de recombinação entre isolados de HIV-1 de diferentes subtipos com base na caracterização das seqüências dos genes *gag* e *env* e sua importância nesta população;
- c) Avaliar a eficiência do Ensaio de Mobilidade de Heteroduplexes (HMA) na determinação dos subtipos de HIV-1 em comparação com análises filogenéticas das seqüências de DNA;
- d) Investigar a origem e a relação filogenética de isolados desta população contendo seqüências do subtipo F com base nas seqüências nucleotídicas dos genes *gag* e *env*;
- e) Comparar o comportamento filogenético dos isolados do HIV-1 recombinantes provenientes de duas distintas populações: indivíduos infectados de Feira de Santana e indivíduos infectados acompanhados em um hospital de Salvador.
- f) Analisar o perfil sócio-epidemiológico dos pacientes HIV+ acompanhados no Hospital

Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) em Salvador, Bahia, através da avaliação da proporção homem/ mulher, das principais exposições de risco para infecção e da distribuição em faixas etárias nos pacientes dessa amostra e comparar os resultados com os dados epidemiológicos nacionais;

- g) Verificar a existência de possíveis associações entre os subtipos de HIV-1 e variáveis epidemiológicas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras clínicas

Para a realização deste estudo foram estudadas amostras de sangue de 261 pacientes com diagnóstico laboratorial de infecção pelo HIV-1 e acompanhados pela “Rede de carga viral e contagem de CD4<sup>+</sup>” do Hospital Universitário Professor Edgard Santos/HUPES o qual é o hospital de referência do estado da Bahia para o acompanhamento de portadores de HIV/AIDS. Todos os pacientes tinham sorologia positiva determinada por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e confirmada por imunofluorescência ou Western Blot, de acordo com o fluxograma recomendado pelo CN/DSTAIDS/MS. Trata-se de um estudo anônimo não vinculado, de corte transversal, em que todos os pacientes envolvidos assinaram um termo de consentimento informado contendo as informações referentes ao mesmo (Anexo A). O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (Anexo B).

##### 3.1.1 Critérios de Inclusão

Para serem incluídos nesse estudo, os pacientes deveriam:

- 1) ter sorologia positiva para HIV-1;
- 2) ser cadastrado no HUPES;
- 3) estar sendo acompanhado no ano de 2002;
- 4) ter assinado o termo de consentimento informado.

### 3.1.2 *Banco de Dados*

Um Banco de Dados com as informações sócio-epidemiológicas dos pacientes foi criado no Microsoft Office Access, um sistema de gerenciamento de banco de dados da Microsoft, incluído no pacote do Microsoft Office Professional. As informações incluídas foram de conveniência. Os dados dos pacientes foram obtidos através da elaboração de um questionário, o qual foi preenchido mediante consulta de prontuários. Sendo assim, algumas das informações não estiveram disponíveis para alguns dos indivíduos. Os pacientes foram categorizados segundo o sexo, a faixa etária, a categoria de exposição ao risco e cor/raça.

### 3.1.3 *Coleta do sangue*

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção asséptica em tubos monovetes contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) durante o período compreendido entre março a agosto de 2002. A coleta de cinco mililitros de sangue total foi realizada no Laboratório de Retrovirologia do HUPES e, em seguida, as amostras de conveniência foram enviadas ao Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), onde foram processadas para a separação e armazenamento de frações do sangue tais como plasma e células. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram purificadas através de centrifugação em gradiente de histopaque (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA).

### 3.2 Amostras adicionais

Amostras de DNA de mulheres e crianças infectadas pelo HIV-1 acompanhadas no Centro de Referência em Doenças Sexualmente Transmissíveis (CDST/HIV/AIDS) da Secretaria Municipal de Saúde, na cidade de Feira de Santana, Bahia, Brasil, as quais apresentaram vírus recombinantes em *pol* foram incluídas nas análises. Estas amostras são derivadas do projeto de mestrado do Dr. Edson de Souza Santos “Variabilidade Genética dos Isolados do HIV-1 em Mulheres e Crianças Infectadas do Município de Feira de Santana/Bahia” do curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e coordenado pelo Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da referida instituição (Anexo C), e realizado no período de 30 de março a 30 de outubro de 2008. Para tal estudo, um termo de consentimento informado (Anexo D) foi assinado pelas pacientes adultas e pelos pais ou responsáveis das crianças (2-13 anos) incluídas. Sete amostras classificadas como recombinantes entre os subtipos B e F no gene *pol* no primeiro estudo foram adicionalmente submetidas à caracterização molecular do gene *gag*.

### 3.3 Extração de DNA genômico

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

### 3.4 Identificação dos subtipos de HIV-1 pela técnica de HMA (Ensaio de Mobilidade de Heteroduplexes) dos genes *gag* e *env*

#### 3.4.1 HMA *gag*

Os subtipos de HIV-1 com base no gene *gag* foram determinados pela técnica HMA (DELWART et al., 1993), de acordo com os procedimentos descritos por Heyndrickx e colaboradores (2000).

A PCR foi realizada em duas etapas (*nested* PCR). Os inicializadores utilizados na primeira etapa foram H1G77/H1P202 que amplificam 1,1 kilobases (kb) correspondente à região do aminoácido 16 da p24 do gene *gag* ao aminoácido 33 do gene da protease. Para a segunda fase foram utilizados os inicializadores H1Gag1584/G17 que amplificam um fragmento do gene *gag* de 460 pares de bases (pb), correspondente a região do aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7 (Figura 3.4.1). O volume de DNA genômico utilizado foi de 5 µl, independente da concentração da amostra. As reações foram realizadas no Termociclador Perkin Elmer 9700 ou no Termociclador Perkin Elmer 2400 de acordo com as seguintes condições: um ciclo de 94° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos, 72° C por 90 segundos e um ciclo de extensão por 7 minutos a 72° C. As reações foram realizadas em um volume de 50 µl na primeira etapa, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,2 mM de cada deoxinucleosídeo-trifosfato (dNTPs) (Promega, Madison, WI, USA), 0,2 pmol de cada inicializador, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,05 U/µl da enzima Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA) e 100 µl na segunda etapa, contendo as mesmas concentrações dos reagentes da primeira fase, com exceção dos inicializadores (0,4 pmol de cada) e MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM).

Foram utilizados controles positivo e negativo em todas as reações, a fim de monitorar a correta amplificação dos fragmentos bem como a presença de possíveis contaminações.

Para confirmar a amplificação, os produtos foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA), corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de UV (Ultra-Violeta).

Para formação dos heteroduplexes, 4,5 µl do produto de cada amostra da segunda etapa da PCR foram adicionados, individualmente, a 4,5 µl dos produtos de PCR de amostras de referência que acompanham o *kit gag* para subtipagem, gentilmente fornecido pelo *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*, adicionados a 1 µl de tampão de hibridização a 10X (NaCl 2M, Tris-HCl 1M pH 7,8, EDTA 0,5M e H<sub>2</sub>O). Os heteroduplexes são formados a partir da etapa de desnaturação a 94° C por 3 minutos, seguida de resfriamento por 15 minutos em banho de gelo.

As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida/bisacrilamida a 5% com concentrações de uréia a 20 ou 30% para migração por eletroforese vertical em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) a 1X.

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

#### 3.4.2 HMA *env*

Os subtipos de HIV-1 com base no gene *env* foram determinados pela técnica HMA como descrito por Delwart e colaboradores (1993).

A PCR foi realizada em duas etapas (*nested* PCR). Os inicializadores usados na primeira etapa foram ED5/ED12 que amplificam aproximadamente 1,2 kb correspondente ao fragmento V1-V5 do gene *env* do HIV-1. Para a segunda etapa, foram utilizados os inicializadores ED31/ED33 que amplificam 600 pb da região C2-C3, ou alternativamente, ES7/ES8 que amplificam 700 pb da região V3-V5 (Figura 3.4.1). O volume de DNA genômico utilizado para cada reação foi 5 µl, independente da concentração da amostra. As reações foram feitas no Termociclador Perkin Elmer 9700 ou no Termociclador Perkin Elmer 2400 de acordo com as seguintes condições: três ciclos de 97° C, 55° C e 72° C por 1 minuto em cada uma dessas temperaturas; seguindo de 32 ciclos de 95° C por 45 segundos, 55° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos e um ciclo de extensão a 72° C por 10 minutos. As reações foram realizadas em um volume de 100 µl contendo 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 20 pmol de cada inicializador, 1,25



mM MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U da enzima Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA).

Foram utilizados controles positivo e negativo em todas as reações, a fim de monitorar a correta amplificação dos fragmentos bem como a presença de possíveis contaminações.

Para confirmar a amplificação, os produtos foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA), corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de UV (Ultra-Violeta).

Para a realização da técnica HMA, 5 µl do produto de cada amostra da segunda etapa da PCR foram adicionados, individualmente, a 5 µl dos produtos de PCR das amostras de referência que acompanham o “*kit env* para subtipagem”, gentilmente fornecido pelo *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*, adicionados a 1,1 µl de tampão de hibridização a 10X (NaCl 2M, Tris-HCl 1M pH 7,8, EDTA 0,5M e H<sub>2</sub>O). Os heteroduplexes são formados a partir da etapa de desnaturação a 94° C por 3 minutos, seguida por resfriamento por 15 minutos em banho de gelo.

As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida/bisacrilamida a 5% para migração por eletroforese vertical em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) a 1X.

Após a visualização do gel corado com brometo de etídio em transiluminador de UV, o subtipo foi determinado de acordo com a distância relativa de migração dos heteroduplexes. Uma foto do gel com o resultado de duas das amostras pode ser visualizada na Figura 3.4.2.

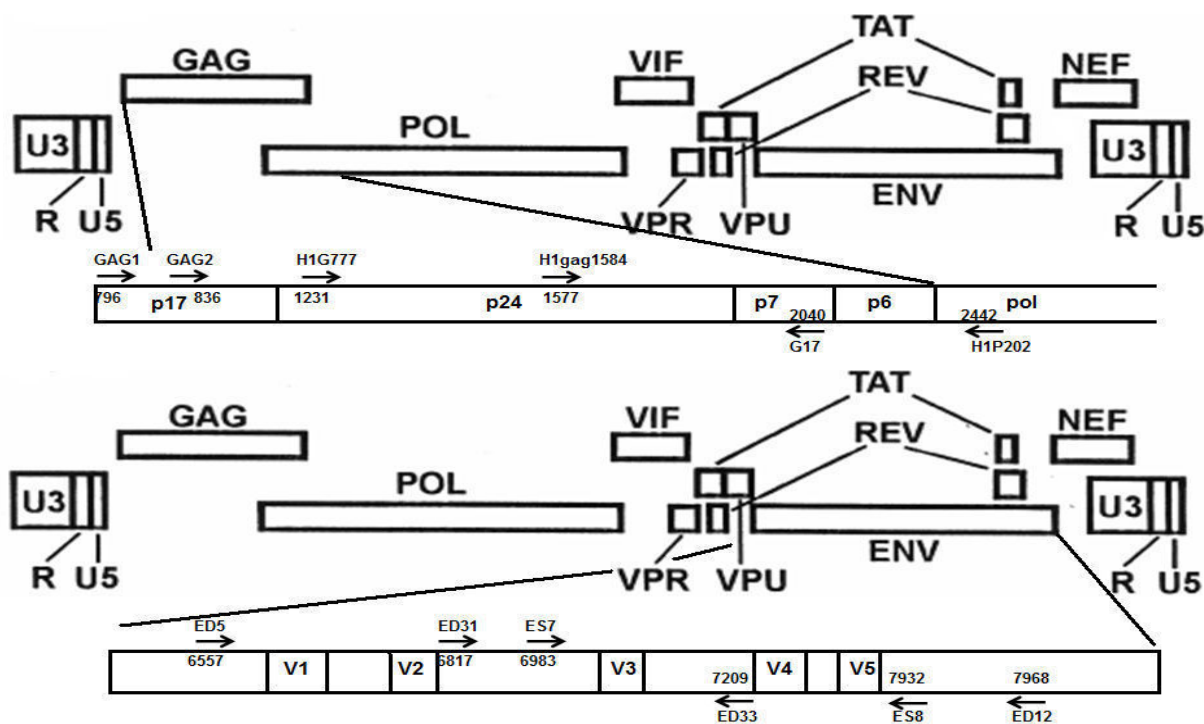
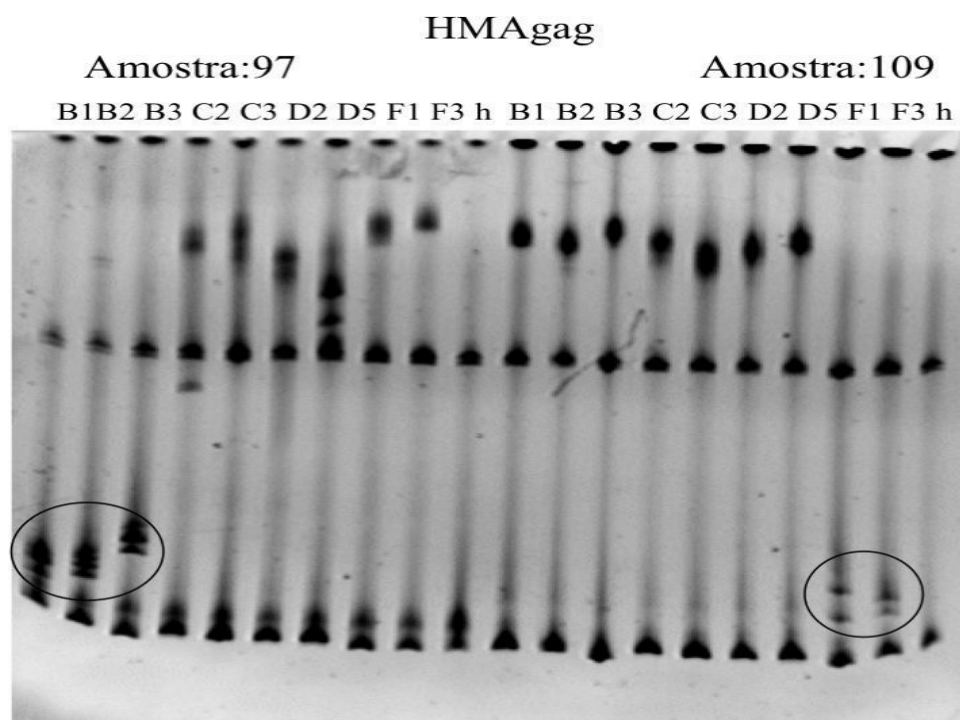


Figura 3.4.1: Esquema dos fragmentos dos genes *gag* e *env* amplificados na PCR.



**Resultado:**  
 Amostra 97:subtipo B    Amostra 109:subtipo F

Figura 3.4.2: Foto do gel de acrilamida do HMA<sub>gag</sub>. Os heteroduplexes formados entre a amostra 97 e as amostras de referência do subtipo B migraram mais rapidamente do que os demais e assim a amostra 97 foi classificada como subtipo B. Do mesmo modo, a amostra 109 foi classificada como subtipo F.

### 3.5 Identificação de possíveis amostras recombinantes

Cento e setenta e cinco (175) amostras foram submetidas a ambos HMA *gag* e *env*. Após análise dos resultados, as amostras que obtiveram subtipos discordantes foram consideradas como possíveis amostras recombinantes e submetidas ao seqüenciamento genômico.

### 3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para seqüenciamento do DNA

Entre as 175 amostras caracterizadas em ambos os genes, aquelas que apresentaram subtipos divergentes nos HMAs *env* e *gag* foram submetidas ao seqüenciamento de DNA. As amplificações de fragmentos dos genes *gag* e *env* foram realizadas através da PCR. As reações foram realizadas em duas etapas. Para a região *gag*, foram utilizados os inicializadores GAG1 (5'-GCGAGAGCGTCAGTATTAAGC-3') e H1P202 (5'-CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT-3') na primeira etapa e GAG2 (5'-GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC-3') e G17 (5'-TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT-3') na segunda etapa, resultando na amplificação de um fragmento de aproximadamente 1100 pb que compreende parte da proteína p17 e a totalidade da proteína p24 e a porção inicial da proteína p7 (Figura 3.4.1). Os mesmos inicializadores utilizados no HMA *env* foram usados para o seqüenciamento (Figura 3.4.1). Cada reação foi realizada num volume de 50µl contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 10 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 10 pmol de cada inicializador, 62,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U de Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA). O volume de DNA utilizado foi estabelecido de acordo com a concentração de cada amostra, de forma a utilizar-se cerca de 1 µg na primeira etapa da reação. Para a segunda etapa, foram utilizados de 2 a 5 µl do produto da primeira etapa da reação. Foi utilizado, na primeira e na segunda fase da PCR, um controle negativo para verificar o aparecimento de possíveis contaminações e um controle positivo contendo DNA extraído a partir de células tumorais PM-1, cronicamente infectadas com o vírus de

laboratório Ba-L. As reações foram realizadas no termociclador Perkin-Elmer 9600 e consistiram, para *gag*, de um ciclo de 94°C (2 min), seguido de 35 ciclos de 94°C (30 seg), 50°C (30 seg), 72°C (90 seg), com 7 minutos de extensão a 72°C no último ciclo e para *env* de três ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (1 min), seguido de 32 ciclos de 94°C (15 seg), 55°C (45 seg), 72°C (1 min), com 10 min de extensão a 72°C no último ciclo. Para verificar o sucesso da amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE e corado com brometo de etídio.

### 3.7 Purificação e Seqüenciamento

Os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando-se o kit de purificação da Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, o sistema de purificação é feito através de uma coluna contendo membrana de sílica-gel com propriedades seletivas, as quais promovem a adsorção das moléculas de DNA e a remoção de contaminantes e impurezas. Para verificar o sucesso da purificação e a quantificação do produto amplificado, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE e corados com brometo de etídio. Após a purificação, estes fragmentos foram submetidos à reação de seqüenciamento no termociclador Perkin-Elmer 9600, utilizando-se o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA), que consta de dNTPs, além de dideoxynucleosídeos-trifosfato (ddNTP) marcados com fluorescência de diferentes padrões de cor e da enzima Taq polimerase. Foram utilizados os mesmos inicializadores da segunda etapa da PCR (GAG2/G17 para *gag* e ED31/ED33 ou ES7/ES8 para *env*). Duas reações foram realizadas para cada amostra, cada uma contendo 1 µl (5 pmoles/µl) de um dos inicializadores, 2 µl de BigDye, 3 µl do tampão do kit (80 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 µl da amostra purificada (50 a 100 ng/µl) e 11µl de água destilada. A termociclagem consistiu de 25 ciclos de 96°C (10 seg), 50°C (5 seg), e 60°C (4 min). Os produtos foram precipitados com etanol (70%) e posteriormente desnaturados a 96°C por 2 minutos, sendo então, seqüenciados no seqüenciador automático Perkin-Elmer/ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

## 3.8 Reconstruções Filogenéticas

### 3.8.1 Determinação do subtipo das amostras

Uma seqüência consenso de cada amostra foi obtida, através do alinhamento das duas seqüências complementares geradas, através do software DNASTAR (BURLAND, 2000) e manualmente editada de acordo com os seus eletroferogramas. Todas as novas seqüências obtidas foram analisadas no programa BLAST para reconhecimento de possíveis contaminações (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As seqüências geradas foram submetidas às análises filogenéticas para a determinação dos subtipos do HIV-1. Estas seqüências consenso foram alinhadas junto com amostras de referência de todos os subtipos do grupo M do HIV-1 obtidas no banco de dados de Los Alamos (PEETERS, 2000; <http://hiv-web.lanl.gov>) utilizando-se o programa CLUSTAL-X (THOMPSON et al., 1997). Seqüências genômicas de um isolado do grupo O do HIV-1 foram utilizadas como grupo externo. O alinhamento gerado foi manualmente editado utilizando o programa GENEDOC (NICHOLAS et al., 1997). As inferências filogenéticas foram realizadas pelos métodos “neighbor-joining” (NJ) e máxima verossimilhança (“Maximum Likelihood”-ML), utilizando-se como modelo de substituição de nucleotídeos o K81uf + proporção de sítios invariáveis (I) + distribuição gama (G) para *gag* e o GTR+I+G para *env*, determinados pelo ModelTest implementado no programa PAUP\* versão 4.02a (SWOFFORD, 1999). A sustentação dos agrupamentos nas árvores foi determinada através do cálculo de “bootstrap” baseado em 1000 reamostragens. As árvores foram visualizadas utilizando-se o programa TreeView (PAGE, 1996). As seqüências geradas neste trabalho foram enviadas ao banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) onde foram registradas sob os números de acesso EU770698–EU770752.

### 3.8.2 *Análise de recombinação*

As amostras foram submetidas à análise de recombinação através do método “Bootscanning” implementado no programa SIMPLOT (SALMINEN et al., 1995). Este método consiste na aplicação de técnica de “bootstrap” (reamostragem aleatória) em segmentos consecutivos do genoma [por exemplo, segmentos de 300 pb a cada 20 pb (valor do passo)]. Cada amostra-teste é analisada individualmente através da comparação do grau de relação (expresso como valor de bootstrap) com amostras de referência de todos os subtipos e principais CRFs do grupo M. O resultado é um gráfico onde o eixo X significa posição na seqüência, e o eixo Y significa valores de “bootstrap” para cada segmento. Cada ponto significa um novo segmento que é movido pelo valor do passo. Em cada segmento, a amostra de referência mais relacionada com a amostra analisada tem seu valor de “bootstrap” plotado no eixo Y.

O ponto de recombinação foi determinado através da busca de assinaturas de nucleotídeos subtipo-específicas utilizando-se o programa GENEDOC. O alinhamento das seqüências foi então fragmentado neste ponto, gerando dois novos conjunto de seqüências, os quais foram individualmente submetidos à novas análises filogenéticas conforme descrito anteriormente com os modelos de substituição de nucleotídeos F81uf+I+G (porção inicial) e TRN+I+G (porção final).

### 3.8.3 *Análise das relações intra-subtipos*

As relações intra-subtipos das amostras estudadas foram investigadas através de análises filogenéticas individuais de seqüências dos subtipos B, F e D, incluindo as novas seqüências obtidas neste estudo, além de seqüências previamente caracterizadas do Brasil e de outros países. Seqüências do grupo O do HIV-1 foram utilizadas como grupo externo. As seqüências foram alinhadas e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se a mesma metodologia descrita acima sendo escolhido o modelo de substituição de nucleotídeos

K81uf+I+G para as inferências filogenéticas da região *gag* e o GTR+I+G para as análises da região *env*.

Adicionalmente, uma árvore filogenética foi reconstruída com base no fragmento concatenado, utilizando o programa BIOEDIT (HALL, 1999), formado pela união das seqüências *gag* e *env* das amostras obtidas neste estudo e das seqüências de referência obtidas no Banco de Dados de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>), utilizando-se a mesma metodologia descrita acima, tendo o modelo de substituição de nucleotídeos TVM+I+G sido o escolhido.

#### 3.8.4 *Determinação da diversidade genética*

As distâncias genéticas médias (estimativa do número real de substituições entre táxons) entre as seqüências dentro dos diferentes subtipos e grupos recombinantes foram calculadas utilizando-se o método de distância Kimura-2-parâmetros (considera frequência igual de bases e que a taxa de transições é diferente da taxa de transversões) (KIMURA, 1980) implementado no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007).

#### 3.8.5 *Análise das seqüências de aminoácidos*

As seqüências nucleotídicas foram traduzidas em seqüências de aminoácidos através do programa GENEDOC (NICHOLAS et al., 1997), e estas foram analisadas no programa BIOEDIT (HALL 1999) quanto a presença de assinaturas e comparadas a seqüências consenso dos subtipos B, F e suas principais formas recombinantes relacionadas obtidas no banco de dados de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>).

### 3.8.6 *Análise comparativa dos diferentes padrões de recombinação entre isolados de HIV-1 dos subtipos B e F*

No intuito de obter um melhor entendimento do perfil epidemiológico da epidemia de AIDS no estado da Bahia, as seqüências *gag* e *env* dos indivíduos acompanhados no Hospital Universitário Professor Edgard Santos em Salvador que apresentaram vírus recombinantes BF foram comparadas com seqüências de vírus recombinantes BF provenientes de mulheres e crianças infectadas da cidade de Feira de Santana.

Para esta análise, foi gerado um alinhamento composto por seqüências de vírus recombinantes BF circulantes no estado, bem como, de seqüências de recombinantes BF únicos e CRFs BF circulantes nas demais regiões do país; todas obtidas no GeneBank (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov>). A mesma metodologia descrita acima foi utilizada para a reconstrução da árvore filogenética.

## 3.9 **Analises Estatísticas**

Para analisar a significância estatística das associações entre os genótipos e variáveis epidemiológicas (sexo, exposição de risco e faixa etária) foi utilizado o programa computacional WINPEPI, versão 9.3 (ABRAMSON, 2004) , através do qual foi possível realizar os testes Exato de Fisher, Qui quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson e “Odds Ratio” (OR). Os resultados foram considerados significativos quando o valor de  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

Os resultados estão descritos em duas seções principais:

### 4.1 Artigo publicado

MONTEIRO, J.P.; ALCANTARA, L.C.J.; DE OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, A.M.; MELO, M.A.; BRITES, C.; GALVÃO-CASTRO, B. Genetic Variability of Human Immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High Diversity of HIV Genotypes. **Journal of Medical Virology**, v. 81: p. 391–399, 2009.

As figuras contidas no artigo encontram-se melhor detalhadas no Apêndice A.

### 4.2 Análises Complementares

#### 4.1 Artigo publicado

MONTEIRO, J.P.; ALCANTARA, L.C.J.; DE OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, A.M.; MELO, M.A.; BRITES, C.; GALVÃO-CASTRO, B. Genetic Variability of Human Immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High Diversity of HIV Genotypes. **Journal of Medical Virology**, v. 81: p. 391–399, 2009.

# Genetic Variability of Human Immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High Diversity of HIV Genotypes

Joana Paixão Monteiro,<sup>1</sup> Luiz Carlos Junior Alcantara,<sup>1,2</sup> Tulio de Oliveira,<sup>3</sup> Antonio Marcos Oliveira,<sup>1</sup> Marco Antônio Gomes Melo,<sup>1,2</sup> Carlos Brites,<sup>4</sup> and Bernardo Galvão-Castro<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Avançado de Saúde Pública, CPqGM/FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>2</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>3</sup>South African National Bioinformatics Institute, Cape Town, South Africa

<sup>4</sup>Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

The HIV-1 genetic variability in Bahia state, Brazil, was investigated. DNA samples from 229 and 213 HIV-1-infected individuals were analyzed using the heteroduplex mobility assay (HMA) in *gag* and *env* fragments, respectively. One hundred seventy-five samples were characterized in both genes. Thirty-two subtype F and BF recombinant viruses were sequenced and analyzed by phylogenetic methods. The combination of HMA and sequencing results showed that seven different HIV-1 genotypes comprised this sample: 147 (84%) B/B, 4 (2.3%) F/F, 3 (1.7%) B/F, 1 (0.6%) F/B, 1 (0.6%) F/D, 1 (0.6%) BF/F, and 18 (10.3%) BF/B. A significant divergence was observed between these two techniques results (84.4%). This is explained by the low accuracy of the HMA for detecting recombinant viruses. These recombinants were unrelated to CRF12, while two sequences were related to CRF28 and CRF29. Nineteen BF mosaics shared the same *gag* breakpoint. In conclusion, the use of HMA may be inappropriate in regions where different subtypes are co-circulating. Subtype B is the most common genotype, however, an increased prevalence (13.1%) of different BF variants and a potentially new CRF suggest that recombination is occurring frequently in Bahia. These viruses were associated with women infected heterosexually. Finally, this study identified the presence of an F/D recombinant HIV-1 in Brazil. **J. Med. Virol.** **81:391–399, 2009.** © 2009 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** HIV-1; epidemiology; phylogeny; Brazil; Bahia

## INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus (HIV) is characterized by high genetic variability and is classified into

different types, groups, subtypes, and circulating recombinant forms (CRFs) [McCutchan et al., 2000; Casado et al., 2005; Thomson et al., 2005; De Sa Filho et al., 2006], each presenting distinct distribution in the world. Moreover, HIV-1 genotypes show different dispersion among the different risk groups and transmission routes [Weniger et al., 1994; Kuanusont et al., 1995; Burke and McCutchan, 1996]. Nevertheless, the association between this genetic variability and viral features as transmission, infectivity, and pathogenesis is not elucidated to date.

Subtype B is the predominant HIV-1 genotype in Brazil. However, an increasing number of non-B and recombinant infections are being identified [Morgado et al., 2002; Eyer-Silva et al., 2007; Monteiro et al., 2007]. Within the Brazilian vast territory, different subtype distribution patterns have been reported among its five geographic regions. The southern and southeastern regions have been largely characterized in regard to HIV-1 molecular epidemiology. However, little information is available about other regions of the country. Particularly, in Bahia state, few previous studies have focused on the prevalence of HIV-1 subtypes [Couto-Fernandez et al., 1999; Pedrosa et al., 2007] which considered only short fragments of the HIV genome, thus, probably under estimating the presence of mosaic virus.

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); Grant sponsor: Brazilian Ministry of Health STD/AIDS Program; Grant sponsor: CNPq.

\*Correspondence to: Bernardo Galvão-Castro, Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador, Bahia 40296-610, Brazil.  
E-mail: bgalvao@bahia.fiocruz.br

Accepted 4 November 2008

DOI 10.1002/jmv.21414

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

Bahia is the fourth most populous Brazilian state and presents the highest number of notified cases of HIV/AIDS in the Northeast region. In this part of the country, economic and education privation, sexual tourism, and prostitution can be related to an increase in the incidence of AIDS and the introduction of new genetic forms is expected. Therefore, the identification of these variants is of great importance for HIV surveillance as well as for vaccine development and efficacy. This study was conducted in order to access the HIV genetic variability in Salvador, the capital of Bahia, to determine the prevalence of subtypes and to verify the association with groups and transmission routes. Also, the current molecular epidemiological profile of the HIV population in this area was compared with previous data from 10 years ago. Thus, besides its potential implications for therapeutic strategies at a local level, this study contributes to the understanding of the evolution of HIV.

This study has received official and ethical approval of the Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia.

## METHODS

### Study Population

As part of a sectional study in 2002, blood samples from 261 HIV-1-seropositive subjects, unrelated epidemiologically and followed regularly at Professor Edgard Santos University Hospital, Salvador, Bahia, were obtained after informed consent. The samples were sent to the Advanced Laboratory of Public Health (LASP)/CPqGM/FIOCRUZ for further processing. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by centrifugation on Ficoll-hypaque gradient. DNA was extracted from PBMCs using the Qiagen extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). Clinical and epidemiological information were obtained from medical records.

### Genotyping

Semi-nested PCR was conducted for individual amplification of *gag* and *env* fragments. The heteroduplex mobility assay (HMA) was based on *gag* and *env* fragments amplified by PCR. H1G777/H1P202 and H1Gag1584/G17 were used as outer and inner primer sets for *gag*, while for *env*, ED5/ED12 and ED31/ED33 were used as outer and inner primers, respectively. The PCR conditions and the HMA subtyping were carried out as described previously [Delwart et al., 1993; Heyndrickx et al., 2000]. Samples classified as subtype F in HMA<sub>gag</sub> and/or HMA<sub>env</sub> had further PCR amplification. The *gag* p17 (~1,150 bp) nested PCR protocol was carried out as described previously [Guimarães et al., 2002]. The same HMA primer set (~550 bp) or, alternatively, ES7/ES8 (~700 bp) were used for *env* amplification.

### Sequencing and Analysis

PCR products were purified in Qiagen columns (Qiagen) and sequenced in an ABI 3100 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems). Sequences were assembled using SeqMan software (DNASTar, Madison, WI) and reported to GenBank under the accession numbers EU770698–EU770752.

An alignment with a subtype reference set from Los Alamos database (<http://hiv-web.lanl.gov>) was created using CLUSTAL X software [Thompson et al., 1997] and edited manually in GENEDOC [Nicholas et al., 1997]. The *gag* and *env* fragments corresponded to positions 952–1958 and 6845–7324 relative to HXB2 genome, respectively. All the sequences were checked for contamination by BLAST search against the HIV-1 sequences database and among themselves. Neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) trees were reconstructed in the PAUP\* 4.0b10 software [Swofford, 1999], using the appropriate nucleotide substitution model implemented in the Modeltest software [Posada and Krandall, 1998]. The reliability of each cluster was determined using 1,000 bootstrap replicates. For the ML tree, a heuristic search was undertaken with a subtree-pruning-regrafting branch swapping algorithm using the NJ tree as the starting material, including its optimized parameters. The likelihood ratio test (RT) method was used to calculate statistical support for the branches:  $P < 0.001$  (highly significant \*\*) and  $P < 0.005$  (significant \*). Bootstrap and ML supports were added to NJ tree that was drawn with the TreeView 1.4 software [Page, 1996].

The Bootscanning method implemented in the SIMPLOT software [Salminen et al., 1995] was used to investigate the intra-gene recombination within *gag* fragments, and the GENEDOC software was used to determine the specific crossover point based on the HXB2. Sequences were fragmented at this breakpoint and the segments were submitted to phylogenetic analysis with Los Alamos reference data sets. Intra-subtype relationships were investigated through individual phylogenetic analysis of subtypes B, F, and D *gag* and *env* sequences (including new sequences, Brazilian sequences characterized previously, and sequences from other countries) as described above. Samples had their *gag* and *env* sequences concatenated (1,500 bp) and submitted to phylogenetic analysis using the method described above. The between and within-group genetic distances were measured using the Kimura 2- $\alpha$ -parameter model with a distance matrix implemented in the MEGA 4.0 package [Tamura et al., 2007]. The standard error computation was obtained by bootstrap analysis (1,000 replicates).

## RESULTS

In this sectional study, HMA analyses were conducted in order to identify the HIV-1 subtype of 155 men (59.4%) and 106 (40.6%) women. Out of these, 228 and 208 samples were individually analyzed in *gag* and *env* fragments, respectively. Based on *gag* analysis, 202 (88.6%) samples were classified as subtype B, 25 (11.0%) as subtype F, and 1 (0.4%) as subtype D, while in *env*

region, 204 (98.1%) samples were classified as B, 3 (1.4%) as F, and 1 (0.5%) as D. Subtype F was at least 3 times more frequent in *gag* than in *env* gene. One hundred seventy-five samples were characterized in both genomic regions; pure subtype B was assigned for 143 (81.7%) samples and pure subtype F for 1 (0.6%). Three recombinant forms were identified: 6 (3.4%) Bgag/Fenv, 24 (13.7%) Fgag/Benv, and 1 (0.6%) Dgag/Benv. Concerning the association between HIV-1 subtypes and gender, 64% (16) of the samples classified as subtype F in *gag* were obtained from women, while 63.4% (128) of the B samples were isolated from men. In *env*, all three F samples represented men and 40.7% (83) of the B samples represented women. Regardless of the genomic segment analyzed, subtype B was the most prevalent among both genders.

In attempt to characterize the subtype F viruses circulating in Brazil, *gag* (952–1958 relative to HXB2) and *env* (6845–7324 relative to HXB2) fragments of the 32 samples classified as subtype F in the *gag* and/or the *env* HMA were sequenced and submitted to phylogenetic analyses (Fig. 1). Some samples are not shown in the trees, either because they had shorter *gag* sequences,

were amplified with different *env* primers or have not been amplified in *env* region. In the NJ analysis of *env*, 18 sequences clustered as subtype B, 3 as subtype F, and 1 as subtype D. In *gag* analysis, 7 sequences grouped with subtype B references, 6 sequences grouped within the subtype F reference cluster, and 18 sequences formed a separated but closely related to the F group (bootstrap = 70). Therefore, these sequences were examined further using the Bootscanning recombination tool. All these sequences and one other smaller sequence (109) presented a recombination pattern between subtypes B and F in the *gag* fragment (Fig. 2a), with the crossover site located between positions 1370 and 1410 (relative to HXB2). In order to determine if these BF recombinants were phylogenetic related, the exact recombination point was sought through the inspection of subtype signature nucleotides in comparison to the Los Alamos reference set with the GENEDOC software. All the BF recombinant sequences shared the same breakpoint, located at p24 (position 1398 in HXB2). NJ and ML analyses of the individual fragments using the appropriate evolutionary model confirmed the Bootscanning recombination results (Fig. 2b).

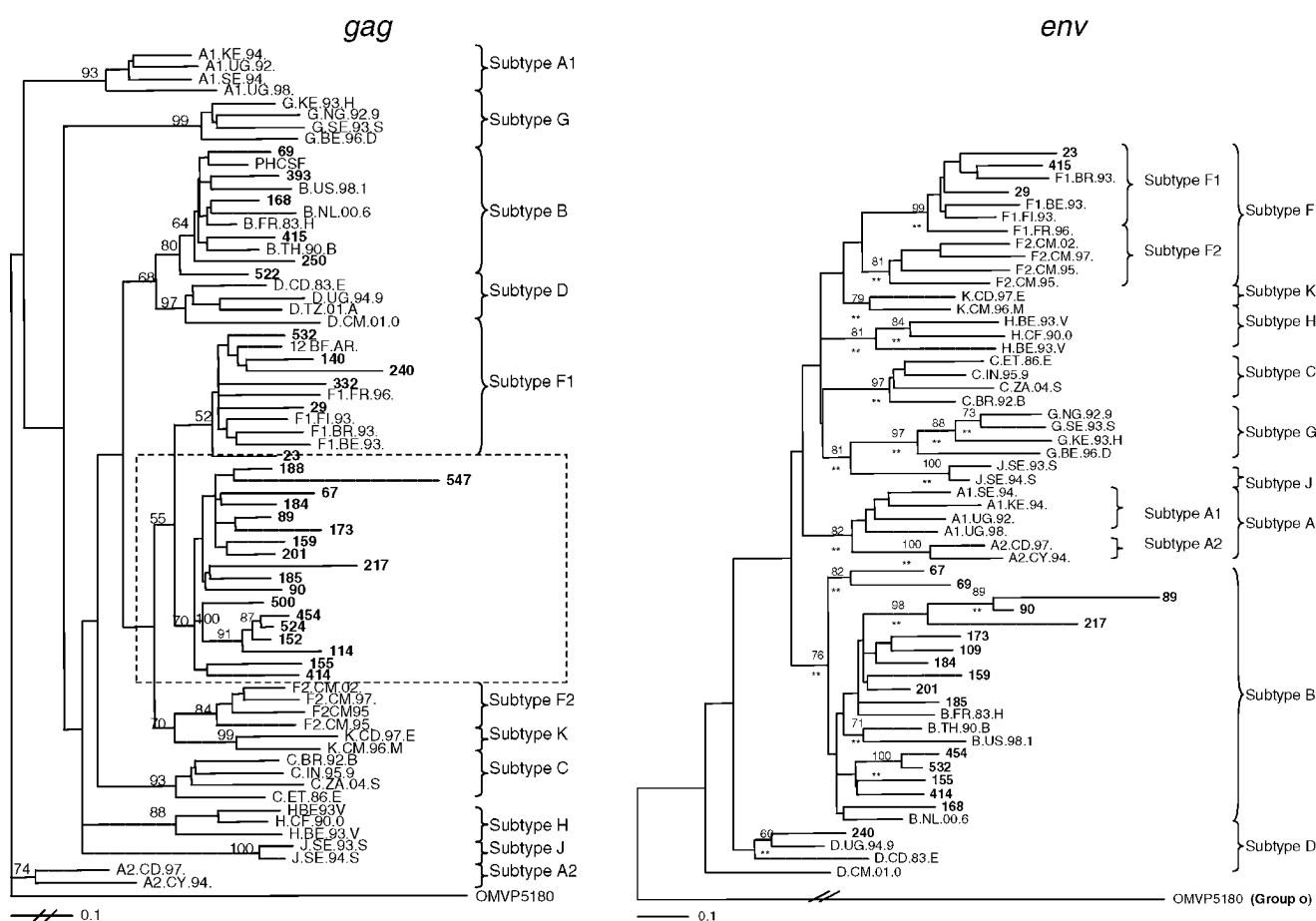


Fig. 1. *gag* and *env* phylogenetic relationships among HIV-1 samples from Bahia and group M references sequences from Los Alamos database. Group O sequences were used as outgroup. Trees were constructed based on the NJ method using the K81uf + I + G (*gag*) and the GTR + I + G (*env*) substitution models, respectively. Bootstrap

values for 1,000 replicates are indicated. Branches highly supported by the ML method are indicated as \*\* ( $P < 0.001$ ). HIV-1 sequences generated in the present study are indicated in bold. Eighteen *gag* sequences formed a unique monophyletic group outside the subtype F1 cluster shown within the box.

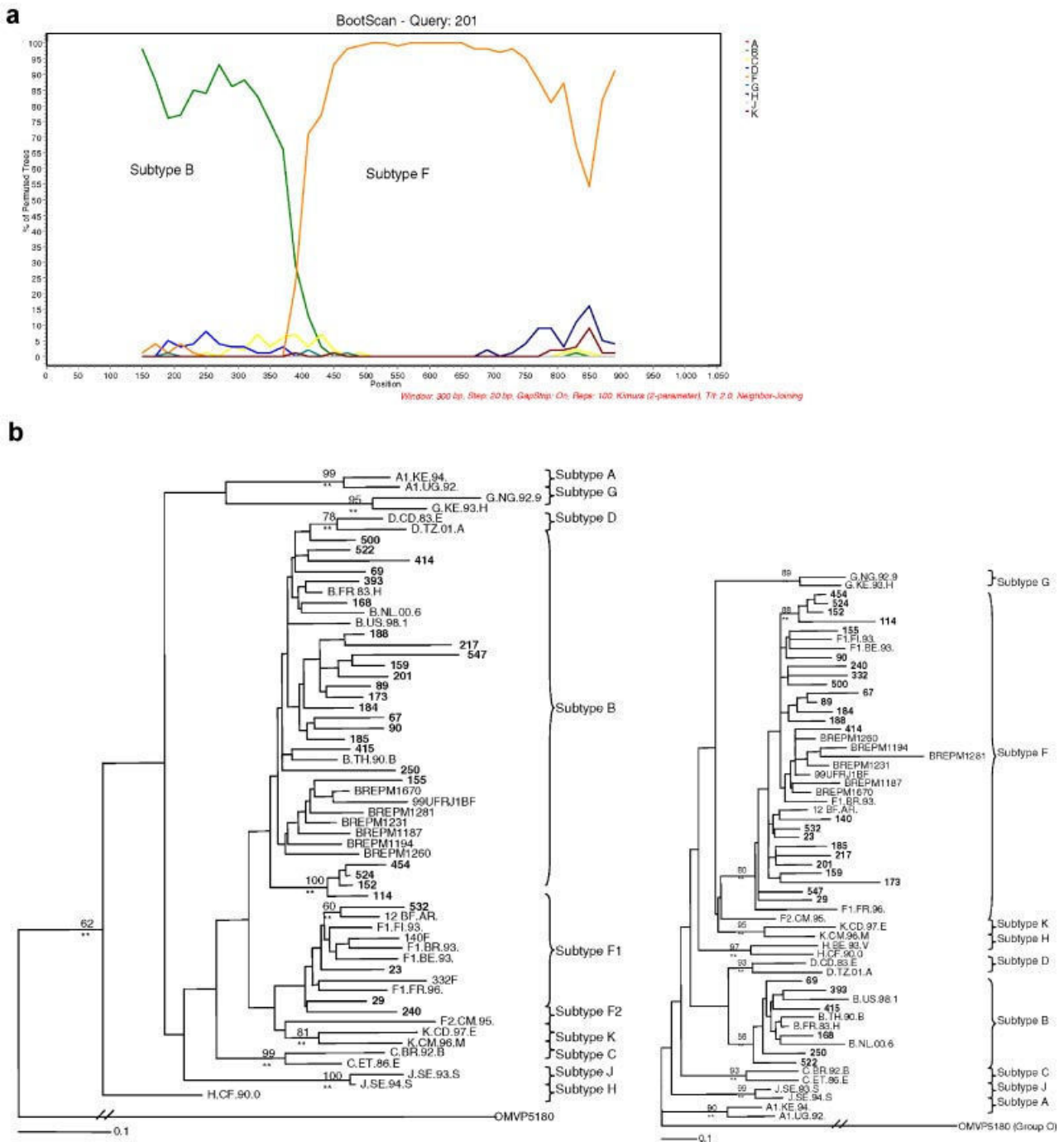


Fig. 2. BF recombinant viruses among Brazilian HIV-1 samples. **a**: Bootscan analysis showing the recombinant pattern between subtypes B and F inside the *gag* gene. **b**: Sequences were fragmented at the breakpoint and the segments (HXB2 nucleotides 952–1397 and 1398–1961) were submitted to NJ analysis with Los Alamos reference set using the F81uf+I+G and the TRN+I+G substitution models, respectively. Bootstrap values for 1,000 replicates are indicated. Branches highly supported by the ML method are indicated as \*\* ( $P < 0.001$ ). HIV-1 sequences generated in the present study are indicated in bold.

The HMA and phylogenetic results (Table I) were compared. The following discordance was found: based on *gag*, two samples classified as subtype F<sup>1</sup> (393 and 522) and one as subtype D (168) with HMA were indeed subtype B, while three samples classified as subtype B grouped within the subtype F (29 and 140) and BF<sup>1</sup> (524)

clusters. Based on *env*, two samples classified as subtype B with HMA were actually one subtype F (23) and one subtype D (240) in the phylogenetic tree and one classified as subtype F was inside the subtype B group (69).

Thus, considering the combined HMA and sequencing analyses (Table I), the 175 samples were classified in

TABLE I. Clinical and Epidemiological Characteristics and Genetic Subtypes of HIV-1-Infected Individuals From Bahia

Sample	Subtype <sup>a</sup>		Clinical and epidemiological data						
	<i>gag</i>	<i>env</i>	Gender	Age	Diagnosis (year)	Transmission route	Viral load (copies/ml)	CD4 (cells/ml)	AIDS symptoms
23	F	F	M	38	NA	NA	NA	NA	Y
29	F	F	M	38	NA	NA	NA	NA	N
67	BF	B	F	NA	NA	Ht	NA	NA	NA
89	BF	B	M	38	1996	Ht	1,600	176	N
90	BF	B	M	39	1997	Hm	Ldl	631	N
109	BF	B'	F	NA	NA	Ht	NA	NA	NA
114	BF	B	F	NA	1999	Ht	4,700	85	N
140	F	F	F	29	1997	Ht	Ldl	543	N
152	BF	B	F	28	1997	Blood	Ldl	781	N
155	BF	B	M	40	1997	Ht	2,300	694	N
159	BF	B	F	36	1996	Ht	8,700	210	Y
173	BF	B	M	25	1999	Ht	450,000	233	N
184	BF	B	F	23	1996	Ht	250,000	65	Y
185	BF	B	F	NA	NA	Ht	NA	NA	NA
188	BF	B	F	NA	NA	Ht	NA	NA	NA
201	BF	B	M	35	NA	NA	66,000	156	NA
217	BF	B	F	41	2000	IDU	<40	157	N
239	B	F	F	30	1999	Blood	<80	223	N
240	F	D	F	38	1998	Ht	110	246	NA
250	B	F	F	NA	NA	IDU	61,000	407	N
332	F	F	M	NA	2001	NA	1,700	393	N
414	BF	B	M	39	2002	Ht	10,000	303	N
415	B	F	F	NA	NA	Ht	NA	NA	NA
454	BF	B	F	NA	NA	Ht	NA	NA	NA
500	BF	B	F	39	NA	Ht	Ldl	612	NA
524	BF	F	F	35	NA	Ht	Ldl	549	N
532	F	B'	F	35	1996	Ht	Ldl	550	N
547	BF	B	F	NA	NA	Ht	NA	NA	NA

B', Brazilian subtype B; NA, not available; M, male; F, female; Ht, heterosexual; Hm, homosexual; IDU, intravenous drug user; Ldl, lower than detectable levels; Y, yes; N, no.

<sup>a</sup>*gag* and *env* subtypes were defined based on phylogenetic analyses. For the samples that did not have enough material for the sequencing, results presented here are based on HMA.

seven different HIV-1 genotypes based on *gag/env* genomic regions: 147 (84%) B/B, 4 (2.3%) F/F, 3 (1.7%) B/F, 1 (0.6%) F/B, 1 (0.6%) F/D, 1 (0.6%) BF/F, and 18 (10.3%) BF/B. Table I summarizes the subtypes and clinical-epidemiological data of the 28 individuals infected with subtype F or F recombinant viruses. Overall, 67.9% were women, 79.2% reported heterosexual behavior, 8.3% were intravenous drug users, and 2 women (8.3%) were infected through blood transfusion. One man reported homosexual relation as the transmission route. Mean age was 35 years, median CD4 count was 303 cells/ml (interquartile range = 349) and median viral load was 1,600 copies/ml (interquartile range = 10,000). Most of the patients (83.3%) did not present symptoms typical of AIDS status.

To further characterize the intra-subtype relationships of the viruses circulating in this population and to analyze the relationships between new and previously described BF recombinants, phylogenetic trees were constructed using Los Alamos reference sequences of subtypes B, F, and D and other pure-subtype and recombinant sequences from South America (Fig. 3). In the *gag* full-segment analysis (Fig. 3a), like in the subtyping tree (Fig. 1), the 18 recombinant sequences clustered as a monophyletic group outside the subtype F1 cluster together with other BF recombinants

described previously including sequences of two CRFs identified in southeastern Brazil [De Sa Filho et al., 2005, 2006]. However, two different monophyletic sub-clusters can be observed within this BF cluster: one formed by 16 of the recombinant sequences identified in this study and other BF recombinant sequences from Brazil and Argentina and the other formed by two of the new recombinant samples, CRF28 and CRF29 sequences. Moreover, inside the former cluster, four sequences (454, 524, 152, and 114) formed a separate cluster supported by a bootstrap of 90. The same topology for this group was observed in the trees based on individual subtype fragments of *gag* (Fig. 2b). None of the recombinants were closely related to the CRF12, although one F sequence (532) was in both inter (Fig. 1) and intra-subtype (Fig. 3) analyses of *gag*. The intra-subtype phylogenetic analysis of the envelope sequences (Fig. 3b) showed that subtype B sequences clustered inside two major groups. The first one was represented by all the CRF28 and CRF29 sequences in addition to five of the new sequences, all of which presenting the BF recombination pattern in *gag*. The second group was formed by nine samples obtained in this study, all the other sequences from Bahia [Couto-Fernandez et al., 1999] and other B sequences from other parts of Brazil and from other countries. All of

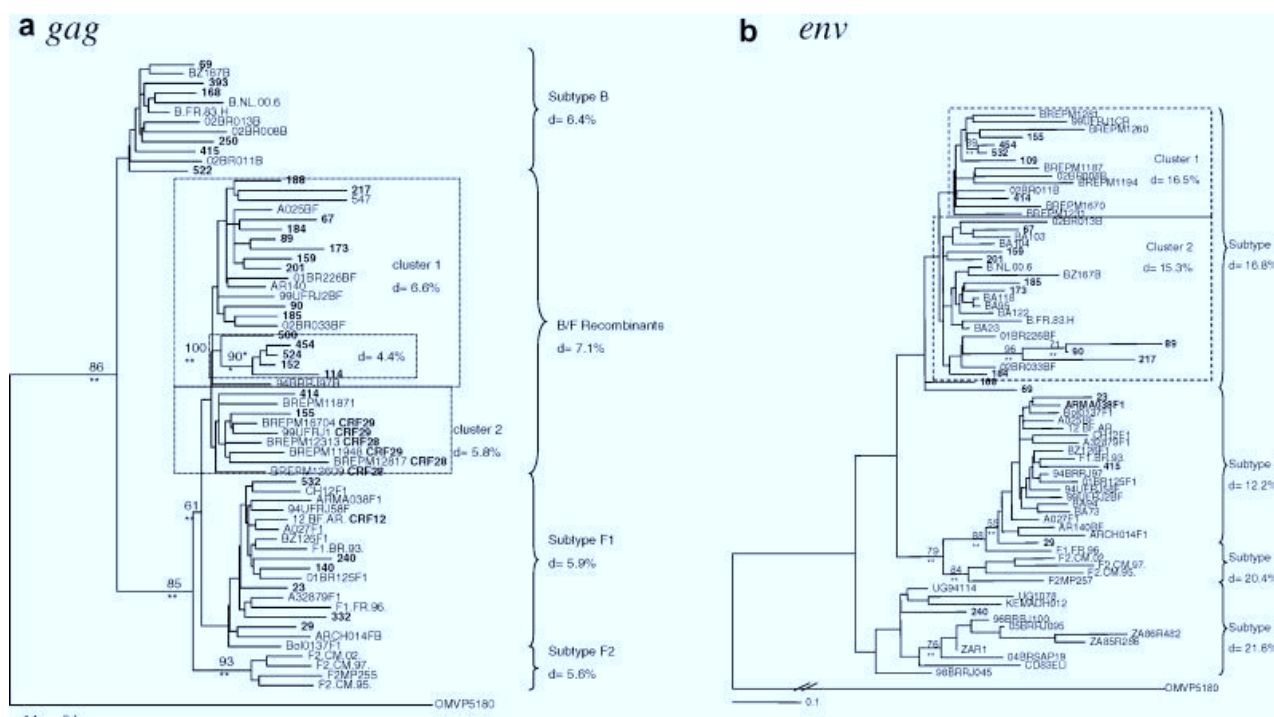


Fig. 3. **a:** *gag* and **(b)** *env* phylogenetic relationships among HIV BF recombinants from Bahia, compared to other subtypes B, F, and BF recombinant sequences from South America and around the world. Trees were constructed based on the NJ method using the K81uf+I+G (*gag*) and the GTR+I+G (*env*) substitution models, respectively. Bootstrap values for 1,000 replicates are indicated. Branches highly supported by the ML method are indicated as \*\* ( $P < 0.001$ ). HIV-1 sequences generated in the present study are indicated in bold.

these nine subtype B sequences were BF recombinants in the *gag* fragment. Concerning the intra-subtype F relationships, the three new envelope sequences were dispersed among the vast reference group; however, none of them was closely related to the two other subtype F sequences from Bahia identified previously neither to the subtype F sequence of CRF12. The *env* subtype D sequence identified here clustered inside the subtype D group, however, this sequence was not related to any of the other sequences of subtype D identified so far in Brazil as well as to any other African sequence used as reference. The genetic distances for the subtypes and recombinant clusters are shown in the trees.

Diverse unique BF recombinant genomes as well as two CRFs have been described in other geographic regions of Brazil [De Sa Filho et al., 2005, 2006; Sanabani et al., 2006]. Thus, the genetic structures of such viruses were compared to the recombination patterns from Bahia (Fig. 4). In the *gag* and *env* concatenated tree, 19 new viruses had both genome fragments available. Out of these, all BF<sub>*gag*</sub>/B<sub>*env*</sub> and F<sub>*gag*</sub>/B<sub>*env*</sub> recombinants involved in this analysis formed a unique monophyletic group (bootstrap = 73). Again, two different recombinant clusters, with significant bootstrap values (84 and 90, respectively), were observed: one formed by CRF28 and CRF29 sequences in addition to two of the samples and the other composed by nine new recombinants and one recombinant from Brazil identified previously. The other BF recombinant

pattern virus (415 = B<sub>*gag*</sub>/F<sub>*env*</sub>) clustered closer to subtype B sequences, however, outside the group. The FD recombinant sequence did not cluster with any pure-subtype or recombinant sequence.

## DISCUSSION

The identification of HIV-1 genotypes represents an important tool for molecular epidemiology studies, helping the evaluation of changes in the HIV epidemic and also contributing to the understanding of the determinants of virus evolution. The HIV genetic diversity and distribution are well documented for the southern and southeastern regions of Brazil; however, few reports have focused on the remaining geographic regions. The aim of this study was to evaluate the HIV-1 subtype distribution in Salvador, the capital of Bahia state and the third most populous city in the country. With almost 3 million people living in the city, 13,750 are estimated to be infected with HIV in Salvador [Dourado et al., 2007]. The HMA testing was used to screen the subtypes in 261 HIV-positive samples since this technique has been described as a useful tool to determine HIV subtypes [Pereira et al., 2004; Rios et al., 2005; Cabral et al., 2006]. However, when the sequences of 32 subtypes F and BF recombinants were analyzed, a significant proportion of divergence was found between these methods (84.4%). These contrasting results can be attributed to the limited ability of the HMA to



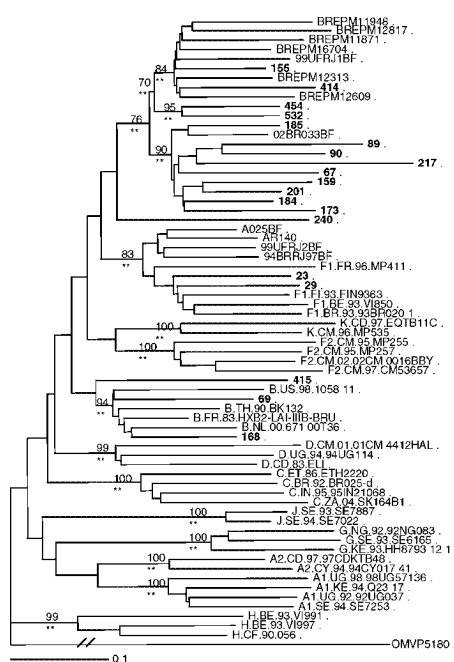


Fig. 4. NJ tree based on the concatenated *gag* and *env* regions showing the phylogenetic relationships of the Brazilian BF recombinants viruses relative to other subtypes and recombinant forms. Trees were constructed using the TVM + I + G substitution model. A group O sequence was used as outgroup. Branches highly supported by the ML method are indicated as \*\* ( $P < 0.001$ ). HIV-1 sequences generated in the present study are indicated in bold.

distinguish BF recombinants as 19 intra-*gag* BF recombinants were identified as either subtype F or B isolates. Therefore, the use of the HMA may be inappropriate to identify HIV genotypes in regions where different subtypes co-circulate and where the presence of recombinant viruses is expected. In this context, Buonaguro et al. [2005] had proposed a modified version of HMA in which instead of being used for subtype classification, the technique is used to screen HIV-1 isolates divergent from the local predominant subtype by testing samples only against the reference standard representing that predominant subtype. Eighty-four percent of the studied samples were pure B, 2.3% were pure F, 13.1% were represented by different patterns of subtypes B and F recombinants, and 0.6% (one sample) was an F/D recombinant. Subtype C was not represented in this population. The differences in subtypes B and BF recombinants prevalences compared to the previous data (92% and 5.5%, respectively) [Couto-Fernandez et al., 1999] can be attributed to two different factors: (1) an increase in the circulation of BF recombinants and (2) a previous sub-estimation of the real prevalence of BF recombinants since only one genetic region was analyzed in that report. On the other hand, both present and previous studies reported a similar lower rate of pure subtype F (1.6%) compared to BF recombinants in Bahia. The 2.3% of subtype F found here are also lower than the prevalence found for the southeastern region, which varied from 3.7% to 9% [Guimarães et al., 2002; Couto-

Fernandez et al., 2005; De Sa Filho et al., 2005; Barreto et al., 2006; Cabral et al., 2006]. Similarly, different reports based on samples from Argentina and Brazil have shown that most of the samples characterized previously as subtype F in one genomic region were indeed BF recombinants in the complete genome, suggesting that the occurrence of pure subtype F is rare [Carr et al., 2001; Guimarães et al., 2002; Thomson et al., 2002; Quarleri et al., 2004; Barreto et al., 2006]. If these mosaic viruses present evolutionary advantages over pure subtype F strains is a subject for future investigation. In this regard, out of the 23 recombinant viruses identified in this work and among five different patterns, 19 had subtype B sequence in *env*, which could be an indication of selective pressure to the maintenance of the subtype B envelope. Supporting this theory, one previous study [De Sa Filho et al., 2005] showed that among six different BF recombination patterns, all of them were subtype B in the envelope and another one [Monteiro et al., 2007] reported that from three different BC mosaic patterns, recombination always occurred with subtype B in *env*. On the contrary, these strains could be representing a founder effect event, deriving from a common recombinant ancestral that went through different evolution process and subsequent recombination.

The epidemiological data of the individuals enrolled in this analysis revealed that while subtype B epidemic follows the national tendency [Boletim Epidemiológico AIDS, 2007] for the general population with a male/female ratio of 2:1, the subtype F and F recombinants showed the opposite (sex ratio = 1:1.8) with 68% (19 against 9) of the infected patients being women (Table I). Also, almost 80% were infected heterosexually. These observations suggest an association between subtype F infection and heterosexual transmission (OR = 5.4; 95% CI 0.8756–34.6853) as reported previously [Rios et al., 2005]. The higher prevalence of women in the subtype F epidemic compared to subtype B epidemic coincides with the later introduction of the former in Brazil at the same time that the heterosexual transmission became more frequent. In contrast, the subtype B epidemic started in Brazil when the most common route of transmission of HIV was the homosexual contact followed by the intravenous drug users.

Five different patterns of subtypes B and F recombination between *gag* and *env* were identified, suggesting that HIV-1 inter-subtype recombination is occurring very frequently in this area. Among these recombinants, 18 samples shared the same breakpoint in *gag*. However, they presented different genotypes in *env*, meaning that (1) they can be the result of different recombination patterns or (2) they shared a common ancestry at some point. Other reports [Carr et al., 2001; Thomson et al., 2002; Quarleri et al., 2004; Sanabani et al., 2006] have described the co-circulation of BF recombinants with different genetic structures but presenting breakpoints at the same or at a very close position in the genome. This suggests the occurrence of hot spots for recombination in the HIV genome. In fact,

the initial region of *gag* seems to represent one of these hot spots since besides the recombinants identified in this cohort (position 1398 relative to HXB2), other unique BF recombinants [Carr et al., 2001; Thomson et al., 2002; De Sa Filho et al., 2005; Sanabani et al., 2006] as well as the CRF12 from Argentina (position 951) [Thomson et al., 2002], CRF28 and CRF29 (position 1322) [De Sa Filho et al., 2006] from Brazil presented crossover around these genome portions.

Two of the BF recombinants described previously (01BR226 and 02BR33) [Sanabani et al., 2006] grouped together with 11 of the new recombinants in both *gag* and *env* phylogenies (Fig. 3). This suggests that they shared common ancestries in both subtypes but as they present different breakpoints, they derived from distinct process of recombination. The same happened for two recombinants from Bahia (155 and 414), which fell in the same group of CRF28 and CRF 29 sequences. Eleven recombinants of this cohort sharing the same breakpoint in *gag* clustered in a monophyletic cluster apart from the CRF28/29 group pointing to different recombination origins. All recombinants of this group that have available *env* sequences, but one, also fell into a monophyletic group in both *env* tree and *gag/env* concatenated tree. These sequences were unrelated to CRF12. Taken together, these observations represent evidences that a new CRF is circulating in Bahia with a significant prevalence of 6.3%. Since the genetic distances of this group (6.6% and 15.3% in *gag* and *env*, respectively) are very similar to the intra-subtype distances, an early emergence and spread of these recombinants are also speculated. However, to confirm this hypothesis, studies involving their complete genome are needed. In addition, the *env* subtype B sequences of these recombinants clustered together with all subtype B sequences from Bahia described previously. This indicates that a main subtype B strain is present in the state and that it is unrelated to the subtype B strain that originated CRFs 28 and 29.

The presence of an F<sub>gag</sub>/D<sub>env</sub> recombinant HIV-1 in Brazil is reported in this study. Interestingly, the subtype D sequence (Fig. 3) did not cluster with the other subtype D sequences identified so far in the country [Guimarães et al., 2002; Couto-Fernandez et al., 2006] nor with the other subtype D sequences from Africa used as reference. However, its F part was related to other sequences from Brazil. Thus, this recombinant was likely generated locally around 10 years ago (diagnosis on 1998, Table I). These data also show that subtype D was introduced more than once in Brazil.

In conclusion, the HIV epidemic in Bahia is marked by a high genetic variability degree, with subtypes B, F, and D and their related recombinant forms being co-circulating. Subtype F was strongly related to heterosexually infected females. Similar to what has been observed for Brazilian southeastern region, variants with different recombination patterns between subtypes B and F, including a potentially new CRF, are present in the northeastern. An increased prevalence of these variants was detected in this geographic area. As

the genetic and antigenic variability of HIV-1 represent a major challenge for the development of globally effective HIV vaccine, the understanding of the mechanisms driving these processes is crucial.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Elisabeth Deliege Vasconcelos and Mr. Patrick Younan for editing and revising this manuscript, respectively.

## REFERENCES

- Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. 2006. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1-infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41:338–341.
- Boletim Epidemiológico AIDS. Ano XVI n° 01. Available at <http://www.aids.gov.br>. Access on July 2007.
- Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM. 2005. Evaluation of a modified version of heteroduplex mobility assay for rapid screening of HIV-1 isolates in epidemics characterized by mono/dual clade predominance. *J Virol Methods* 124:123–134.
- Burke DS, McCutchan FE. 1996. Global distribution of human immunodeficiency virus type 1 clades. In: DeVita VT, Hellman L, Jr., Rosenberg SA, AIDS: Biology, diagnostics, treatment and prevention. 4th edition. New York: Lippencott-Raven Publishers, pp. 119–126.
- Cabral VP, Cunha CB, Magalhaes EF, Pinto-Neto LF, Couto-Fernandez JC, Dietze R, Morgado MG, Ribeiro-Rodrigues R. 2006. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espirito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 881–885.
- Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, Salomon H, Hierholzer J, Watanaveeradej V, Pando MA, Negrete M, Russell KL, Sanchez J, Birx DL, Andrade R, Vinales J, McCutchan FE. 2001. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 15:F41–F47.
- Casado G, Thomson MM, Sierra M, Najera R. 2005. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19\_cpx) in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40:532–537.
- Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, Galvao-Castro B. 1999. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: A city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 22:288–293.
- Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, Oliveira SM, Arakaki-Sanchez D, Chequer PJ, Morgado MG. 2005. 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* 100:73–78.
- Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, Morgado MG. 2006. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: Tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:207–211.
- De Sa Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, Janini LM. 2005. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:145–151.
- De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Casiero MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. 2006. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:1–13.
- Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, Mullins JI. 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 *env* genes. *Science* 262:1257–1261.
- Dourado I, Milroy CA, Mello MA, Ferraro GA, Castro-Lima Filho H, Guimarães ML, Morgado MG, Teixeira MG, Barreto ML, Galvão-Castro B. 2007. HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 23: 25–32.

- Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. 2007. Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio De Janeiro State, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:303–308.
- Guimarães ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvão-Castro B, Morgado MG. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. 2002. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:1261–1269.
- Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, Coppens S, Vereecken K, De Witte K, Van Rempelbergh R, Kahindo M, Morison L, McCutchan FE, Carr JK, Albert J, Essex M, Goudsmit J, Asjö B, Salminen M, Buvé A, van Der Groen G. 2000. Simplified strategy for detection of recombinant HIV-1 group M isolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. *J Virol* 74:363–370.
- Kunanusont C, Foy HM, Kreiss JK, Rerks-Ngarm S, Phanuphak P, Raktham S, Pau CP, Young NL. 1995. HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. *Lancet* 345:1078–1083.
- Mccutchan FE, Viputtigul K, De Souza MS, Carr JK, Markowitz LE, Buapunth P, McNeil JG, Robb ML, Nitayaphan S, Birx DL, Brown AE. 2000. Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:801–805.
- Monteiro JP, Ferraro GA, Oliveira T, Goldani LZ, Kashima S, Alcantara LC, Morgado MG, Bou-Habib DC, Galvão-Castro B. 2007. Genetic and biologic characterization of HIV type 1 subtype C isolates from south Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:135–143.
- Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B. 2002. HIV-1 polymorphism: A challenge for vaccine development—A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:143–150.
- Nicholas KB, Nicholas HB, Jr., Deerfield DW, II. 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNET News* 4:1–4.
- Page RD. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357–358.
- Pedroso C, Queiroz AT, Alcântara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N, Brites C. 2007. High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a north-east state of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45:251–253.
- Pereira GA, Stefani MM, Araujo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg* 71:679–684.
- Posada D, Krandall KA. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818.
- Quarleri JF, Rubio A, Carobene M, Turk G, Vignoles M, Harrigan RP, Montaner JS, Salomón H, Gómez-Carrillo M. 2004. HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: Descriptive analysis from 284 patients under treatment failure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:1100–1107.
- Rios M, Fernandez J, Jaramillo P, Paredes V, Sanchez JL, Laguna-Torres VA, Carr JK, Ramirez E. 2005. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Chile: Differential geographic and transmission route distribution of B and F subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:835–840.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:1423–1425.
- Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC. 2006. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F, and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 6:368–377.
- Swofford D. 1999. PAUP 4.0: 1999. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), 4.0b2a. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA A4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D. 1997. The CLUSTAL X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882.
- Thomson MM, Delgado E, Herrero I, Villahermosa ML, Vázquez-de Parga E, Cuevas MT, Carmona R, Medrano L, Pérez-Alvarez L, Cuevas L, Nájera R. 2002. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 83:107–119.
- Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Najera R. 2005. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18\_cpx) of Central African origin in Cuba. *AIDS* 19:1155–1163.
- Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S. 1994. The molecular epidemiology of HIV in Asia. [Retraction of Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S. In: *AIDS* 2001 Mar 9;15(4):545]. *AIDS* 8:S13–S28.

## 4.2 Análises Complementares

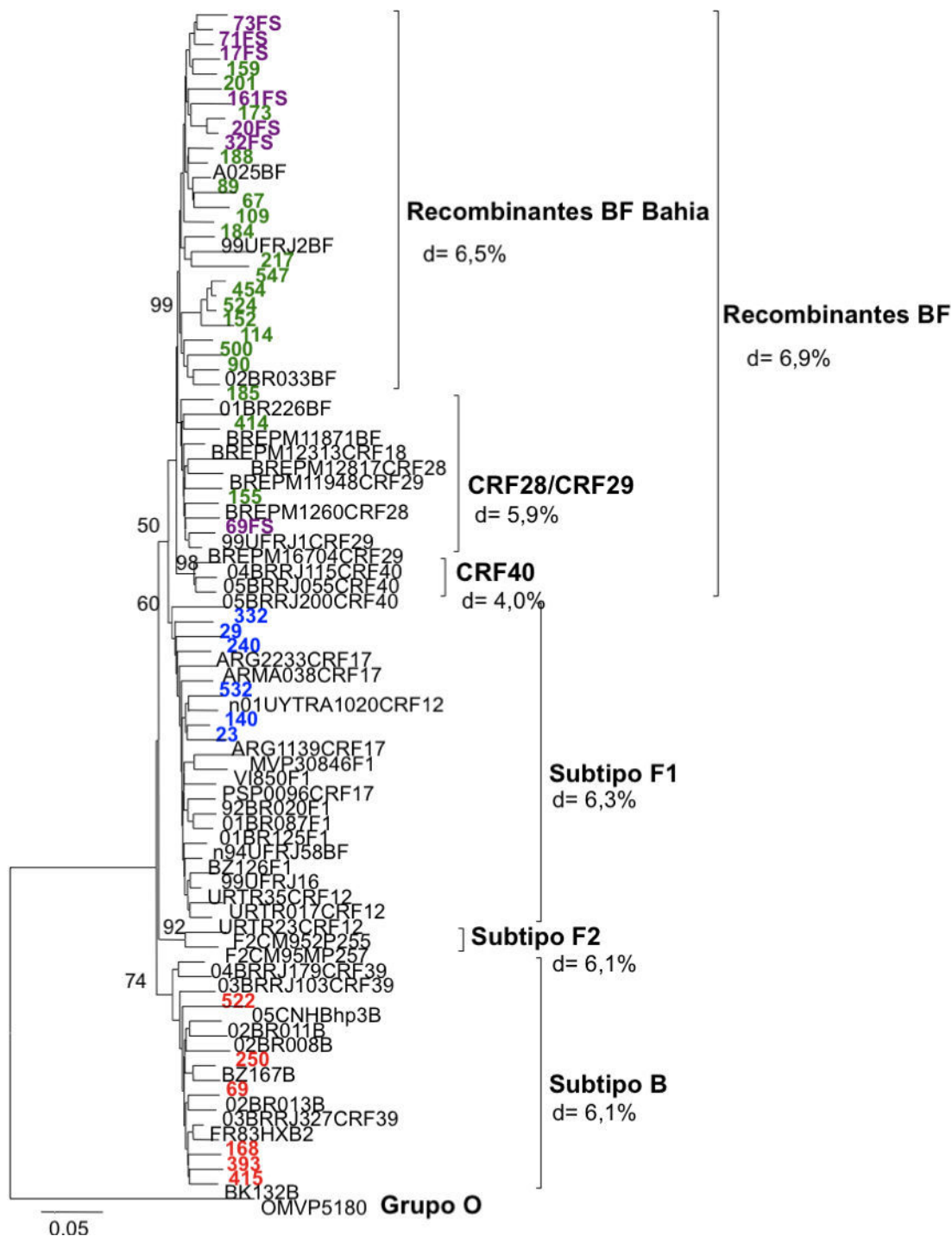
### *4.2.1 Relações filogenéticas entre isolados de HIV-1 recombinantes BF provenientes de duas distintas populações do estado da Bahia: Salvador e Feira de Santana.*

Um outro projeto de pesquisa atualmente em andamento no LASP, coordenado pelo Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara revelou (dados não publicados), através de estudos de filogenia do gene *pol* (Apêndice B, Figura B.1) de isolados de HIV-1 provenientes do Centro de Referência em Doenças Sexualmente Transmissíveis (CDST/HIV/AIDS) da cidade de Feira de Santana, Bahia, a ocorrência de um padrão de agrupamento monofilético muito similar ao observado nas análises do gene *gag* para os recombinantes BF descritos anteriormente (Figura 1 no artigo e Apêndice A, Figura A.1.). Ainda, análises de recombinação das seqüências de *pol* dos 12 isolados que formaram tal grupo monofilético (Apêndice B, Figura B.2) mostraram que estas amostras representavam vírus recombinantes entre os subtipos B e F com o ponto de recombinação estimado entre as posições 2554 e 2585 em relação ao genoma do HXB2 (seqüência de referência do Banco de Dados de Los Alamos).

Com base nas informações acima, e com o objetivo de comparar os padrões de recombinação dos dois grupos populacionais, seqüências de *gag* de 7 dos 12 recombinantes de Feira de Santana foram geradas e submetidas à novas análises filogenéticas. Para esta análise, um alinhamento foi gerado contendo as seqüências geradas no presente estudo, bem como, seqüências obtidas no Banco de Dados de Los Alamos, de outros recombinantes BF previamente descritos como as CRFs 12, 17, 28, 29, 39 e 40, além de seqüências não-recombinantes dos subtipos B, D, F1 e F2. A reconstrução filogenética (Figura 4.2.1.1) foi feita com base no método NJ, utilizando-se o modelo de substituição de nucleotídeos GTR +I +G.

Nesta análise, um grande grupo foi formado pelos recombinantes das duas populações da Bahia, além de seqüências das CRFs 28, 29 e 40. Dentro deste agrupamento, que ficou separado dos grupos do subtipo B, F1 e F2, observaram-se 3 sub-clados: (1) formado por 17 seqüências BF da primeira população estudada (Salvador), 6 seqüências BF

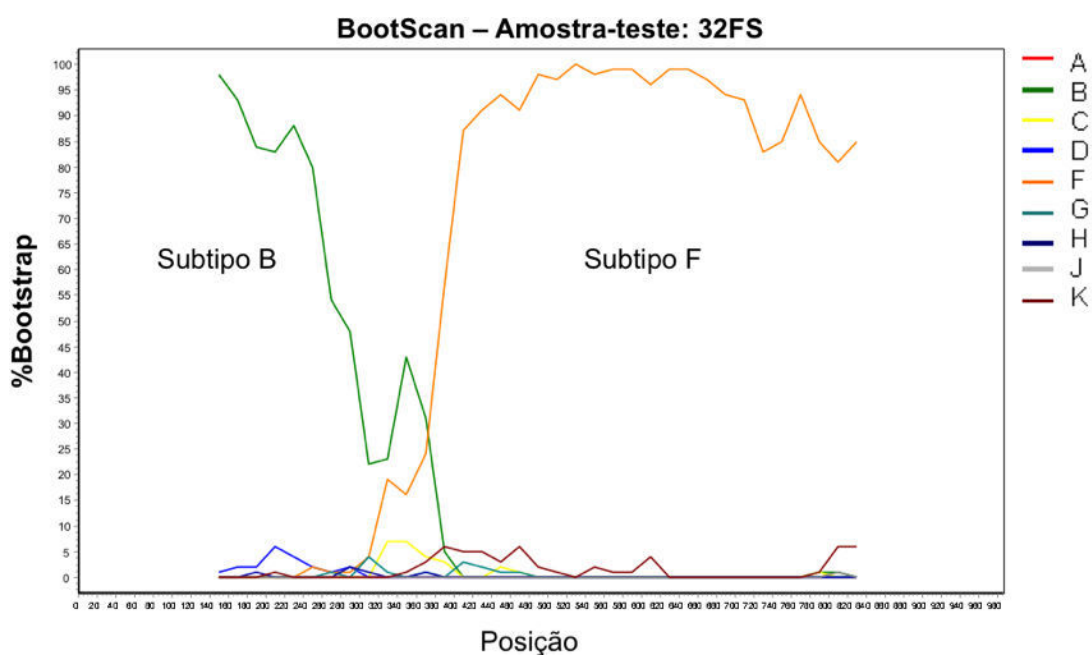
da segunda população estudada (Feira de Santana) e quatro recombinantes caracterizados previamente (SANABANI et al., 2006; THOMSON et al., 2002, 2004); (2) formado por todas as seqüências da CRF28 e da CRF29, duas seqüências da primeira população (155 e 414) e uma seqüência da segunda população (69FS); (3) formado pela CRF40. Dentro do primeiro subclado, a topologia monofilética formada pelas seqüências 114, 152, 454 e 524, observada em todas as análises anteriores, se repetiu nesta nova análise com um valor de Bootstrap igual a 99. A distância média entre estas quatro seqüências, calculada através do método Kimura-2-parâmetros disponível no programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007), foi de 3,3%, enquanto as distâncias médias dentro dos agrupamentos dos subtipos puros e grupos recombinantes variaram entre 5,9% a 6,5%. As distâncias genéticas dos agrupamentos são mostradas na árvore. As seqüências da CRF12 e da CRF17 ficaram dentro do grupo F1 e as seqüências da CRF39 ficaram dentro do grupo B.



**Figura 4.2.1.1:** Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando as relações filogenéticas dos diferentes padrões de recombinação entre os subtipos B e F dentro das seqüências de *gag*. Uma seqüência do grupo O (OMVP5180) foi usada como grupo externo. O modelo de substituição de nucleotídeo GTR+I+G foi utilizado. Os valores de "bootstrap" para 1000 réplicas estão indicados nos ramos. As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: vermelho = subtipo B, azul = subtipo F, verde = recombinantes BF da população 1 (Salvador) e roxo = recombinantes BF da população 2 (Feira de Santana).

Em seguida, as novas seqüências de *gag* dos recombinantes BF oriundos de Feira

de Santana foram submetidas às análises de recombinação. Na análise realizada no programa SIMPLOT (SALMINEN ET AL., 1995), a recombinação genética entre os subtipos B e F foi confirmada em todos os 7 vírus de Feira de Santana. Entre eles, 5 (17FS, 20FS, 32FS, 71FS e 73FS) apresentaram um perfil bastante similar, com o ponto de recombinação variando entre as posições 1357 a 1400 no genoma do HXB2 (Figura 4.2.1.2). Uma análise mais refinada do possível ponto de recombinação destas amostras foi realizada através da procura de assinaturas de nucleotídeos e aminoácidos subtipo-específicas (utilizando-se o programa GENEDOC) e através da partição do alinhamento em sub-alinhamentos e da subsequente reconstrução filogenética dos mesmos. A análise comparativa das assinaturas de nucleotídeos e aminoácidos entre os subtipos puros B e F1 e as seqüências recombinantes mostrou que o ponto de recombinação estaria localizado entre as posições 1357 a 1398 no genoma HXB2. A outra seqüência (69FS) apresentou ponto de recombinação em uma posição mais anterior no genoma HXB2, que foi estimada entre 1198 e 1210.



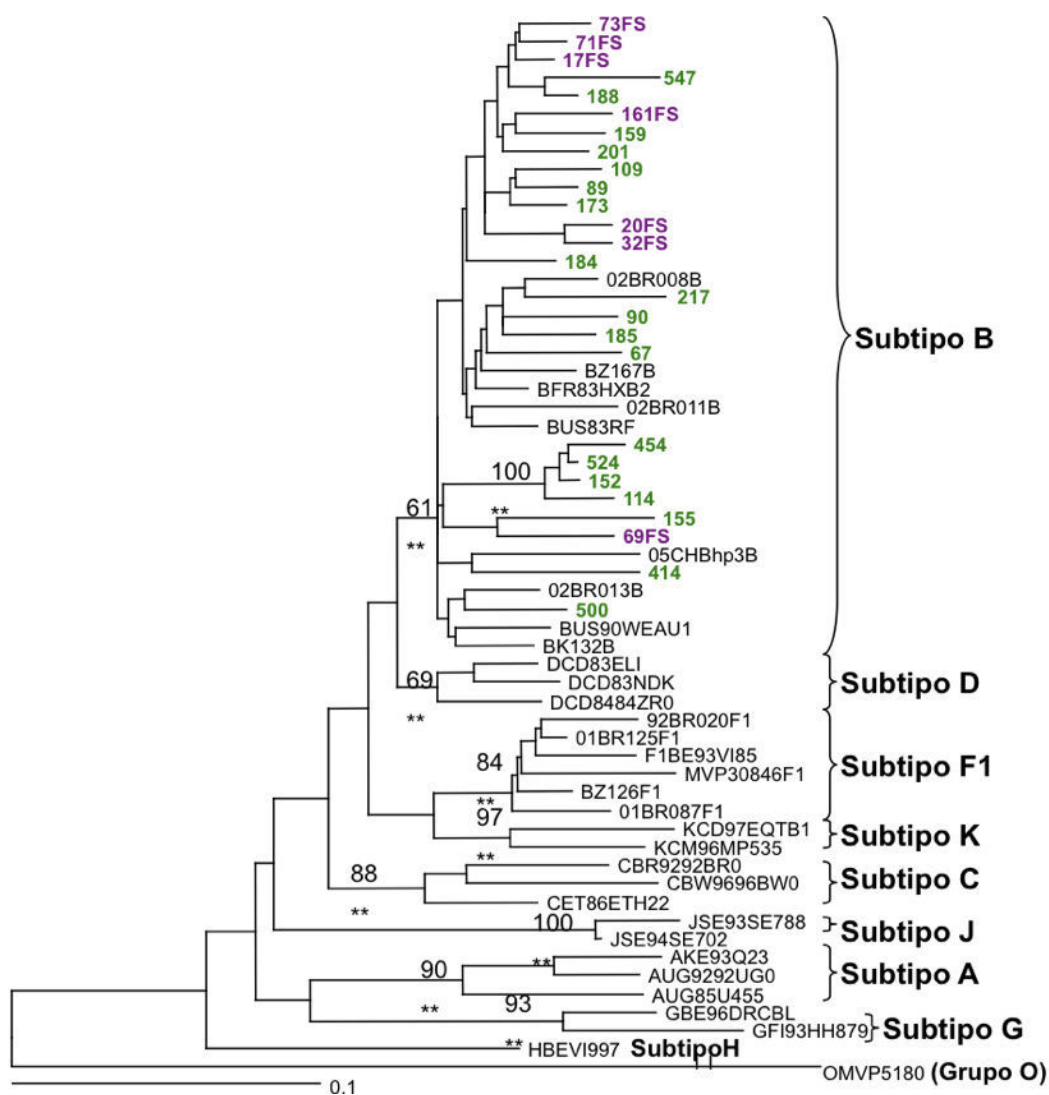
*Segmento: 350 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining*

**Figura 4.2.1.2:** As seqüências do gene *gag* de isolados de Feira de Santana que não agruparam dentro dos subtipos de referência foram submetidas às análises de recombinação no programa SIMPLOT (SALMINEN et al., 1995) A figura representa a análise Bootscanning de uma das amostras (32FS) mostrando o padrão de recombinação entre os subtipos B e F dentro de *gag*.

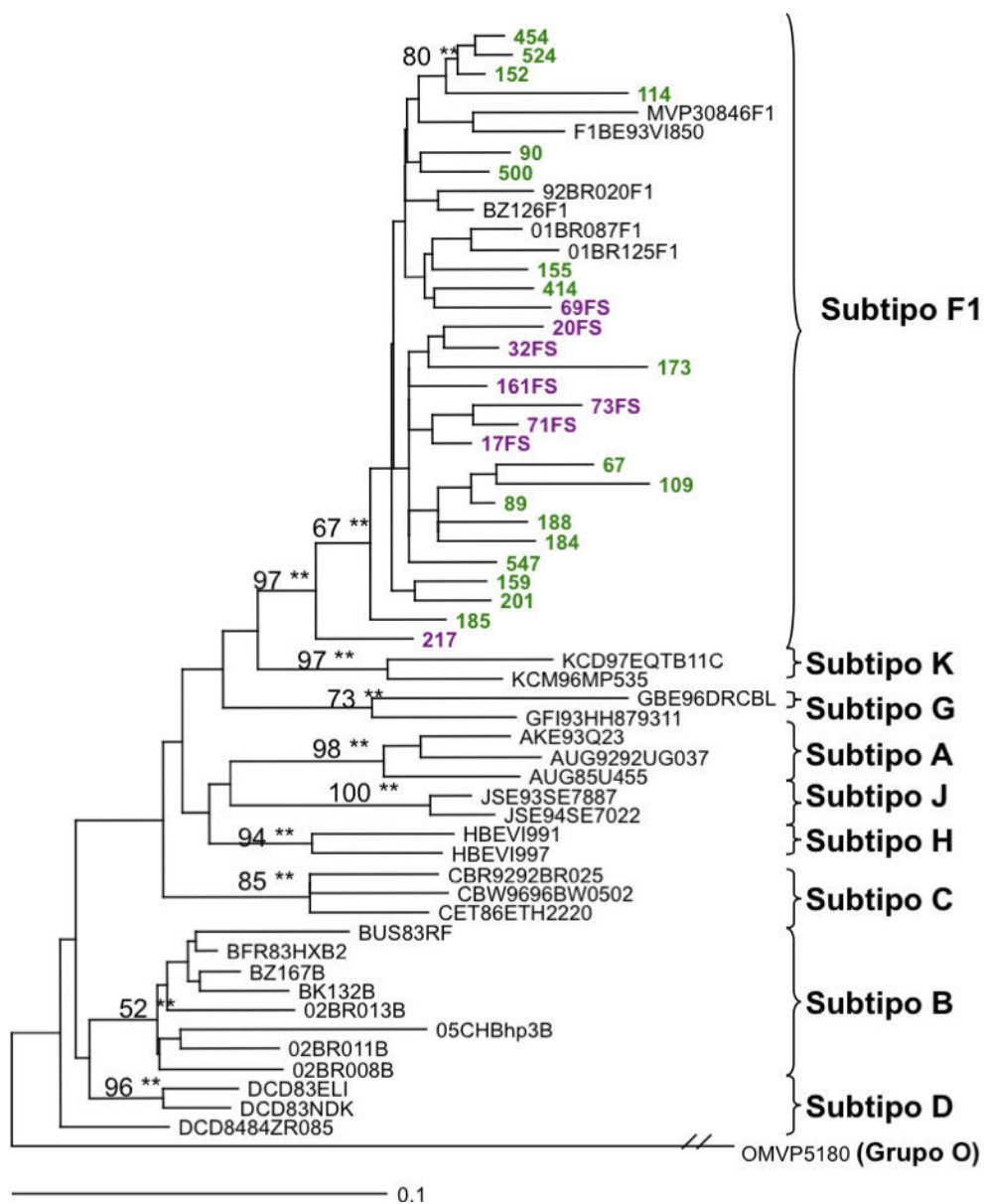
O alinhamento das seqüências de *gag* foi separado na posição 1398 gerando dois

novos sub-alinhamentos, os quais foram submetidos à reconstruções filogenéticas com base no método NJ e ML (Figura 4.2.1.3). As análises dos fragmentos de subtipos B (sub-alinhamento inicial) e F (sub-alinhamento final) separadamente confirmaram os resultados de recombinação obtidos no Bootscanning. A topologia monofilética formada pelas seqüências 114, 152, 454 e 524 foi observada em ambas as árvores com valores de Bootstrap igual a 100 (sub-alinhamento inicial) e 80 (sub-alinhamento final).

*gag* nt 952-1397





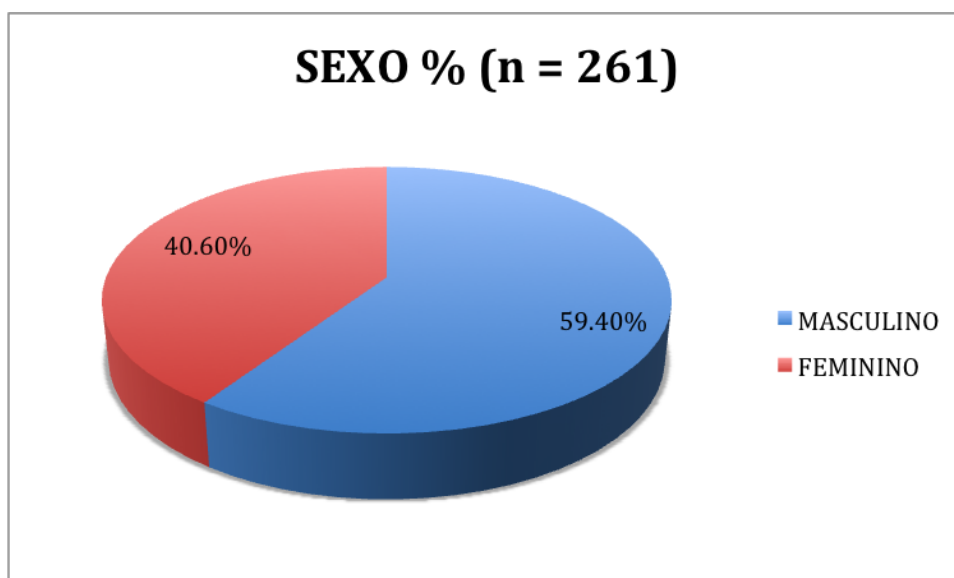
***gag* nt 1398-1958**

**Figura 4.2.1.3:** Isolados recombinantes BF circulantes na população do estado da Bahia. As seqüências foram fragmentadas no ponto de recombinação e os segmentos (nucleotídeos 952 -> 1397 e 1398 -> 1958 em relação ao HXB2) foram submetidos à análises NJ junto com seqüências de referencia do banco de Los Alamos usando os modelos de substituição de nucleotídeos F81uf+I+G e TRN+I+G respectivamente. Os valores de Bootstrap para 1000 réplicas estão indicados. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de  $p < 0,001$ . As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: verde = recombinantes BF da população 1 (Salvador) e roxo = recombinantes BF da população 2 (Feira de Santana).

#### 4.2.2 Perfil epidemiológico dos pacientes

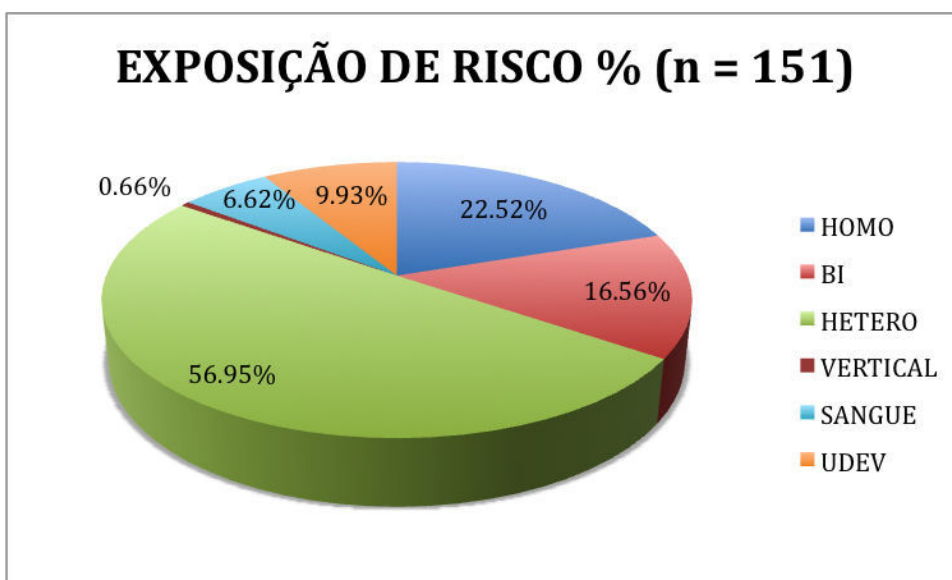
Para a realização deste estudo de caracterização molecular do HIV-1 no estado da Bahia, foram estudadas 261 amostras de sangue total provenientes de indivíduos infectados pelo HIV-1 acompanhados pela Rede de carga viral e contagem de CD4<sup>+</sup> do HUPES. Através da montagem de um Banco de Dados, estes indivíduos foram categorizados de acordo com o sexo, a exposição de risco, faixa etária e cor/raça.

Quanto à distribuição por sexo, 155 (59,40%) são do sexo masculino e 106 (40,60%) (Figura 4.2.2.1). A razão de sexo (M:F) foi igual a 1,46:1.



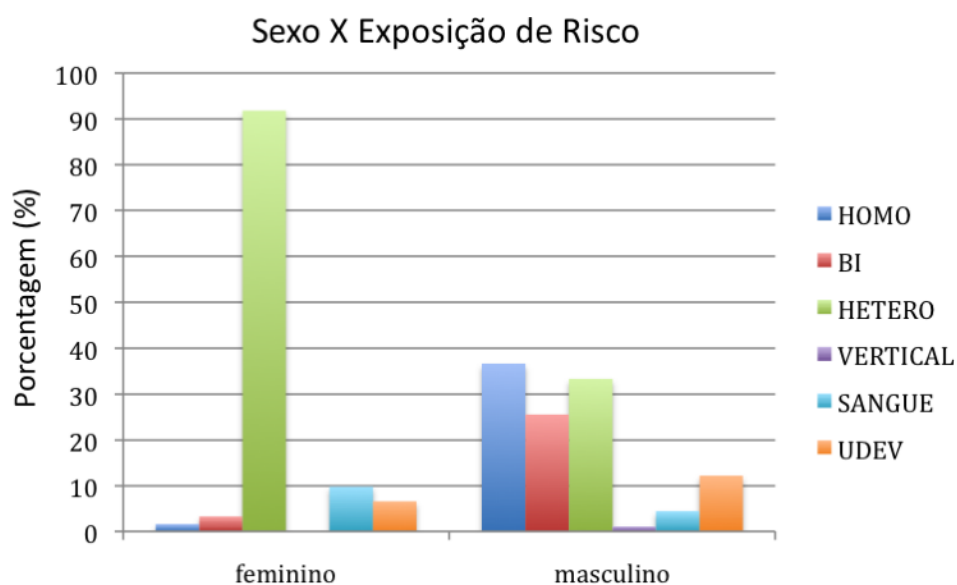
**Figura 4.2.2.1:** Distribuição dos 261 indivíduos estudados de acordo com o sexo.

Informações sobre a exposição de risco estiveram disponíveis para 151 indivíduos (Figura 4.2.2.2). Destes, vinte (13,25%) indivíduos consideraram-se dentro de mais de uma categoria. Oitenta e seis (56,95%) indivíduos reportaram comportamento heterossexual, 34 (22,52%) reportaram comportamento homossexual e 25 (16,56%) reportaram comportamento bissexual. Um (0,66%) indivíduo relatou transmissão vertical, 10 (6,62%) relataram transfusão de sangue e 15 (9,93%) relataram o uso de drogas endovenosas (UDEV). Cento e dez (42,15%) dos 261 indivíduos não deram informações sobre a possível rota de transmissão.



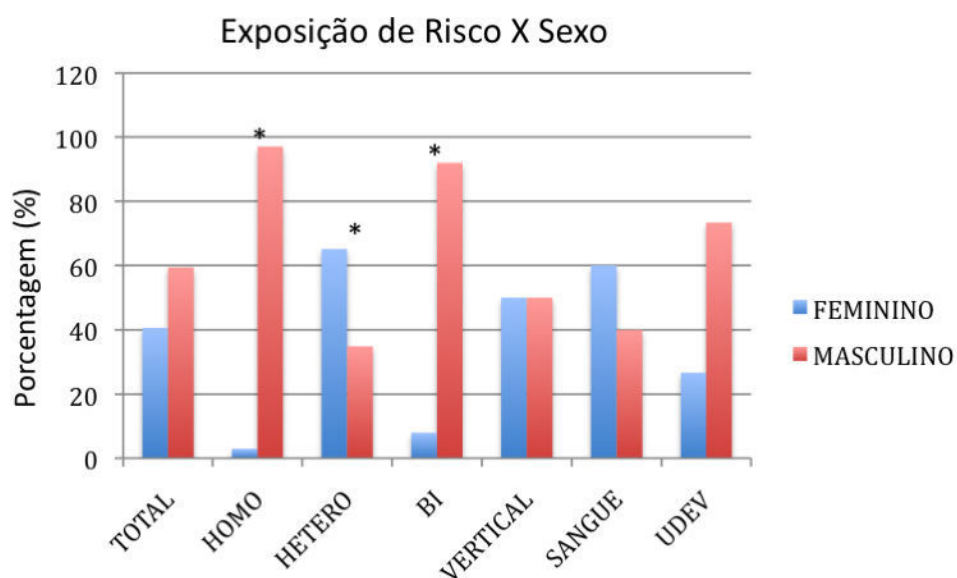
**Figura 4.2.2.2:** Distribuição dos indivíduos estudados de acordo a categoria de exposição de risco.

Entre as 61 mulheres que forneceram informações (Figura 4.2.2.3), 56 (91,80%) relataram comportamento heterossexual, duas (3,28%) relataram comportamento bissexual e uma (1,64%) relatou comportamento homossexual. Seis mulheres (9,84%) relataram transfusão de sangue e quatro (6,56%) relataram ser UDEV. Nenhuma mulher relatou transmissão vertical como possível via de transmissão do vírus. Entre os homens, 90 indivíduos informaram sobre a possível via de transmissão. Trinta (33,33%) declararam-se heterossexuais, 23 (25,56) declararam-se bissexuais e 33 (36,67) declararam-se homossexuais. Um (1,11%) indivíduo relatou transmissão vertical, quatro (4,44%) relataram transfusão de sangue e 11 (12,22%) relataram ser UDEV.



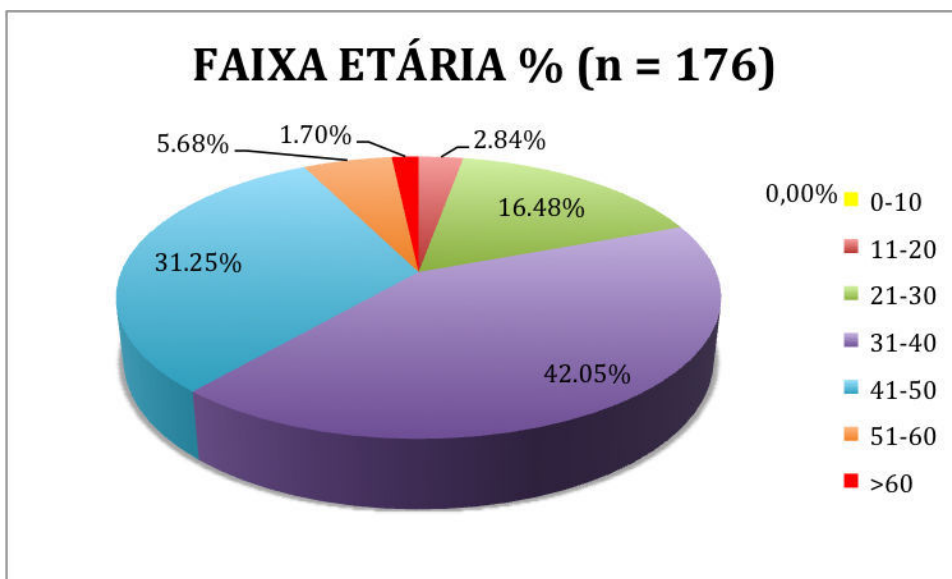
**Figura 4.2.2.3:** Prevalência das categorias de exposição de risco nos sexos feminino e masculino separadamente. A via heterossexual foi o modo de transmissão mais freqüente entre as mulheres (91,80%) enquanto a via homossexual foi o mais freqüente entre os homens (36,67%).

Considerando-se o total das infecções ocorridas pela via heterossexual ( $n = 86$ ) (Figura 4.2.2.4), as mulheres foram as mais atingidas ( $n = 56$ ; 65,12%), enquanto que, das infecções ocorridas pelas vias homossexual ( $n = 34$ ) e bissexual ( $n = 25$ ), os homens foram os mais afetados ( $n = 33$ ; 97,06% e  $n = 23$ ; 92% respectivamente). Devido ao número limitado de infecções relacionadas às demais exposições de risco, não se puderam observar diferenças estatisticamente significativas entre os sexos.



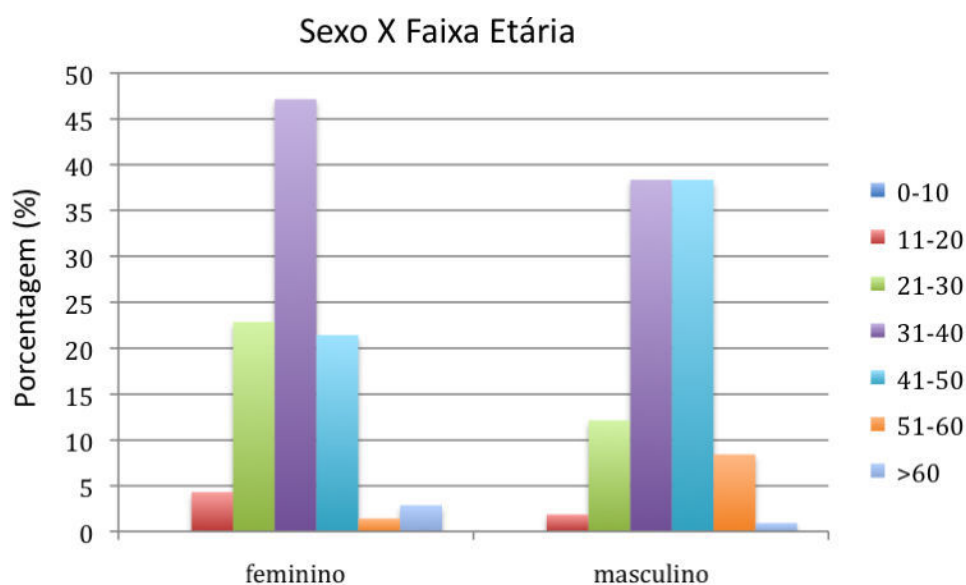
**Figura 4.2.2.4:** Prevalência dos sexos feminino e masculino nas diferentes exposições de risco separadamente. As mulheres foram as mais atingidas nas infecções por via heterossexual enquanto que os homens foram mais prevalentes entre as infecções pelas vias homossexual e bissexual. \*  $p < 0,05$ .

Com relação à idade (Figura 4.2.2.5), foram obtidas informações de 176 pacientes. Cinco (2,84%) indivíduos tinham entre 11-20 anos, 29 (16,48%) tinham entre 21-30 anos, 74 (42,05%) tinham entre 31-40 anos, 55 (31,25%) tinham entre 41-50 anos, 10 (5,68%) tinham entre 51-60 anos e 3 (1,70%) tinham mais de 60 anos. Nenhum dos indivíduos tinha menos de 10 anos. A idade média desta população foi de aproximadamente 38 anos. Oitenta e cinco (32,57%) dos 261 pacientes não preencheram informação sobre idade.



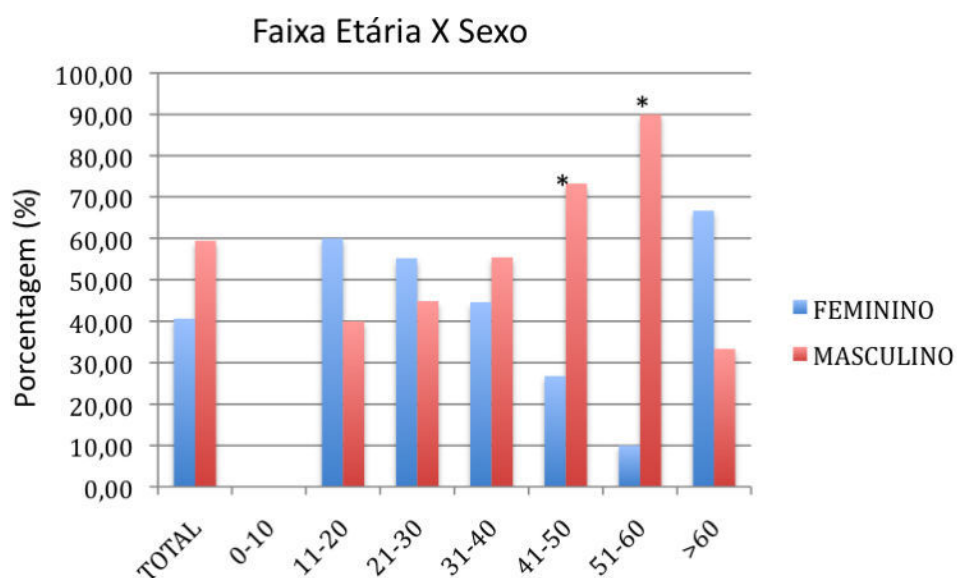
**Figura 4.2.2.5:** Distribuição dos indivíduos estudados de acordo a faixa etária. Os indivíduos foram categorizados em sete diferentes grupos: 0-10 anos, 11-20 anos, 21-30 anos, 31-40 anos, 41-50 anos, 51-60 anos e >60 anos.

Entre as 70 mulheres que informaram a idade (Figura 4.2.2.6), três (4,29%) tinham entre 11-20 anos, 16 (22,86%) tinham entre 21-30 anos, 33 (47,14%) tinham entre 31-40 anos, 15 (21,43%) tinham entre 41-50 anos, um (1,43%) tinha entre 51-60 anos e 2 (2,86%) tinha mais de 60 anos. A média de idade na população feminina foi de aproximadamente 35 anos. Cento e sete homens informaram a idade. Dois (1,87%) tinham entre 11-20 anos, 13 (12,15%) tinham entre 21-30 anos, 41 (38,32%) tinham entre 31-40 anos, 41 (38,32%) tinham entre 41-50 anos, nove (8,41%) tinha entre 51-60 anos e um (0,93%) tinha mais de 60 anos. A média de idade na população masculina foi de 40 anos.



**Figura 4.2.2.6:** Prevalência das faixas etárias nos sexos feminino e masculino. Os indivíduos foram categorizados em sete diferentes grupos: 0-10 anos, 11-20 anos, 21-30 anos, 31-40 anos, 41-50 anos, 51-60 anos e >60 anos.

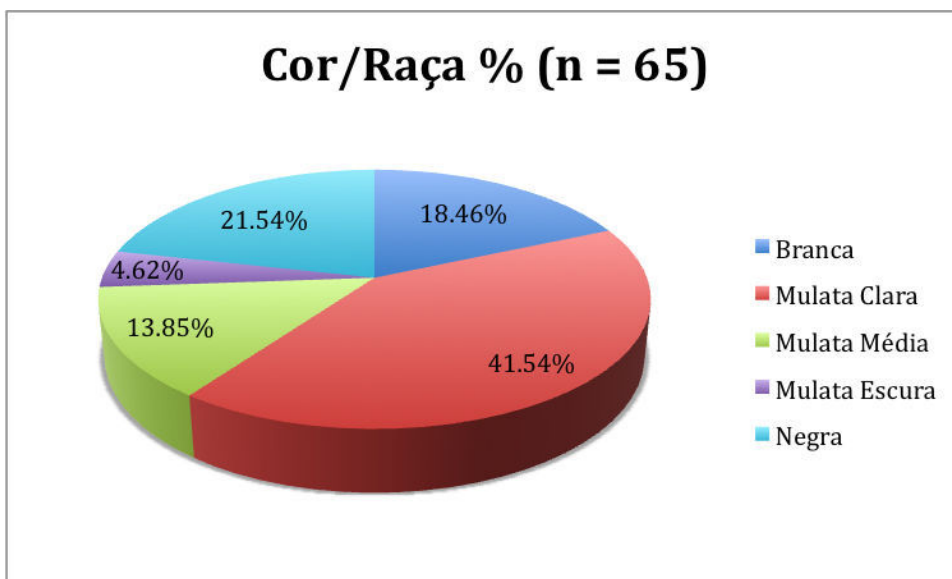
Com relação as prevalências dos sexos nas diferentes faixas etárias (Figura 4.2.2.7), as mulheres representaram a maioria das infecções nas faixas 11-20 anos ( $n = 3/5$ ; 60,00%), 21-30 anos ( $n = 16/29$ ; 55,17%) e >60 anos ( $n = 2/3$ ; 66,67%), entretanto, dado o número limitado de representantes nestas faixas de idade, estas diferenças não foram significativas. Por outro lado, os homens foram mais prevalentes nas faixas 31-40 anos ( $n = 41/74$ ; 55,41%), 41-50 anos ( $n = 41/56$ ; 73,21%) e 51-60 anos ( $n = 9/10$ ; 90,00%), sendo que, as diferenças entre as prevalências de sexos observadas nestas duas últimas categorias, foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.2.2.7:** Prevalência dos sexos feminino e masculino nas diferentes faixas etárias. Os indivíduos foram categorizados em sete diferentes grupos: 0-10 anos, 11-20 anos, 21-30 anos, 31-40 anos, 41-50 anos, 51-60 anos e >60 anos. \*  $p < 0,05$ .

Durante o preenchimento dos formulários, apenas 65 (24,90%) dos 261 pacientes declararam a sua cor/raça. Dentre eles, doze (18,46%) pacientes consideraram-se da cor/raça branca, 27 (41,54%) consideraram-se da cor/raça mulata clara, nove (13,85%) consideraram-se da cor/raça mulata média, três (4,62%) consideraram-se da cor/raça mulata escura e 14 (21,54%) consideraram-se da cor/raça negra (Figura 4.2.2.8).





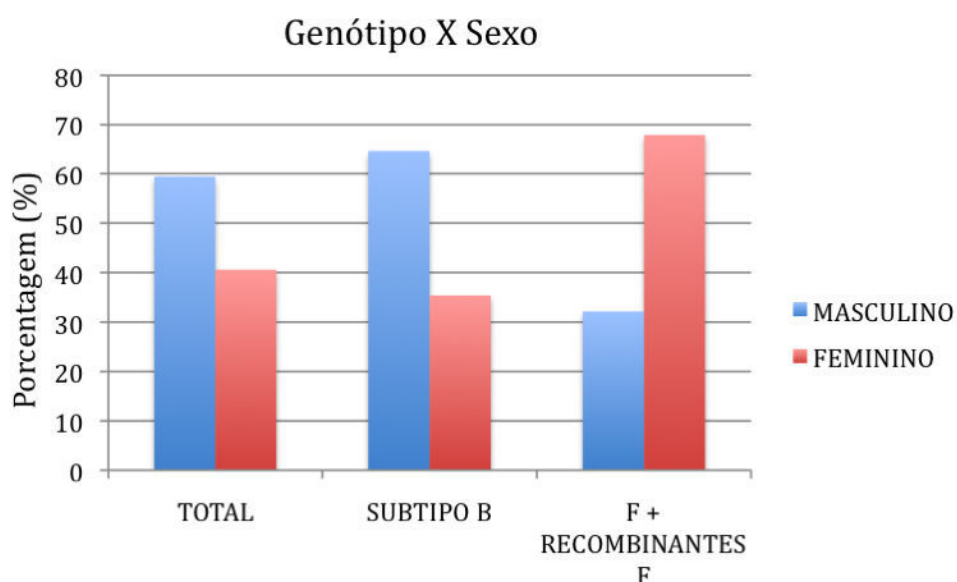
**Figura 4.2.2.8:** Distribuição dos indivíduos estudados de acordo a cor/raça. Apenas 65 (25%) dos 261 indivíduos tinham informação disponível

Através da consulta dos prontuários médicos destes pacientes, foi possível identificar a origem de 135 dos indivíduos envolvidos no estudo, enquanto que 126 não informaram a sua naturalidade. Sessenta e seta deles (49,63%) foram provenientes da capital do estado, Salvador e 57 (42,22%) vieram de diversos municípios da Bahia como Feira de Santana, Valença, Nazaré, Ilhéus, Itapé, Santo Antônio de Jesus, Várzea do Poço, Rui Barbosa, Cachoeira, Coração de Maria, Santo Estevão, Anguera, entre outros. Onze (8,15%) indivíduos eram naturais de outros estados brasileiros: um (0,74%) do Mato Grosso, um (0,74%) da Paraíba, três (2,22%) de Pernambuco, dois (1,48%) do Rio de Janeiro e quatro (2,96%) de São Paulo.

#### 4.2.3 Associações entre os subtipos de HIV-1 e variáveis epidemiológicas

Uma investigação mais detalhada das possíveis associações entre diferentes genótipos de HIV-1 e variáveis epidemiológicas foi realizada. As variáveis sexo, exposição de risco e faixa etária foram estratificadas dentro de três diferentes grupos: população total, indivíduos infectados como subtipo B e indivíduos infectados com o subtipo F ou recombinantes do subtipo F. Nesta análise, foram consideradas os 175 indivíduos que tiveram isolados virais caracterizados em ambas as regiões *gag* e *env*.

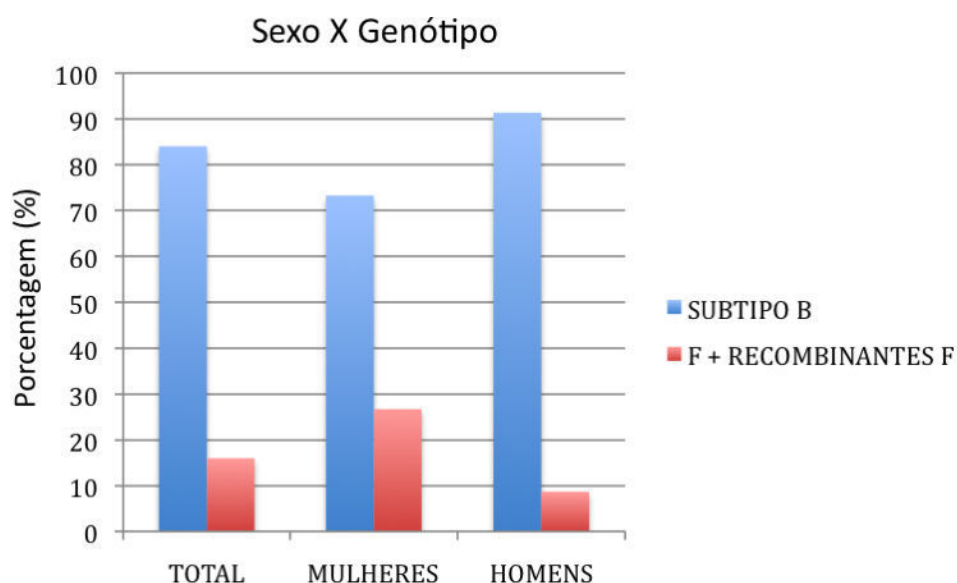
Com relação ao sexo (Figura 4.2.3.1), quando avaliamos a população total e somente as pessoas infectadas com o subtipo B, o sexo masculino foi o mais prevalente, representando 59,43% (104) e 64,63% (95) respectivamente. Contrariamente, quando avaliamos a população infectada com o subtipo F e recombinantes F, as mulheres representaram cerca de 70% (19) das infecções ( $\chi^2 = 10.293$ ,  $p = 0.001$ , OR= 3.86, 95% Intervalo de confiança (IC): 1.52 a 10.33). A razão de sexo (M:F) foi igual a 1,8:1 na epidemia de subtipo B e 1:2 na epidemia de subtipo F.



**Figura 4.2.3.1:** Prevalências de homens e mulheres nas sub-epidemias dos subtipos B e F do HIV-1 na Bahia. O sexo masculino prevaleceu na epidemia de subtipo B enquanto o sexo feminino prevaleceu na epidemia de subtipo F ( $\chi^2 = 10.293$ ,  $p = 0.001$ , OR= 3.86, Intervalo de confiança (IC) 95%: 1.52 a 10.33).

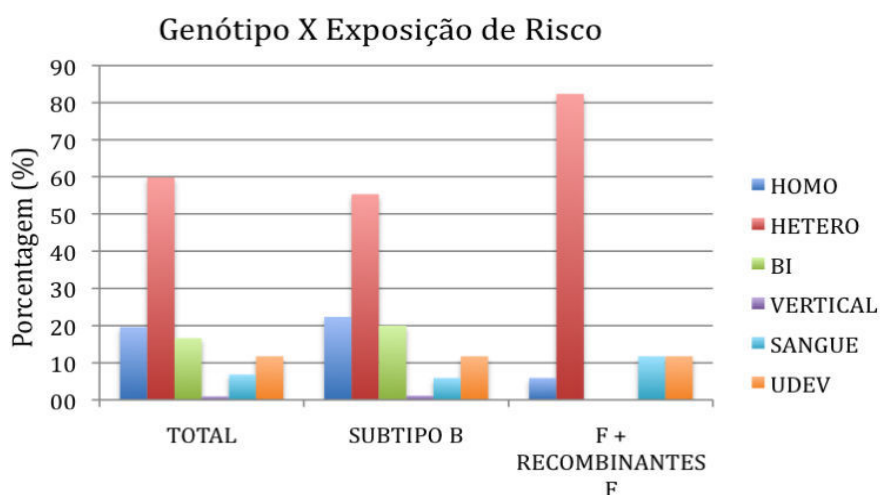
Considerando-se as populações feminina e masculina separadamente, assim como

para a população total, o subtipo B predominou em ambas (91,35% e 73,24% respectivamente). Entretanto, uma porcentagem maior de mulheres estava infectada com o subtipo F (26,76%) em relação aos homens (8,65%) ( $\chi^2 = 10.293$ ,  $p = 0.001$ , OR = 3,86 95% IC: 1,52 a 10,33).



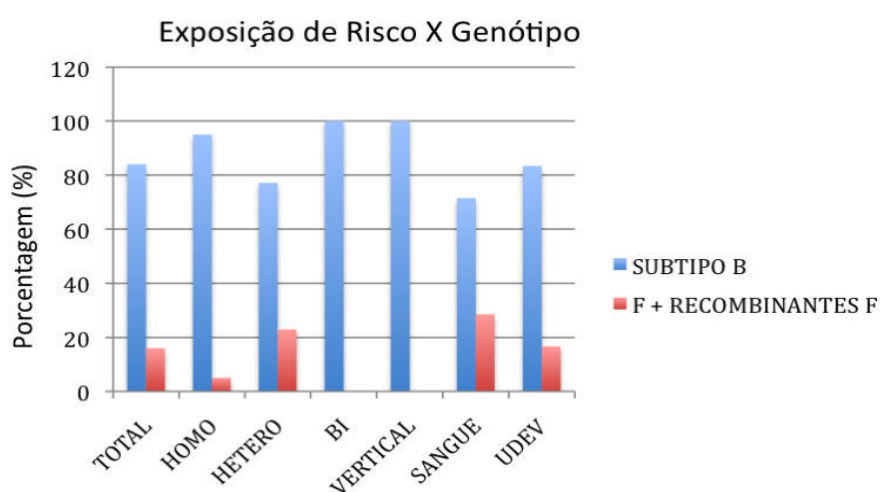
**Figura 4.2.3.2:** Prevalência dos genótipos B e F do HIV-1 nas populações feminina e masculina separadamente. Uma porcentagem maior de mulheres estava infectada com o subtipo F em relação aos homens ( $\chi^2 = 10.293$ ,  $p = 0.001$ , OR= 3.86, Intervalo de confiança (IC) 95%: 1.52 a 10.33).

Analisando-se os genótipos versus as exposições de risco (Figura 4.2.3.3), e considerando-se os indivíduos que prestaram informação a este respeito, a transmissão heterossexual foi o comportamento de risco mais prevalente em ambos os grupos, entretanto, na epidemia do subtipo B a transmissão heterossexual foi responsável por 55,29% das infecções e na epidemia do subtipo F, esta via representou 82,35% ( $p = 0.033$ , OR = 5.4, 95% IC: 0.8756 a 34.6853). Ao contrário, 22,35% dos indivíduos infectados com o subtipo B relatou o comportamento homossexual como via de transmissão enquanto que este número foi de 5,88% entre os infectados com o subtipo F, entretanto, este resultado não teve valor de  $p$  significativo. O comportamento bissexual foi reportando apenas entre indivíduos infectados com o subtipo B (20,00%) ( $p = 0.050$ ). Não foi observada diferença significativa entre as prevalências de subtipos nas demais categorias de exposição.



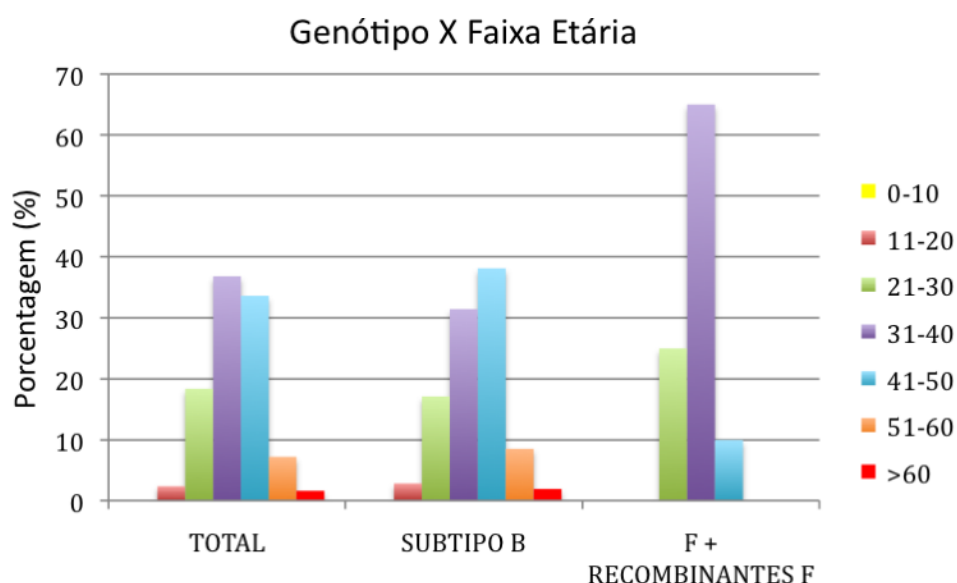
**Figura 4.2.3.3:** Estratificação dos indivíduos de acordo com genótipo de HIV e exposição de risco ( $\chi^2 = 11.484$ , DF = 5,  $p = 0.043$ ).

Embora o subtipo B tenha sido prevalente em todas as categorias de exposição de risco isoladamente (Figura 4.2.3.4), dentre todas as infecções ocorridas através da via heterossexual, de transfusão sanguínea e entre usuários de drogas injetáveis uma maior proporção (22,95%, 28,57% e 16,62%, respectivamente) foi causada por vírus do subtipo F/ recombinantes F em comparação com aquelas ocorridas através da via homossexual (5,00%). O subtipo F não esteve presente nas as infecções associadas ao comportamento bissexual e à transmissão vertical.



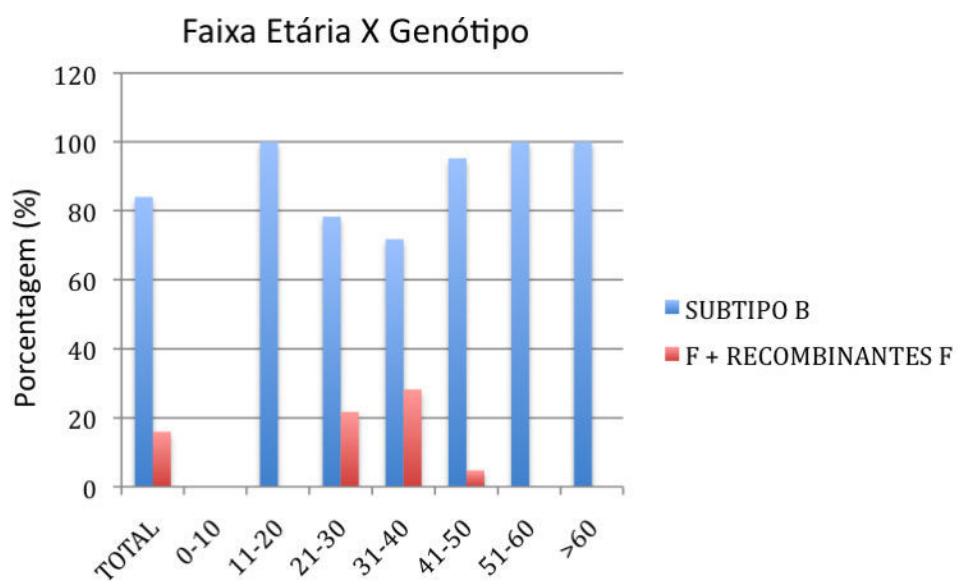
**Figura 4.2.3.4:** Prevalência dos genótipos B e F do HIV-1 nas diferentes categorias de exposição de risco ( $\chi^2 = 11.484$ , DF = 5,  $p = 0.043$ ).

A análise do genótipo versus faixa etária (Figura 4.2.3.5) revelou que na população infectada com o subtipo B, a maioria, 38,10% (40) tinha entre 41 e 50 anos, 2,86% (3) tinha entre 11-20 anos, 17,14% (18) tinha entre 21-30 anos, 31,43% (33) tinha entre 31 e 40 anos, 8,57% (9) tinha entre 51-60 anos e 1,90% (2) tinha mais de 60 anos. Quarenta e dois indivíduos não informaram a idade. A média de idade entre indivíduos infectados com o subtipo B foi aproximadamente 39 anos. Entre os indivíduos infectados com vírus do subtipo F ou recombinantes contendo seqüências F, 25,00% (5) tinha entre 21-30 anos, 65,00% (13) tinha entre 31 e 40 anos e 10,00% (2) tinha entre 41 e 50 anos. Nenhum indivíduo infectado com o subtipo F tinha mais de 60 ou menos que 20 anos. Oito indivíduos não informaram a idade. A média de idade entre indivíduos infectados com o subtipo F foi aproximadamente 35 anos.



**Figura 4.2.3.5:** Estratificação dos indivíduos de acordo com genótipo de HIV e faixa etária ( $\chi^2 = 12.322$ , DF =5,  $p = 0.031$ ).

Considerando-se as sete categorias de faixa etária individualmente (Figura 4.2.3.6), o subtipo B foi o mais prevalente em todas, entretanto, o subtipo F foi mais prevalente entre indivíduos com 21-30 anos (21,74%) e 31-40 anos (28,26%) do que entre aqueles com idade maior que 40 anos (3,77%) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.2.3.6:** Prevalência dos genótipos B e F do HIV-1 nas diferentes faixas etárias ( $\chi^2 = 12.322$ , DF =5,  $p = 0.031$ ). O subtipo B foi o mais prevalente em todas as idades, entretanto, o subtipo F teve maior representatividade entre os indivíduos com idade entre 21-40 anos em comparação com indivíduos com mais de 40 anos ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A caracterização do genótipo do HIV-1 representa uma ferramenta importante para estudos de epidemiologia, uma vez que contribui para a avaliação das mudanças na epidemia de AIDS e para o melhor entendimento sobre os fatores determinantes do processo de evolução viral. Além disto, este tipo de estudo tem grande importância para a escolha e desenvolvimento adequados de políticas públicas. A diversidade genética e distribuição do HIV-1 está bem caracterizada para as regiões Sul e Sudeste do Brasil, entretanto, poucos esforços foram feitos neste sentido para a caracterização das demais regiões brasileiras. O objetivo deste estudo foi o de avaliar a epidemiologia molecular do HIV-1 no estado da Bahia. A Bahia é o quarto estado mais populoso do Brasil com cerca de 14 milhões de habitantes. Até junho de 2008, cerca de 14.198 casos de AIDS foram notificados no estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A técnica de HMA foi utilizada para classificar os subtipos de 261 amostras HIV-1-positivas uma vez que tem sido descrita como sendo um método eficiente para estudos de larga escala (CABRAL et al., 2006; PEREIRA et al., 2004; RIOS et al., 2005; STEFANI et al., 2007). Entretanto, nossos resultados mostraram uma proporção significativa (84,4%) de divergência entre este método e o seqüenciamento do DNA quando 32 amostras de subtipo F e recombinantes contendo seqüências F foram analisadas (Apêndice A: Tabela A.1). Estes resultados contrastantes podem ser atribuídos à capacidade limitada do HMA em distinguir os recombinantes BF intragênicos, uma vez que 19 deles foram identificados como subtipo B ou subtipo F. Desta forma, a utilização do HMA pode não ser apropriada para identificar os genótipos do HIV-1 em regiões onde diferentes subtipos co-circulam e onde a presença de vírus recombinantes é esperada. Dentro deste contexto, Buonaguro e colaboradores (2005) propuseram uma versão modificada do HMA na qual ao invés de usá-lo para a classificação do subtipo, a técnica é utilizada para filtrar isolados de HIV-1 divergentes da cepa local predominante. Nesta proposta, as amostras são testadas apenas contra a amostra de referência daquele subtipo predominante. Ainda com relação às técnicas utilizadas para a identificação dos subtipos de HIV-1, deve-se considerar ainda a existência de uma elevada variabilidade genética do HIV-1 causada em grande parte pela alta taxa de erro na adição de nucleotídeos e pela ocorrência de recombinação genética resultando na presença de populações distintas (quasispécies) em um único indivíduo infectado (COFFIN, 1995, GOODENOW et al., 1989). Considerando-se o fato de que estas técnicas (PCR/ Seqüenciamento) podem selecionar

variantes e que as seqüências das amostras foram obtidas a partir de PBMCs (DNA proviral), os dados apresentados, podem não estar refletindo necessariamente as cepas circulantes.

Das 175 amostras estudadas, 84% foi subtipo B, 2,3% subtipo F, 13,1% recombinantes BF e 0,6% (uma amostra) recombinante F/D. O subtipo C não esteve presente nesta amostra. Entretanto, na análise de *pol* de 58 amostras provenientes de Faria de Santana (Apêndice B), uma delas foi classificada como subtipo C, mostrando que este subtipo está presente no estado. Entretanto, se além das 175 amostras, as demais 86 (total 261) que foram caracterizadas em apenas uma região genômica fossem consideradas, a prevalência dos genótipos seria: 88,9% B, 1,5% F, 0,4 D e 9,2% BF, refletindo um aumento da porcentagem de subtipos puros e uma diminuição da de vírus recombinantes. Ao contrário, quando se analisa duas regiões genômicas distintas, a prevalência de subtipos puros diminui e a de vírus recombinantes aumenta. Estes resultados demonstram a importância de se estudar mais de uma região do genoma do HIV-1 para fins de estudos de prevalência de subtipos.

As diferenças nas prevalências dos genótipos B e BF entre o presente estudo e dados anteriores (92% e 5,5% respectivamente, COUTO-FERNANDEZ et al., 1999) podem ser atribuídas a dois diferentes fatores: (1) um aumento local na circulação de recombinantes BF e/ou (2) uma subestimação prévia da real prevalência destas variantes uma vez que uma única região genômica foi analisada naquele estudo. Por outro lado, ambos os resultados dos estudos atual (2,3%) e prévio (1,6%) reportaram a menor prevalência no estado da Bahia do subtipo F puro comparado com suas formas recombinantes BF. A prevalência de 2,3% de subtipo F encontrada neste trabalho foi também menor do que as prevalências registradas na região Sudeste do Brasil, as quais variaram entre 3,7% e 9 % (BARRETO et al., 2006; CABRAL et al., 2006; COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; DE SA FILHO et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2002). Somando-se a isto, diferentes relatos anteriores baseados em estudos envolvendo amostras de HIV-1 do Brasil e da Argentina (BARRETO et al., 2006; CARR et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2002; QUARLERI et al., 2004; THOMSON et al., 2002) mostraram que a maioria delas caracterizadas primeiramente como subtipo F em uma região genômica era de fato recombinante BF no genoma total, sugerindo que a ocorrência da forma pura do subtipo F é rara. Este fato poderia estar relacionado com a existência de vantagens evolutivas nos isolados recombinantes sobre as cepas puras do subtipo F, entretanto, estudos mais direcionados se fazem necessários a fim de esclarecer esta questão. Neste contexto, dos 23 vírus recombinantes identificados na população acompanhada no HUPES e entre os cinco diferentes padrões encontrados, 19 foram subtipo B em *env*, o que poderia ser uma indicação da existência de pressão seletiva para a manutenção do subtipo B



no envelope viral. Suportando esta hipótese, um estudo prévio (DE SA FILHO et al., 2005) mostrou que entre cinco diferentes padrões de recombinação entre os subtipos B e F, todos tiveram subtipo B no envelope e, ainda, em um outro estudo do grupo de pesquisas do LASP (MONTEIRO et al., 2007) reportou que de três diferentes padrões de recombinação entre os subtipos B e C, todos apresentaram o subtipo B em *env*. Por outro lado, CRFs contendo seqüências B ao longo do genoma, como a CRF12 (THOMSON et al., 2002), a CRF31 (SANTOS et al., 2006) e a CRF38 (RUCHANSKY et al., 2009), não apresentaram subtipo B no envelope. Contrariamente, estas variantes podem ser resultantes de um efeito fundador, derivadas de um ancestral comum que sofreu diferentes processos evolutivos e recombinação subsequente.

Os cinco padrões de recombinação entre os subtipos B e F nas regiões *gag* e *env* foram encontrados nas nossas análises sugerem que estes eventos estão ocorrendo muito freqüentemente nesta região do país. Entre estas variantes, 18 amostras tiveram ponto de recombinação na mesma região de em *gag*. Entretanto, como em *env* eles apresentaram genótipos distintos, como é o caso de duas amostras que tiveram subtipo F (524) e B” (109), estes recombinantes podem (1) ser o resultado de eventos distintos de recombinação ou (2) compartilharam um ancestral recombinante comum em algum ponto, porém seguiram processos evolutivos distintos e sofreram recombinação subsequente. Outros relatos (CARR et al., 2001; QUARLERI et al., 2004; SANABANI et al., 2006; THOMSON et al., 2002) também descreveram a co-circulação de recombinantes BF com estruturas genéticas distintas, porém apresentando pontos de recombinação na mesma posição ou em posições muito próximas no genoma viral. Isso sugere ocorrência de “hotspots” para recombinação no genoma do HIV. De fato, a região inicial de *gag* parece ser um destes “hotspots” pois além dos recombinantes identificados aqui, os quais possuem ponto de recombinação estimado na posição 1398 em relação ao HXB2, outros recombinantes BF únicos (CARR et al., 2001; DE SA FILHO et al., 2005; SANABANI et al., 2006; THOMSON et al., 2002) assim como a CRF12 da Argentina (THOMSON et al., 2002), na posição 951, e a CRF 28 e a CRF29 do Brasil (DE SA FILHO et al., 2006), na posição 1322, apresentam ponto de recombinação também nesta porção do genoma.

Para melhor caracterizar as relações intra-subtipo dos vírus circulantes nesta população e analisar as relações entre os recombinantes BF identificados e outros previamente descritos, topologias filogenéticas foram reconstruídas utilizando-se seqüências de referência dos subtipos B, F e D e outras seqüências de subtipo puro ou recombinantes da América do Sul. Árvores filogenéticas foram reconstruídas a partir das seqüências de *gag* e *env* (Apêndice

A, Figura A.3) e de ambas as regiões concatenadas (Apêndice A, Figura A.4). Onze dos recombinantes BF identificados no presente estudo, os quais compartilharam o mesmo ponto de recombinação em *gag*, formaram um grupo monofilético separado do grupo formado pelos recombinantes BF das CRF28 e CRF29 (Apêndice A, Figura A.3a), o que aponta para diferentes origens entre estes dois grupos. Todos estes onze recombinantes BF que tiveram seqüências *env* disponíveis, também formaram um grupo monofilético na árvore do fragmento do envelope (Apêndice A, Figura A.3b) e na árvore das seqüências concatenadas (Apêndice A, Figura A.4) e em todas as árvores este grupo esteve separado do grupo monofilético formado por todas as seqüências da CRF28 e da CRF29 (as quais compartilham o mesmo ponto de recombinação em *gag*) e por dois dos recombinantes identificados no presente estudo (155 e 414). Este grupo de seqüências também não foi relacionado com a CRF12. Em conjunto, estas observações representam evidência de que uma nova CRF está circulando na Bahia com uma prevalência significativa estimada em 6,3%. Ainda, desde que as distâncias genéticas deste grupo são similares às distâncias intra-subtipos, nós podemos especular que a ocorrência e disseminação destas variantes não são recentes. Entretanto, para confirmar esta hipótese estudos envolvendo a caracterização do genoma completo se fazem necessários. Em adição, as seqüências *env* do subtipo B destes recombinantes agruparam junto com todas as demais seqüências do subtipo B previamente encontradas na Bahia. Isso sugere que a epidemia de subtipo B no estado é representada na sua maioria por variantes derivadas de um ancestral comum que difere do ancestral B que deu origem às CRFS 28 e 29 do sudeste do país.

Quando sete seqüências de recombinantes BF detectados em pacientes acompanhados no Centro de Referência em Doenças Sexualmente Transmissíveis (CDST/HIV/AIDS) da cidade de Feira de Santana, Bahia foram incluídas nas análises de *gag*, 6 agruparam junto com o novo grupo de recombinantes identificado acima (Figura 4.2.1.1). Este grupo ficou separado das sequencias das CRFs BF previamente descritas no país: CRF12, CRF17, CRF28, CRF29, CRF39 e CRF40. A seqüência do sétimo vírus (69FS), agrupou junto com o grupo da CRF28 e 29 e com as amostras 155 e 414, repetindo a topologia verificada para as árvores anteriores. Quando se investigou o perfil de recombinação destes vírus (Figura 4.2.1.2), verificou-se que estes apresentavam um padrão muito semelhante àquele observado para os recombinantes identificados em Salvador. Este fato somado à localização do ponto de recombinação no genoma HXB2 sugere que estas variantes são representantes de um mesmo evento de recombinação e que se encontram amplamente disseminadas nesta região do país. Estes dados apontam para a necessidade de

estudos que contemplem a caracterização do genoma completo das mesmas a fim de se obter um perfil mais fidedigno da epidemiologia molecular local do HIV-1.

A seqüência *env* do subtipo D identificada nesta coorte ficou dentro do grupo de referência, entretanto, esta seqüência não se mostrou relacionada com as demais seqüências de subtipo D já identificadas no Brasil assim como com nenhuma outra seqüência africana incluída como referência. Apesar disto, sua porção *gag* do subtipo F agrupou próxima de outras seqüências F do Brasil. Estes dados indicam que este evento de recombinação ocorreu no país há pelo menos cerca de 10 anos desde que o diagnóstico do paciente ocorreu em 1998 e que o subtipo D foi introduzido mais de uma vez no país. Este foi o primeiro relato de um recombinante F/D no Brasil. Este isolado apresenta também uma estrutura genética diferente daquela observada em recombinantes F/D provenientes da Bélgica, os quais são subtipo D em *gag* e subtipo F em *env* (LAUKKANEN et al., 2000).

Levando-se em conta a característica de mutabilidade constante do HIV, o monitoramento contínuo do perfil epidemiológico e molecular da epidemia de HIV/AIDS representa um elemento crucial para o desenho, avaliação e manutenção de medidas de controle locais. No intuito de contribuir neste sentido, a população infectada acompanhada no HUPES foi categorizada de acordo com as variáveis epidemiológicas sexo, exposição de risco, idade e cor/raça.

A razão de sexo (M:F) nesta população foi igual a 1,46:1, bastante similar à razão de 1,5:1 da epidemia nacional de AIDS publicada pelo Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2008) para 2002, ano em que as amostras estudadas foram coletadas. Esta razão, comparada com aquelas observadas no início da década de 1980, de 15,8:1 e do início da década de 1990, de 5,4:1, ressalta o incremento marcante de casos entre mulheres e confirma uma tendência que tem sido denominada “feminização” da epidemia.

Após uma primeira fase de maior incidência de casos de AIDS entre adultos homossexuais masculinos no Brasil, seguida por aumento em usuários de drogas injetáveis, tem havido, assim como na epidemia mundial de AIDS, um aumento significativo de casos associados à transmissão heterossexual, tendência chamada de “heterossexualização”. Os resultados apresentados aqui (Figura 4.2.2.2) confirmam esta tendência, uma vez que quase 57% dos casos foram associados a esta via de transmissão, enquanto que o comportamento homossexual foi responsável por cerca de 22% das infecções. Entre as mulheres (Figura 4.2.2.3), as infecções por via heterossexual somaram cerca de 92%, enquanto que entre os homens (Figura 4.2.2.4), esta via representou 33% das infecções, uma diferença estatisticamente significativa, com  $p < 0,001$ . A exposição de risco mais prevalente entre os

homens foi o comportamento homossexual com quase 37% das infecções, seguida pelo comportamento bissexual com 25,5%.

Outra tendência nacional da epidemia de AIDS reportada mais recentemente no país e é o envelhecimento da população infectada. Dados recentes do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2008) revelaram que a taxa de incidência da doença dobrou entre pessoas acima de 50 anos. Entre 1996 e 2006, a incidência de AIDS em pessoas maiores de 50 anos mais que dobrou no País, passando de 7,5 para 15,7 casos por 100 mil habitantes. Nessa faixa etária, 70% dos contaminados são homens. O presente estudo mostra que a epidemia de AIDS na Bahia segue também esta tendência nacional uma vez que 42% dos indivíduos tinha entre 31- 40 anos e 73% tinha mais de 30 anos (Figura 4.2.2.5). A faixa etária predominante entre as mulheres foi a de 31-40 anos que representou quase 50% das infecções (Figura 4.2.2.6). Por outro lado, entre os homens, as faixas etárias 31-40 e 41-50 foram igualmente representadas (38,32%) (Figura 4.2.2.7). Além disto, enquanto que entre as mulheres, os indivíduos com mais de 50 anos representaram 4,29%, este percentual foi de 9,34% entre os homens ( $p < 0,05$ ). Um estudo prévio sobre a epidemia de AIDS na Bahia relatou que a prevalência de HIV entre indivíduos pertencentes à faixa etária acima de 50 anos foi acentuadamente maior no sexo masculino (DOURADO et al., 2007). Estas observações podem estar associadas ao fato de que no início da epidemia, o comportamento homossexual entre indivíduos do sexo masculino foi o principal fator de risco para a infecção pelo HIV.

Apenas 25% dos pacientes tinha informação com relação à cor/raça em seu prontuário médico. Destes, cerca de 60% se considerou mulato, 21,54% negro e 18,46% branco (Figura 4.2.2.8). Devido à falta de informação por parte de 75% dos indivíduos, não se puderam fazer correlações entre esta e as demais variáveis epidemiológicas.

Com relação à origem dos pacientes, esta coorte foi composta de indivíduos naturais de diversas partes da Bahia, incluindo cerca de 50% oriundo da capital Salvador e de 42% de diversos municípios baianos. Assim, os dados apresentados neste estudo podem ser considerados como representativos do estado. Além disto, cerca de 8% dos pacientes eram naturais de outros estados brasileiros, entretanto, residiam na Bahia durante a duração do estudo.

Associações entre os diferentes genótipos de HIV-1 e variáveis epidemiológicas foram investigadas. Cerca de 70% dos indivíduos infectados com o subtipo F e/ou recombinantes BF eram mulheres enquanto que cerca de 65% daqueles infectados com o subtipo B eram homens (Figura 4.2.3.1). As razões de sexo (M:F) foram quase invertidas nestas duas sub-epidemias: 1,8:1 na de subtipo B e 1:2 na de subtipo F. O Boletim

Epidemiológico do Ministério da Saúde do ano de 2008 publicou que a taxa de homem/mulher infectados era de 1,5:1 no ano de 2002. Desta forma, é possível especular que a epidemia de subtipo B na Bahia segue a tendência nacional da razão homem/mulher, enquanto que, a epidemia de subtipo F segue uma tendência contrária. Dados similares foram apresentados por Cavalcanti e colaboradores (2007) para amostras representativas de cinco estados da região Nordeste: 81% dos indivíduos infectados com o subtipo B eram homens e 43,3% daqueles infectados com o subtipo F eram mulheres.

Embora a transmissão heterossexual tenha sido a exposição de risco mais prevalente em ambos os grupos genotípicos (Figura 4.2.3.2), a sua representatividade entre indivíduos infectados com o subtipo F/recombinantes BF foi significativamente maior (82%) do que entre aqueles infectados com o subtipo B (54%) ( $p = 0.033$ ). A transmissão por atividade homossexual e bissexual em conjunto foi responsável por cerca de 42% das infecções pelo subtipo B enquanto que este número foi de apenas 6% entre os infectados com o subtipo F. Em conjunto, estas observações sugerem uma associação entre o subtipo F e a transmissão heterossexual. Esta associação foi previamente reportada na Argentina (AVILA et al, 2002; MASCIOTRA et al., 2000) e no Chile (RIOS et al., 2005).

A maior prevalência de mulheres na epidemia de subtipo F coincide com a introdução mais tardia deste subtipo no Brasil (BELLO et al., 2006; LOUWAGIE et al., 1994; MORGADO et al., 1994) em comparação com o subtipo B, ao mesmo tempo em que a transmissão heterossexual se tornou mais freqüente. Em contraste, a epidemia de subtipo B teve início no Brasil quando a rota de transmissão mais freqüente de HIV no Brasil era o comportamento homossexual, seguido pelo uso de drogas injetáveis. O fato de que indivíduos mais jovens (90% tinha entre 20-40 anos) prevalecem na população infectada com o subtipo F em comparação com o subtipo B (Figura 4.2.3.3) ( $p = 0.004$ ), corroboram estas especulações. Por outro lado, investiga-se que esta associação entre transmissão heterossexual e subtipo F poderia estar relacionada com um possível tropismo preferencial de cepas não-B do HIV-1 por células de Langerhan's encontradas na mucosa vaginal (SOTO-RAMIREZ et al., 1996). Ainda neste contexto, um estudo realizado na África do Sul mostrou uma associação do subtipo B com a transmissão homossexual masculina enquanto que o subtipo C esteve associado com a transmissão heterossexual (VAN HARMELEN et l., 1997)

## 6. CONCLUSÕES

Concluimos com nossos resultados que a epidemia de HIV/AIDS na Bahia é marcada por um alto grau de variabilidade genética, onde os subtipos B, F, D e suas formas recombinantes estão co-circulando. A presença de um recombinante F/D foi detectada pela primeira vez no Brasil.

Eventos de recombinação entre os subtipos B e F estão ocorrendo com alta frequência nesta região geográfica. Foi observada uma alta proporção (13,1%) de formas recombinantes entre os subtipos B e F entre as amostras estudadas e a observação de cinco padrões distintos entre elas indica que os eventos estão ocorrendo em elevadas taxas.

A alta proporção de resultados divergentes entre o HMA e as análises filogenéticas das seqüências de DNA demonstram que utilização da técnica HMA para a identificação de subtipos de HIV-1 é inapropriada em regiões onde múltiplos subtipos co-circulam e onde a presença de vírus recombinantes é esperada.

Uma cepa recombinante entre os subtipos B e F predominante, possivelmente uma nova CRF, está presente e amplamente disseminada no estado da Bahia.

As características epidemiológicas dos pacientes mostraram que a epidemia de HIV/AIDS na Bahia segue as tendências epidemiológicas nacionais de feminização, heterossexualização e envelhecimento.

A epidemia de subtipo F na Bahia está marcadamente relacionada com a transmissão heterossexual e com o sexo feminino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, J.H. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, v. 1, p. 6, 2004.

AIKEN, C.; KONNER, J.; LANDAU, N.R.; LENBURG, M.E.; TRONO, D. Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic do-main. **Cell**, v. 76, p. 853-64, 1994.

ALAEUS, A. Significance of HIV-1 Genetic Subtypes. **Scand J Infect Dis**, v. 32, p. 455-463, 2000.

ARENDRUP, M.; NIELSEN, C.; HANSEN, J.E.; PEDERSEN, C.; MATHIESEN, L.; NIELSEN, J.O. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 5, p. 303-7, 1992.

ARIEN, K.K.; ABRAHA, A.; QUINONES-MATEU, M.E.; KESTENS, L.; VANHAM, G.; ARTS, E.J. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. **J Virol**, v. 79, p. 8979-90, 2005.

AVILLA, M.M.; PANDO, M.A.; CARRION, G.; SALOMON, H.; CARRILLO, M.G.; SANCHEZ, J.; *et al.* Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, p. 422-426, 2002.

BALL, S.C.; ABRAHA, A.; COLLINS, K.R.; MAROZSAN, A.J.; BAIRD, H.; QUINONES-MATEU, M.E.; *et al.*, Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. **J Virol**, v. 77, p. 1021-38, 2003.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHARMARET, S.; GRUEST, J.; *et al.* Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868-871, 1983.

BARRÉ-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, p. 31-35, 1996.

BARRETO, C.C.; NISHYIA, A.; ARAUJO, L.V.; FERREIRA, J.E.; BUSCH, M.P.; SABINO, E.C. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 41, p. 338-41,

2006.

BELLO, G.; GUIMARÃES, M.L.; MORGADO, M.G. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infection in Brazil. **AIDS** v. 20, p. 763-768, 2006.

BLACKARD, J.T.; RENJIFO, B.; FAWZI, W.; HERTZMARK, E.; MSAMANGA, G.; MWAKAGILE, D.; *et al.* HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission. **Virology**, v. 287, p. 261-5, 2001.

BLEUL, C.C.; FARZAN, M.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; CLARK-LEWIS, I.; SODROSKI, J.; *et al.* The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV entry. **Nature**, v. 382, p. 829-833, 1996.

BONGERTZ, V.; COSTA, C.I.; SANTOS, V.G.; JOAO FILHO, E.C.; GALVAO-CASTRO, B.; MORGADO, M.G.; Correlation between susceptibility of primary HIV-1 isolates to autologous and heterologous neutralizing antibodies. **AIDS**, v. 11, p. 969-75, 1997.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; OLDSTONE, M.B. Virus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Virol**, v. 68, p. 6103-10, 1994.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; WEI, X.; HORWITZ, M.S.; PEFFER, N.; MEYERS, H.; *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. **Nat Med**, v. 3, p. 205-11, 1997.

BRAATEN, D.; FRANKE, E.K.; LUBAN, J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. **J Virol**, v. 70, p. 3551-60, 1996.

BRINDEIRO, R.M.; DIAZ, R.S.; SABINO, E.C.; MORGADO, M.G.; PIRES, I.L.; BRÍGIDO, L.; *et al.* Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNET): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**, v. 17, p. 1063-1069, 2003.

BUCHBINDER, S.P.; KATZ, M.H.; HESSOL, N.A.; O'MALLEY, P.M.; HOLMBERG, S.D. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. **AIDS**, v. 8, p. 1123-8, 1994.

BUONAGURO, L.; TAGLIAMONTE, M.; TORNESELLO, M.L.; BUONAGURO, F.M. Evaluation of a modified version of Heteroduplex Mobility Assay for rapid screening of HIV-1 isolates in epidemics characterized by mono/dual clade predominance. **J Virol Methods**, v.



124, p.123-34, 2005.

BUONAGURO, L.; TORNESELLO, M.L.; BUONAGURO, F.M. [Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications](#). **J Virol**, v. 81, p. 10209-19, 2007.

BURKE, D.S.; MCCUTCHAN, F.E. Global distribution of human immunodeficiency virus type 1 clades. In: DeVita VT, Hellman LJr., Rosenberg SA (ed). **AIDS: biology, diagnostics, treatment and prevention**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Lippencott-Raven Publishers, p. 119-126, 1996.

BURLAND, T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. **Methods Mol Biol**, v. 132, p. 71-91, 2000.

CABRAL, V.P.; CUNHA, C.B.; MAGALHAES, E.F.; PINTO-NETO, L.F.; COUTO-FERNANDEZ, J.C.; DIETZE, R.; *et al.* Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espirito Santo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 881-5, 2006.

CALVEL, F.; HOGGAN, M.D.; WILLEY, R.L.; STREBEL, K.; MARTIN, M.A.; REPASKE, R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. **J. Virol**. v. 63, p. 1455-59, 1989.

CARIDE, E.; BRINDEIRO, R.; HERTOOGS, K.; LARDER, B.; DEHERTOGH, P.; MACHADO, E.; *et al.* Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. **Virology**, v. 275, p. 107-115, 2001.

CARR, J.K.; AVILA, M.; GOMEZ CARRILLO, M.; SALOMON, H.; HIERHOLZER, J.; WATANAVEERADEJ, V.; *et al.* Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. **AIDS**, v. 15, p. F41-7, 2001.

CASADO, G.; THOMSON, M.M.; SIERRA, M.; NAJERA, R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19\_cpx) in Cuba. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 40, p. 532-7, 2005.

CAVALCANTI, A.M.; LACERDA, H.R.; BRITO, A.M.; PEREIRA, S.; MEDEIROS, D.; OLIVEIRA, S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 785-92, 2007.

CHAN, D.C.; KIM, O.S. HIV entry and its inhibition. **Cell**, v. 93, p. 681-684, 1998.

CHEN, Z.; LUCKAY, A.; SODORA, D.L.; TELFER, P.; REED, P.; GETTIE, A.; *et al.* Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus infected sooty mangabeys. **J Virol**, v. 71, p. 3953-60, 1997.

CHOE, H.; FARZAN, M.; SUN, Y.; SULLIVAN, N.; ROLLINS, B.; PONATH, P.D.; *et al.* The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. **Cell**, v. 85, p. 1135-48, 1996.

CHOE, H.; FARZAN, M.; KONKEL, M.; MARTIN, K.; SUN, Y.; MARCON, L.; *et al.* The orphan seven-transmembrane receptor Apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dual tropic human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 72, p. 6113-6118, 1998.

COCCHI, F.; DEVICO, A.L.; GARZINO-DEMO, A.; ARYA, S.K.; GALLO, R.C.; LUSSO, P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. **Science**, v. 270, p. 1811-5, 1995.

COFFIN, J.M. HIV population dynamics *in vivo*: Implications for genetics variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, v. 267, p. 483-489, 1995.

COHEN EA, SUBBRAMANIAN RA, GOTTLINGER HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 214, p. 219-35, 1996.

COHEN, O.J.; KINTER, A.; FAUCI, A.S. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. **Immunol Rev**, v. 159, p. 31-48, 1997.

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

COLLINS, K.L.; CHEN, B.K.; WALKER, B.D.; BALTIMORE, D. HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. **Nature**, v. 391, p. 397-401, 1998.

CONNOR, R.I.; SHERIDAN, K.E.; CERADINI, D.; CHOE, S.; LANDAU, N.R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. **J Exp Med**, v. 185, p. 621-8, 1997.

CORBET, S.; MULLER-TRUTWIN, M.C.; VERSMISSE, P.; DELARUE, S.; AYOUBA,

A.; LEWIS, J.; *et al.* *env* sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. **J Virol**, v. 74, p. 529-34, 2000.

CORMIER E,G.; PERSUH, M.; THOMPSON, D.A.; LIN, S.W.; SAKMAR, T.P.; OLSON, W.C.; *et al.* Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 5762-5767, 2000.

COUTO-FERNANDEZ, J.C.; MORGADO, M.G.; BONGERTZ, V.; TANURI, A.; ANDRADE, T.; BRITES, C.; *et al.* HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 22, p. 288-293, 1999.

COUTO-FERNANDEZ, J.C.; SILVA-DE-JESUS, C.; VELOSO, V.G.; RACHID, M.; GRACIE, R.S.; CHEQUER-FERNANDEZ, S.L.; *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**, v. 100, p. 73-8, 2005.

COUTO-FERNANDEZ, J.C.; EYER-SILVA, W.A.; GUIMARÃES, M.L.; CHEQUER-FERNANDEZ, S.L.; GRINSZTEJN, B.; DELAPORTE, E.; *et al.* Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, p. 207-11, 2006.

COVAS, D.T.; BISCARO, T.A.; KASHIMA, S.; DUARTE, G.; MACHADO, A.A. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v.19, p. 74-9, 1998.

DAMOND, F.; WOROBEY, M.; CAMPA, P.; FARFARA, I.; COLIN, G.; MATHERON, S.; *et al.* Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, p. 666-72, 2004.

DELWART, E.L.; SHPAER, E.G.; LOUWAGIE, J.; MCCUTCHAN, F.E.; GREZ, M.; RUBSAMEN-WAIGMANN, H.; *et al.* Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 *env* genes. **Science**, v. 262, p. 1257-1261, 1993.

DE MEDEIROS, L.B.; LACERDA, H.R.; CAVALCANTI, A.M.; DE ALBUQUERQUE M.D.E.F. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 845-9, 2006.

DENG, H.; UNUTMAZ, D.; KEWAL-RAMANI, V.; LITTMAN, D.R. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. **Nature**, v. 388, p. 296-300, 1997.

DE SA FILHO, D.J.; SANABANI, S.; DIAZ, R.S.; MUNERATO, P.; BRUNSTEIN, A.; FUSUMA, E.; *et al.* Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in Sao Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21, p.145-51, 2005.

DE SA FILHO, D.J.; SUCUPIRA, M.C.; CASIERO, M.M.; SABINO, E.C.; DIAZ, R.S.; JANINI, L.M. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.22, p. 1-13, 2006.

DE SA-FILHO, D.J.; SOARES, M.; CANDIDO, V.; GAGLIANI, L.H.; CAVALIERE, E.; DIAZ, R.S.; *et al.* HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 24, p. 347-53, 2008.

DE SOUSA, J.D. Pandemic HIV-1: Its Old Origin and Overlooked Mysteries. **AIDS Rev**, v. 11, p. 52, 2009.

DE SOUZA AC, DE OLIVEIRA CM, RODRIGUES CL, SILVA SA, LEVI JE. Short communication: Molecular characterization of HIV type 1 BF pol recombinants from São Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2008 24: 1521-5.

DESCAMPS, D.; COLLIN, G.; LOUSSERT-AJAKA, I.; SARAGOSTI, S.; SIMON, F.; BRUN-VEZINET, F. HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs. **AIDS**, v. 9, p. 977-8, 1995.

DOMS, R.W.; PEIPER, S.C. Unwelcomed Guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry. **Virology**, v. 235, p. 179-190, 1997.

DORANZ, B.; RUCKER, J.; YI, Y.; SMYTH, R.J.; SAMSON, M.; PEIPER, S.C.; *et al.* A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. **Cell**, v. 85, p. 1149-1158, 1996.

DOURADO, I.; MILROY, C.A.; MELLO, M.A.; FERRARO, G.A.; CASTRO-LIMA FILHO, H.; GUIMARÃES, M.L.; *et al.* HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 23, p. 25-32, 2007.

DRAGIC, T.; TRKOLA, A.; THOMPSON, D.A.; CORMIER, E.G.; KAJUMO, F.A.; MAXWELL, E.; *et al.* A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within

the transmembrane helices of CCR5. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 5639-5644, 2000.

DUMANS, A.T.; SOARES, M.A.; PIENIAZEK, D.; KALISH, M.L.; DE VROEY, V.; HERTOGS, K.; *et al.* Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 3075-9, 2002.

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

EYER-SILVA, W.A.; COUTO-FERNANDEZ, J.C.; MORGADO, M.G. Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio De Janeiro State, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, p. 303-8, 2007.

EZZELL, C. AIDS drugs gets green light. **Nature**, v. 329, p.751, 1987.

FAUCI, A.S. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. **Science**, v. 262, p. 1011-1018, 1993.

FRANKEL, A.D.; YOUNG, J.A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 1-25, 1998.

GADELHA, S.R.; SHINDO, N.; CRUZ, J.N.; MORGADO, M.G.; GALVAO-CASTRO, B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 461-463, 2003.

GALLO, R.C.; SALAHUDDIN, S.Z.; POPOVIC, M.; SHEARER, G.M.; KAPLAN, M.; HAYNES, B.F.; *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, p. 500-503, 1984.

GAO, F.; ROBERTSON, D.L.; MORRISON, S.G.; HUI, H.; CRAIG, S.; DECKER, J. *et al.* The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. **J Virol**, v. 70, p. 7013-29, 1996.

GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D.L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C.M.; MICHAEL, S.F.; *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, v. 397, p. 436-441, 1999.

GAYLE, H.; KOPLAN, J.P. Prevention. Perinatal AIDS transmission declines while deaths level off. **AIDS Policy Law**, v. 16, p. 5, 2001.

GOODENOW, M.; HUET, T.; SAURIN, W.; KWOK, S.; SNINSKY, J.; WAIN-HOBSON, S. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 2, p. 344-52, 1989.

GOUDSMIT, J.; DEBOUCK, C.; MELOEN, R.H.; SMIT, L.; BAKKER, M.; ASHER, D.M.; *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p.4478-82, 1988.

GREENE, W.C.; PETERLIN, B.M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. **Nat Med**, v. 8, p. 673-680, 2002.

GUADALUPE, M.; REAY, E.; SANKARAN, S.; PRINDIVILLE, T.; FLAMM, J.; MCNEIL, A.; *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. **J Virol**, v. 77, p. 11708-17, 2003.

GUIMARAES, M.L.; BASTOS, F.I.; TELLES, P.R.; GALVAO-CASTRO, B.; DIAZ, R.S.; BONGERTZ, V.; *et al.* Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. **J Clin Virol**, v. 21, p. 143-151, 2001.

GUIMARÃES, M.L.; MOREIRA, A.S.; LOUREIRO, R.; GALVÃO-CASTRO, B.; THE BRAZILIAN NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION; MORGADO, M.G. High Frequency of Recombinant Genomes in HIV Type 1 Samples from Brazilian Southeastern and Southern Regions. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, p. 1261-1269, 2002.

GUIMARÃES, M.L.; EYER-SILVA, W.A.; COUTO-FERNANDEZ, J.C.; MORGADO, M.G. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. **AIDS**, v. 22, p. 433-5, 2008.

GÜRTLER, L.G. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. **Arch Virol Suppl**, v. 11, p. 195-202, 1996.

HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; DE COCK, K.M.; SHARP, P.M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, p. 607-614, 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **NAS**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P.D.; OSMANOV, S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, p. W13-W23, 2006.

HEYNDRIKX, L.; JANSSENS, W.; ZEKENG, L.; MUSINDA, R.; ANAGONOU, S.; VAN DER AWERA, G.; *et al.* Simplified strategy for detection of recombinant HIV-1 group M isolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. **J Virol**, v. 74, p. 363-370, 2000.

HIRSCH, V.M.; OLMSTED, R.A.; MURPHEY-CORB, M.; PURCELL, R.H.; JOHNSON, P.R. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. **Nature**, v. 339, p. 389-392, 1986.

HIV DATABASES. Los Alamos National Laboratory. 2001. Disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>. Acesso em abril de 2009.

HOLMES, E.C. On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 76, p. 239-54, 2001.

HOPE, T.J. Viral RNA export. **Chem Biol**, v. 4; p. 335-44, 1997.

HU, D.J.; VANICHSENI, S.; MASTRO, T.D.; RAKTHAM, S.; YOUNG, N.L.; MOCK, P.A.; *et al.* Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. **AIDS**, v. 15, p. 683-91, 2001.

HU, W.S.; TEMIN, H. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 1556-1560, 1990.

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Censo 2007**. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 21 de abril de 2009.

JETZ, A.E.; YU, H.; KLARMANN, G.J.; RON, Y.; PRESTON, B.D.; DOUGHERTY, J.P. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. **J Virol**, v. 74, p. 1234-1240, 2000.

KAHN, J.O.; WALKER, B.D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **N.**

**Engl. J. Med**, v. 339, p. 33-39, 1998.

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**, v. 15, p. 293-9, 2001.

KANDATHIL, A.J.; RAMALINGAM, S.; KANNANGAI, R.; DAVID, S.; SRIDHARAN, G. Molecular epidemiology of HIV. **Indian J Med Res**, v. 121, p. 333-44, 2005.

KANKI, P.; TRAVERS, K.; MBOUP, S. Slower Heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. **Lancet**, v. 343, p. 943-946, 1994.

KANKI, P.J.; PEETERS, M.; GUÉYE-NDIAYE, A. Virology of HIV-1 and HIV-2: implications for Africa. **AIDS**, v. 11, Suppl B, p. S33-42, 1997.

KANKI, P.; HAMEL, D.J.; SANKALE, J.L.; HSIEH, C.C.; THIOR, I.; BARIN, F.; *et al.* HIV-1 subtypes differ in disease progression. **J. Infect. Dis**, v. 179, p. 68-73, 1999.

KARN, J. Tackling Tat. **J Mol Biol**, v. 293, p. 235-254, 1999.

KATZ, R.A.; SKALKKA, A.M. The retroviral enzymes. **Annu Rev Biochem**, v. 63, p. 133-73, 1994.

KATZ, R.A.; SKALKKA, A.M. Generation of diversity in retroviruses. **Annu. Rev. Genet**, v. 24, p. 409-445, 1990.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KLIMKAIT, T.; STREBEL, K.; HOGGAN, M.D.; MARTIN, M.A.; ORENSTEIN, J.M. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. **J Virol**, v. 64, p. 621-9, 1990.

KOTLER, D.P.; REKA, S.; BORCICH, A.; CRONIN, W.J. Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. **Am J Pathol**, v. 139, p. 823-30, 1991.

KUNANUSONT, C.; FOY, H.M.; KREISS, J.K.; RERKS-NGARM, S.; PHANUPHAK, P.;



RAKTHAM, S.; *et al.* HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. **Lancet**, v. 345, p. 1078-83, 1995.

LAUKKANEN, T.; CARR, J.K.; JANSSENS, W.; LIITSOLA, K.; GOTTE, D.; MCCUTCHAN, F.E.; *et al.* Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. **Virology**, v. 269, p. 95-104, 2000.

LEFRERE, J.J.; ROUDOT-THORAVALE, F.; MARIOTTI, M.; THAUVIN, M.; LERABLE, J.; SALPETRIER, J.; *et al.* The risk of disease progression is determined during the first year of human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Infect Dis**, v. 177, p. 1541-8, 1998.

LEONARD, C.K.; SPELLMAN, M.W.; RIDDLE, L.; HARRIS, R.J.; THOMAS, J.N.; GREGORY, T.J. 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**, v. 265, p. 10373-82, 1990.

LIAO, F.; ALKHATIB, G.; PEDEN, K.W.; SHARMA, G.; BERGER, E.A.; FARBER, J.M. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. **J Exp Med**, v. 185, p. 2015-23, 1997.

LOCATELI, D.; STOCO, P.H.; DE QUEIROZ, A.T.; ALCÂNTARA, L.C.; FERREIRA, L.G.; ZANETTI, C.R.; *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. **J Med Virol**, v. 79, p. 1455-63, 2007.

LOUWAGIE, J.; DELWART, E.L.; MULLINS, J.I.; MCCUTCHAN, F.E.; EDDY, G.; BURKE, D.S. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, p. 561-7, 1994.

MACKEWICZ, C.E.; ORTEGA, H.W.; LEVY, J.A. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. **J Clin Invest**, v. 87, p. 1462-6, 1991.

MARIANI, R.; CHEN, D.; SCHROFELBAUER, B.; NAVARRO, F.; KONIG, R.; BOLLMAN, B.; *et al.* Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. **Cell**, v. 114, p. 21-31, 2003.

MARLINK, R.; KANKI, P.; THIOR, I. Reduced rates of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**, v. 265, p. 1587-1590, 1994.

MAROZSAN, A.J.; MOORE, D.M.; LOBRITZ, M.A.; FRAUNDORF, E.; ABRAHA, A.; REEVES, D.; *et al.* Differences in the Fitness of Two Diverse Wild-Type Human

Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates Are Related to the Efficiency of Cell Binding and Entry. **J Virol**, v. 79, p. 7121-7134, 2005.

MARX, P.A.; CHEN, Z. The function of simian chemokine receptors in the replication of SIV. **Semin Immunol**, v. 10, p. 215-223, 1998.

MASCIOTRA, S.; LIVELLARA, B.; BELLOSO, W.; CLARA, L.; TANURI, A.; RAMOS, A.C.; *et al.* Evidence of a high frequency of HIV-1 subtype F infections in a heterosexual population in Buenos Aires, Argentina. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, p. 1007-1014, 2000.

MCCUTCHAN, F.E.; VIPUTTIGUL, K.; DE SOUZA, M.S.; CARR, J.K.; MARKOWITZ, L.E.; BUAPUNTH, P. Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, p. 801-805, 2000.

MCCUTCHAN, F.E. Global Epidemiology of HIV. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. S7-S12, 2006.

MEHANDRU, S.; POLES, M.A.; TENNER-RACZ, K.; HOROWITZ, A.; HURLEY, A.; HOGAN, C.; *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, p. 761-70, 2004.

MELLORS, J.W.; RINALDO, C.R. JR.; GUPTA, P.; WHITE, R.M.; TODD, J.A.; KINGSLEY, L.A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**, v. 272, p. 1167-70, 1996. Erratum in: **Science**, v. 275, p. 14, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Epidemia da AIDS no Brasil: Atualização, dezembro de 1998**. Disponível em: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br). Acesso em abril de 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS e DST**. Ano XIV nº01 - 1ª à 13ª semanas epidemiológicas – janeiro a Março de 2001. Disponível em: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br). Acesso em abril de 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS e DST**. Ano V nº01 - 27ª à 52ª semanas epidemiológicas – julho a dezembro de 2007; 01ª à 26ª semanas epidemiológicas – janeiro a junho de 2008. Disponível em: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br). Acesso em abril de 2009.

MONTEIRO, J.P.; FERRARO, G.A.; OLIVEIRA, T.; GOLDANI, L.Z.; KASHIMA, S.;

ALCANTARA, L.C.; *et al.* Genetic and biologic characterization of HIV type 1 subtype C isolates from south Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, p. 135-43, 2007.

MONTEIRO, J.P.; ALCANTARA, L.C.; DE OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, A.M.; MELO, M.A.; BRITES, C.; *et al.* Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil: high diversity of HIV genotypes. **J Med Virol**, v. 81, p. 391-9, 2009.

MORGADO, M.G.; SABINO, E.; SPHAER, E.; BONGERTZ, V.; BRIGIDO, L.; GUIMARÃES, M.D.C.; *et al.* Polymorphism in the V3 region on the envelope protein of HIV-1 in Brazil: divergence from prevalent North American/European subtype B strains and identification of newly described F subtype. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, p. 569-576, 1994.

MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; GRIPP, C.B.W.G.; NEVES, J.R.; COSTA, C.I.; VELOSO DOS SANTOS, V.G.; *et al.* Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, p. 339-3, 1996.

MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; NEVES, J.R.I.; VELOSO, V.G.; LINHARES-DE-CARVALHO, M.I.; CASTELLO-BRANCO, L.; *et al.* Polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 383-386, 1998a.

MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; GRIPP, C.B.; COSTA, C.I.; NEVES, J.R.I.; VELOSO, V.G.; *et al.* High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J AIDS and Hum Retrovirology**, v. 18, p. 488-494, 1998b.

MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 143-150, 2002.

MOUTOUH, L.; CORBEIL, J.; RICHMAN, D. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 6106-6111, 1996.

NANNINI, E.C.; OKHUYSEN, P.C. HIV-1 and the gut in the era of highly active antiretroviral therapy. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 4, p. 392-8, 2002.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, H.B.J.; DEERFIELD II, D.W. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation (**EMBNEW NEWS 30**). 1997

OBERLIN, E.; AMARA, A.; BACHELERIE, F.; BESSIA, C.; VIRELIZIER, J.L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; *et al.* The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. **Nature**, v. 382, p. 833-835, 1996.

PAGE, R.D. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput Appl Biosci**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PANTALEO, G.; DEMAREST, J.F.; SOUDEYNS, H.; GRAZIOSI, C.; DENIS, F.; ADELSBERGER, J.W.; *et al.* Major expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. **Nature**, v. 370, p. 463-7, 1994.

PANTALEO, G.; FAUCI, S. Immunopathogenesis of HIV infection. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, p. 825-54, 1996.

PEDROSO, C.; QUEIROZ, A.T.; ALCÂNTARA, L.C.; DREXLER, J.F.; DIAZ, R.S.; WEYLL, N.; *et al.* High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a northeast state of Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, p.251-3, 2007.

PEETERS, M.; VINCENT, R.; PERRET, J.L.; LASKY, M.; PATREL, D.; LIEGEOIS, F.; *et al.* Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 20, p. 115-121, 1999.

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

PEREIRA, G.A.; STEFANI, M.M.; ARAUJO FILHO, J.A.; SOUZA, L.C.; STEFANI, G.P.; MARTELLI, C.M. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and Mycobacterium leprae co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, p. 679-84, 2004.

PETER, F. HIV nef: The mother of all evil? **Immunity**, v. 9, p. 433-7, 1998.

PHAIR, J.P. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, p. 883-5, 1994.

POIGNARD, P.; KLASSE, P.J.; SATTENTAU, Q.J. Antibody neutralization of HIV-1. **Immunol Today**, v. 17, p. 239-246, 1996.

POSADA, D.; KRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.

PUGLISI, J.D.; TAN, R.; CALNAN, B.J.; FRANKEL, A.D.; WILLIAMSON, J.R. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. **Science**, v. 257, p. 76-80, 1992.

QUARLERI, J.F.; RUBIO, A.; CAROBENE, M.; TURK, G.; VIGNOLES, M.; HARRIGAN, R.P.; *et al.* HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, p.1100-7, 2004.

RAMBAUT, A.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A.; HOLMES, E.C. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature Reviews**, v. 5, p. 52-61, 2004.

RENJIFO, B.; FAWZI, W.; MWAKAGILE, D.; HUNTER, D.; MSAMANGA, G.; SPIEGELMAN, D.; *et al.* Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. **J Hum Virol**, v. 4, p. 16-25, 2001.

RICHMAN, D.D. HIV chemotherapy. **Nature**, v. 410, p. 995-1001, 2001.

RICHMAN, D.D.; WRIN, T.; LITTLE, S.J.; PETROPOULOS, C.J. Rapid evolution of neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 4144-4149, 2003.

RINKE DE WIT, T.F.; TSEGAYE, A.; WOLDAY, D.; HAILU, B.; AKLILU, M.; SANDERS, E.; *et al.* Primary HIV-1 subtype C infection in Ethiopia. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 30, p. 463-470, 2002.

RIOS, M.; FERNANDEZ, J.; JARAMILLO, P.; PAREDES, V.; SANCHEZ, J.L.; LAGUNA-TORRES, V.A.; *et al.* Molecular epidemiology of HIV type 1 in Chile: differential geographic and transmission route distribution of B and F subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21, p. 835-40, 2005.

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

ROBERTSON, D.L.; ANDERSON, J.P.; BRADAC, J.A.; CARR, J.K.; FOLEY, B.;

FUNKHOUSER, R.K.; *et al.* **Human Retroviruses and AIDS 1999. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences.** Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 1999a.

ROBERTSON, D.L.; SHARP, P.M.; MCCUTCHAN, F.E.; HAHN, B.H. Recombination in HIV-1. **Nature**, v. 374, p. 124-126, 1999b.

ROBERTSON, D.L.; ANDERSON, J.P.; BRADAC, J.A.; CARR, J.K.; FOLEY, B.; FUNKHOUSER, R.K.; *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, p. 55-6, 2000.

RUCHANSKY, D.; CASADO, C.; RUSSI, J.C.; ARBIZA, J.R.; LOPEZ-GALINDEZ, C. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38\_BF1) in Uruguay. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, p. 351-6, 2009.

SABINO, E.; SPHAER, E.; MORGADO, M.G.; BORBER, B.T.; DIAS, R.S.; BONGERTZ, V.; *et al.* Identification of an HIV-1 proviral genome recombinant between subtype B and F in PBMCs obtained from an individual in Brazil. **J Virol**, v.68, p. 6340-6346, 1994.

SALMINEN, M.O.; CARR, J.K.; BURKE, D.S.; MCCUTCHAN, F.E. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 11, p. 1423-1425, 1995.

SANABANI, S.; KLEINE NETO, W.; KALMAR, E.M.; DIAZ, R.S.; JANINI, L.M.; SABINO, E.C. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 6, p. 368-77, 2006.

SANTOS, A.F.; SOUSA, T.M.; SOARES, E.A.; SANABANI, S.; MARTINEZ, A.M.; SPRINZ, E.; *et al.* Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS**, v. 20, p. 2011-2019, 2006.

SCHUBERT, U.; FERRER-MONTIEL, A.V.; OBLATT-MONTAL, M.; HENKLEIN, P.; STREBEL, K.; MONTAL, M. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. **FEBS Lett**, v. 398, p. 12-8, 1996.

SHARP, P.M.; BAILES, E.; ROBERTSON, D.L.; GAO, F.; HAHN, B. Gene acquisition in HIV and SIV. **Nature**, v. 383, p. 586-87, 1996.

SIMMONDS, P.; BALFE, P.; LUDIEM, C.A.; BISHOP, J.O.; LEIGH-BROWN, A.J.

Analysis of sequence diversity in hipervariable regions of glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 64, p. 5840-5850, 1990.

SIMON, F.; MAUCLÈRE, P.; ROQUES, P.; LOUSSERT-AJAKA, I.; MÜLLER-TRUTWIN, M.C.; SARAGOST, S.; *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Med**, v. 4, p. 1032-1037, 1998.

SMIT-MCBRIDE, Z.; MATTAPALLIL, J.J.; MCCHESENEY, M.; FERRICK, D.; DANDEKAR, S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. **J Virol**, v. 72, p. 6646-56, 1998.

SOARES, E.A.; MARTINEZ, A.M.; SOUZA, T.M.; SANTOS, A.F.; DA HORA, V.; SILVEIRA, J.; *et al.* HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **AIDS**, v. 19, suppl. 4, p. S81-S86, 2005.

SORIANO, V.; GOMES, P.; HENEINE, W.; HOLGUIN, A.; DORUANA, M.; ANTUNES, R.; *et al.* Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. **J Med Virol**, v. 61, p. 111-6, 2000.

SOTO-RAMIREZ, L.E.; RENJIFO, B.; MCLANE, M.F.; MARLINK, R.; O'HARA, C.; SUTTHENT, R.; *et al.* HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. **Science**, v. 271, p. 1291-3, 1996.

STARCICH, B.R.; HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; MCNEELY, P.D.; MODROW, S.; WOLF, H.; *et al.* Identification and characterization of conserved and variable regions of the envelope gene HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. **Cell**, v. 45, p. 637, 1986.

STEFANI, M.M.; PEREIRA, G.A.; MARTELLI, C.M.; SHINDO, N.; GALVAO-CASTRO, B. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 23, p. 205-207, 2000.

SUBBARAO, S.; SCHOCHETMAN, G. Genetic variability of HIV-1. **AIDS**, suppl A, p. 13-23, 1996.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TANURI, A.; SWANSON, P.; DEVARE, S.; BERRO, O.J.; SAVEDRA, A.; COSTA, L.J.; *et al.* HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 20, p. 60-66, 1999.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. The CLUSTAL\_X Windows interface: Flexible strategies for mutiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

THOMSON, M.M.; DELGADO, E.; HERRERO, I.; VILLAHERMOSA, M.L.; VÁZQUEZ-DE PARGA, E.; CUEVAS, M.T.; *et al.* Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. **J Gen Virol**, v. 83, p.107-19, 2002.

THOMSON, M.M.; SIERRA, M.; TANURI, A.; MAY, S.; CASADO, G.; MANJÓN, N.; *et al.* Analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Brazil reveals their independent origins and their lack of relationship to CRF12\_BF. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, p. 1126-33, 2004.

THOMSON, M.M.; CASADO, G.; POSADA, D.; SIERRA, M.; NAJERA, R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18\_cpx) of Central African origin in Cuba. **AIDS**, v. 19, p. 1155-63, 2005.

TSHERNING, C.; ALAEUS, A.; FREDERIKSSON, R. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. **Virology**, v. 241, p. 181-188, 1998.

TURCHI, M.D.; DIAZ, R.S.; MARTELLI, C.M.; SABINO, E.C.; DA SILVA, W.P.; FILHO, O.F.; *et al.* Genetic diversity and HIV-1 incidence estimation among cocaine users in Sao Paulo, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 30, p. 527-32, 2002.

UGOLINI, S.; MONDOR, I.; SATTENTAU, Q.J. HIV-1 attachment: another look. **Trends Microbiol**, v. 7, p. 144-149, 1999.

UNAIDS 2008: UNAIDS/WHO AIDS Epidemic Update: December 2008. Disponível em: <http://www.unaids.org>. Acesso em abril de 2009.



VAN DER LOEFF, M.; AABY, P. Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. **AIDS**, v. 13, p. 69-84, 1999.

VAN HARMELEN, J.; WOOD, R.; LAMBRICK, M.; RYBICKI, E.P.; WILLIAMSON, A.L.; WILLIAMSON, C. An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. **AIDS** v. 11, p. 81-7, 1997.

VÉRAS, N.M.; VÉRAS, V.S.; RAMALHO, E.D.; KYAW, C.; SILVA, R.R.; BRÍGIDO, M.M.; et al. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, p. 1481-90, 2007.

VICENTE, A.C.P.; OTSUKI, K.; SILVA, N.B.; CASTILHO, M.C.; BARROS, F.S.; PIENIAZEK, D.; et al. The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **JAIDS**, v. 23, p. 327-331, 2000.

WEI, X.; DECKER, J.M.; WANG, S.; HUI, H.; KAPPES, J.C.; WU, X.; et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, v. 422, p. 307-12, 2003.

WENIGER, B.G.; TAKEBE, Y.; OU, C.Y.; YAMAZAKI, S. The molecular epidemiology of HIV in Asia. **AIDS**, v. 8, Suppl. 2, p. S13-28, 1994. [Retraction of WENIGER, B.G.; TAKEBE, Y.; OU, C.Y.; YAMAZAKI, S. In: **AIDS**, v. 15, p. 545, 2001].

WHO NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, p. 1327-1343, 1994.

WONG, P.K.; MCCARTER, J.A.; HENDERSON, L.E.; BOWERS, M.A.; SOWDER, R.C. et al. Genetic studies of temperature-sensitive mutants of Moloney-murine leukemia virus. **Virology**, v. 53, p. 319-326, 1973.

WYKE, J.A.; BELL, J.G.; BEAMAND, J.A.; HENDERSON, BOWERS, M.A.; et al. Genetic recombinations among temperature-sensitive mutants of Rous sarcoma virus. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 39, p. 897-905, 1975.

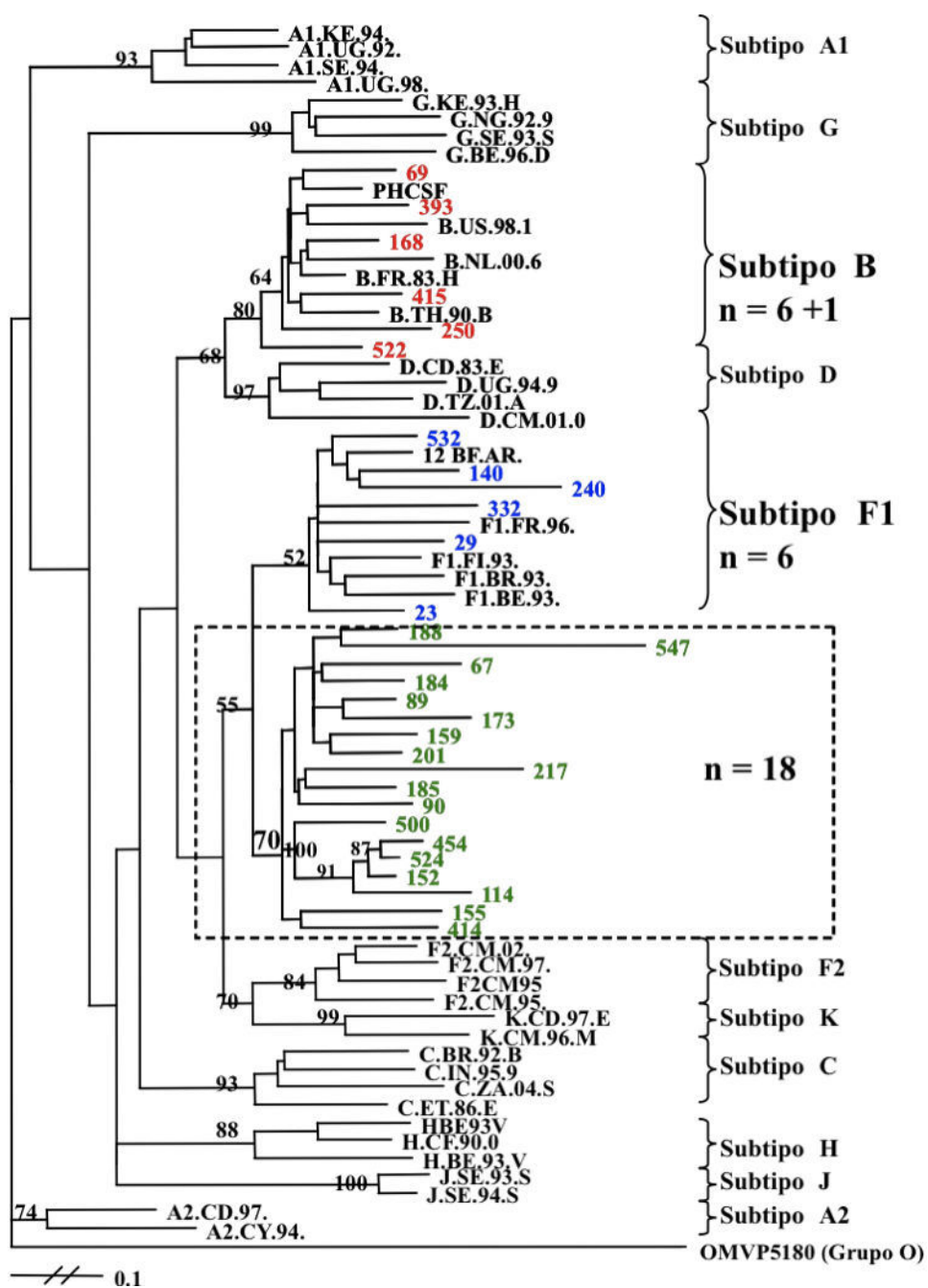
YAMAGUCHI, J.; DEVARE, S.G.; BRENNAN, C.A. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, p. 925-30, 2000.

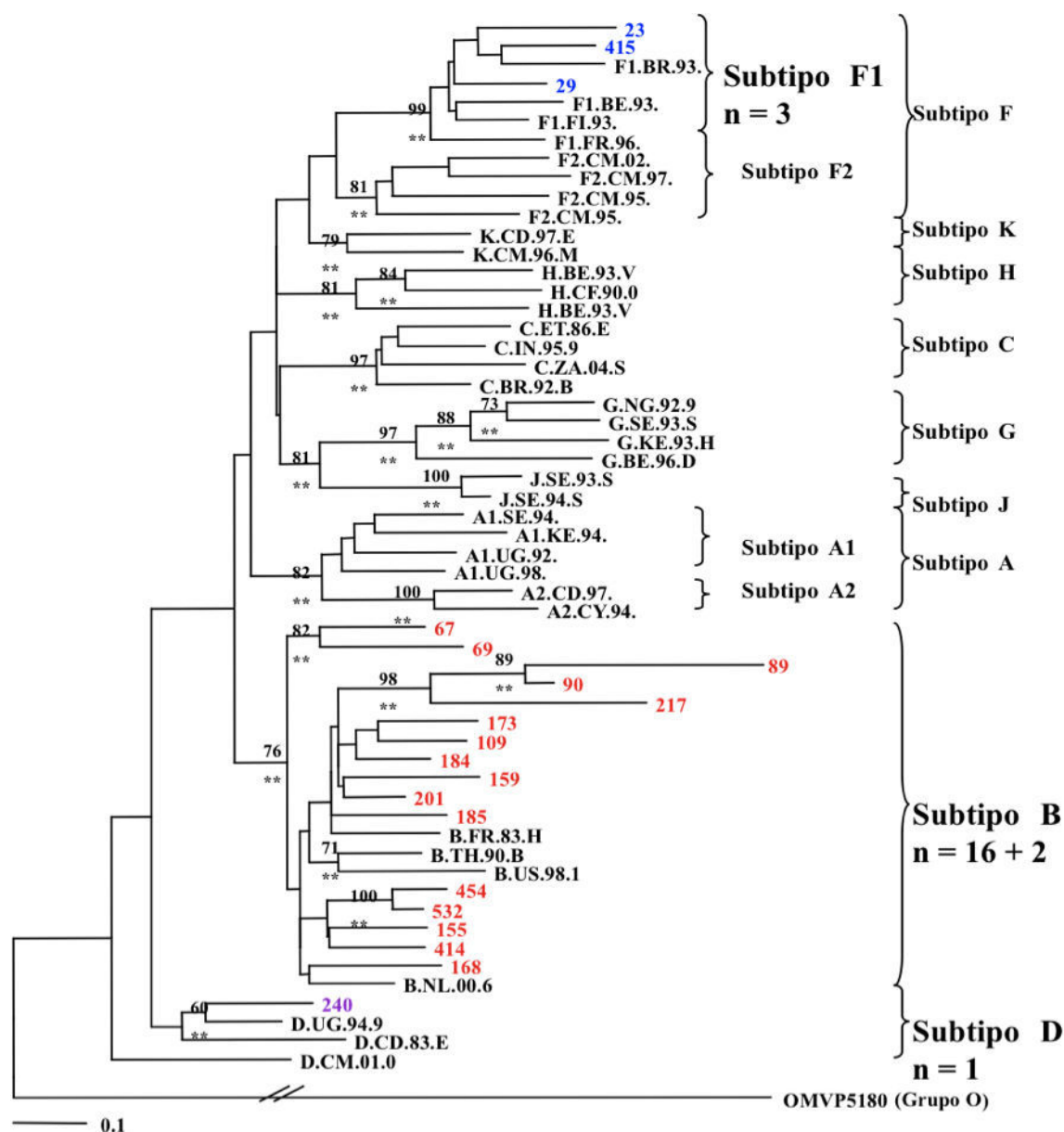
ZEICHNER, S.L. The molecular biology of HIV. Insights into pathogenesis and targets for

therapy. **Clin Perinatol**, v. 21, p. 39-73, 1994.

APÊNDICE A – Figuras e tabelas contidas no artigo publicado por Monteiro et al., 2009, entitulado “Genetic Variability of Human Immunodeficiency Virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High Diversity of HIV Genotypes” disponível no periódico Journal of Medical Virology, volume 81:391–399

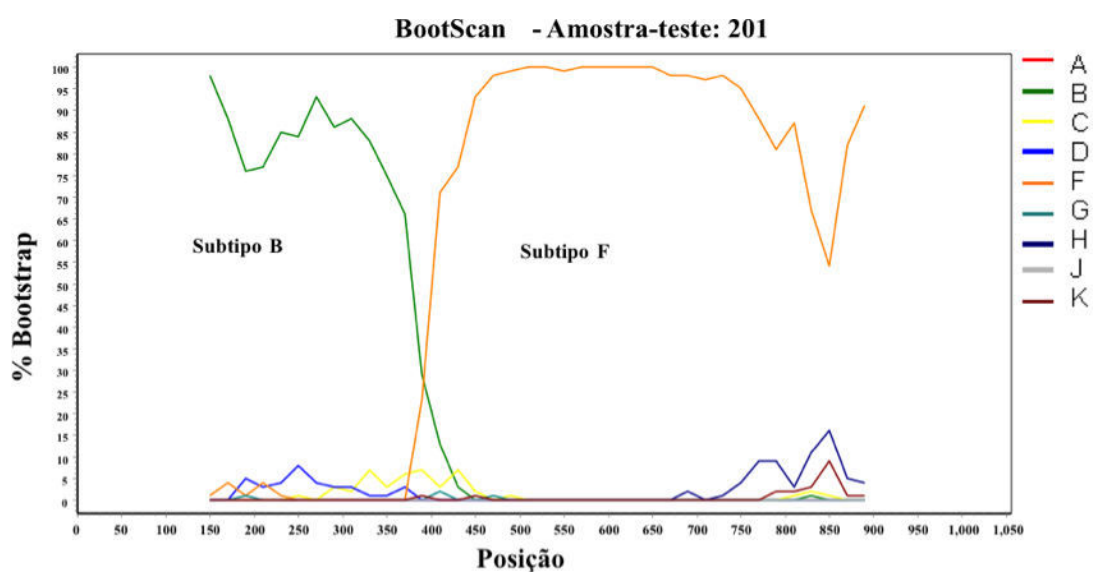
a) *gag*



b) *env*

**Figura A.1:** Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando as relações filogenéticas das seqüências de *gag* (a) e *env* (b) das amostras da Bahia com seqüências de referência dos subtipos do grupo M. Uma seqüência do grupo O (OMVP5180) foi usada como grupo externo. Os modelos de substituição de nucleotídeo K81uf+I+G (*gag*) e GTR+I+G (*env*) foram utilizados. Os valores de “bootstrap” para 1000 réplicas estão indicados nos ramos. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de  $p < 0,001$ . As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: vermelho = subtipo B, roxo = subtipo D, azul = subtipo F e verde = indeterminadas.

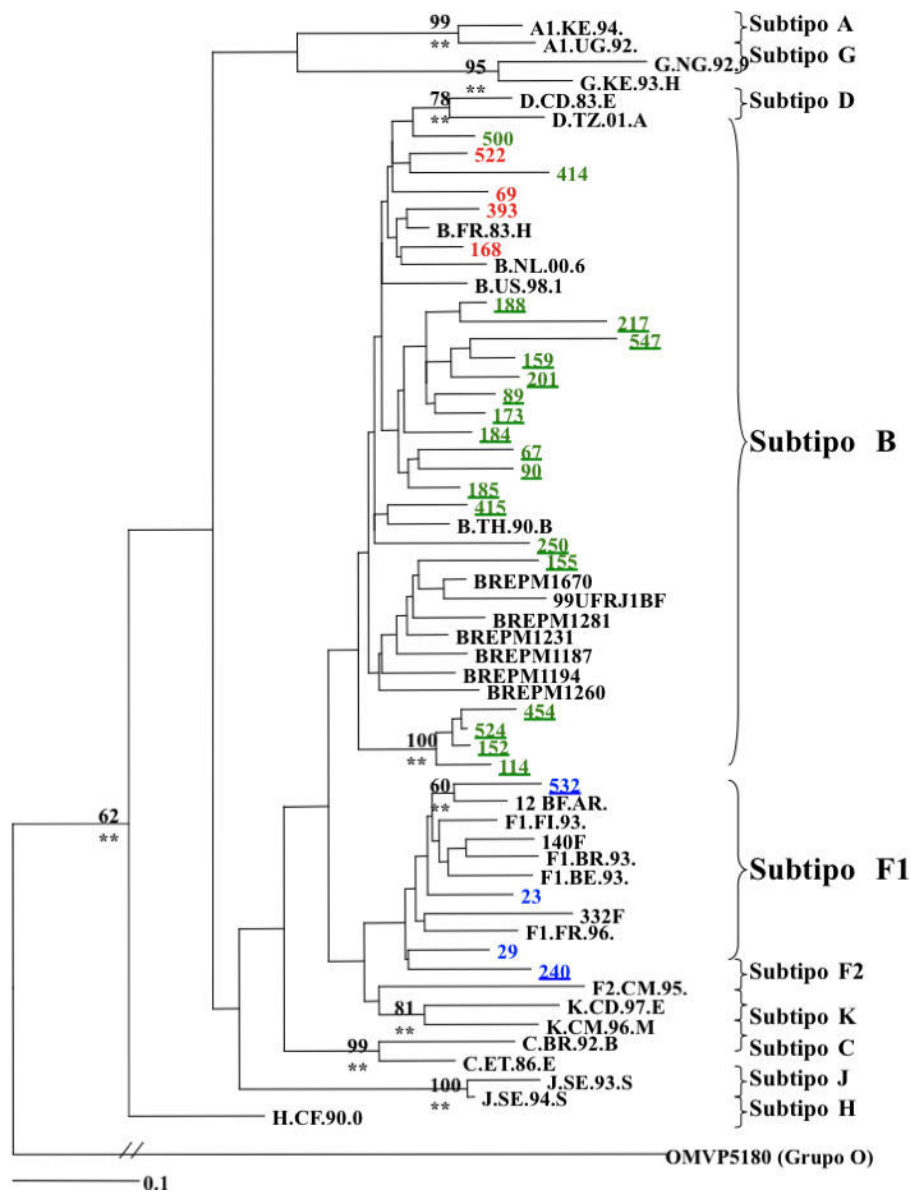
a)



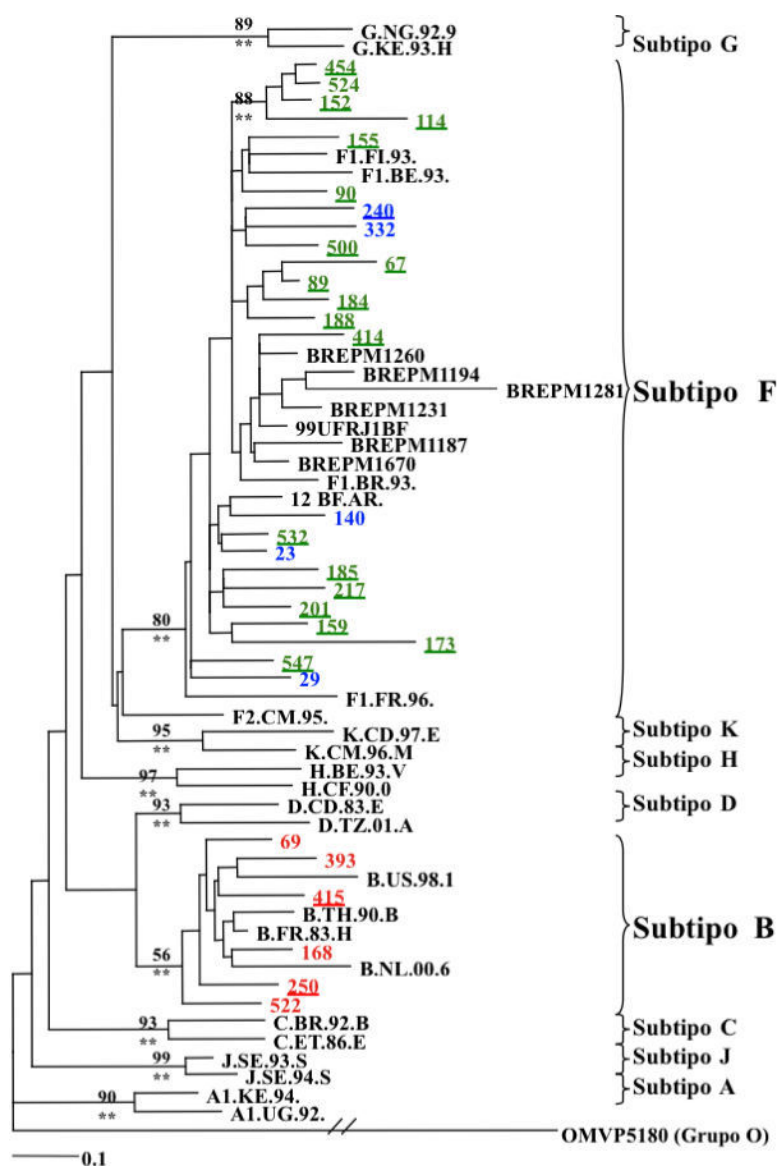
*Segmento: 350 pb, Passo: 20 pb, Réplicas: 100, Kimura (2-parâmetros), T/t: 2,0, Neighbor-Joining*

b)

*gag* nt 952-1397



c)

*gag* nt 1398-1958

**Figura A.2:** Isolados recombinantes BF circulantes no estado da Bahia. (a) Análise Bootscanning mostrando o padrão de recombinação entre os subtipos B e F dentro do gene *gag*. As seqüências foram fragmentadas no ponto de recombinação e os segmentos inicial (b) e final (c) (nucleotídeos 952 -> 1397 e 1398 -> 1958 em relação ao HXB2) foram submetidos à análises NJ junto com seqüências de referência do banco de Los Alamos usando os modelos de substituição de nucleotídeos F81uf+I+G e TRN+I+G respectivamente. Os valores de Bootstrap para 1000 réplicas estão indicados. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de  $p < 0,001$ . As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: vermelho = subtipo B, roxo = subtipo D, azul = subtipo F e verde = recombinantes BF.

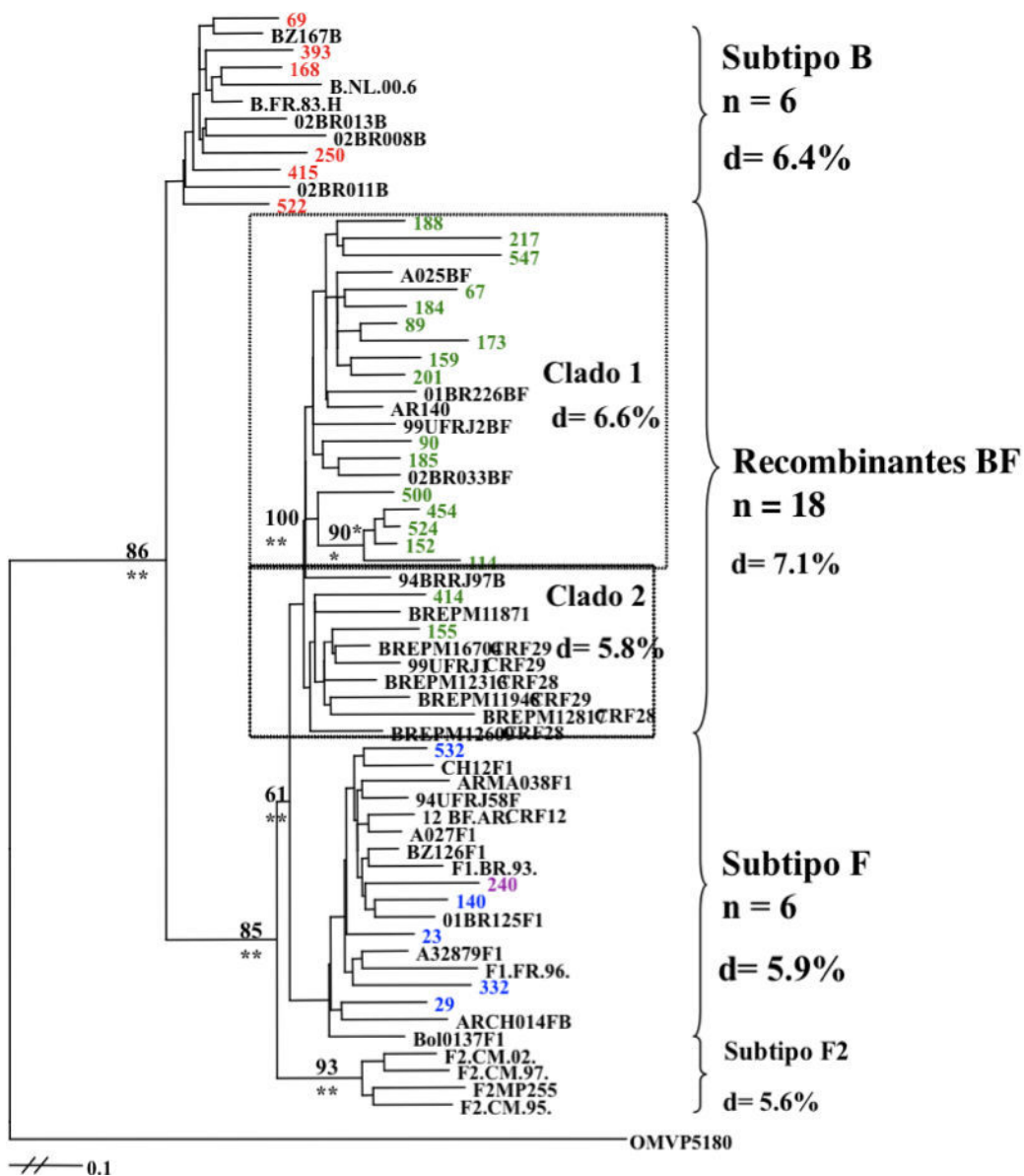
**Tabela A.1** (Tabela 2 do artigo - ampliada): Dados clínicos e epidemiológicos das amostras de indivíduos infectados com o subtipo F do HIV-1.

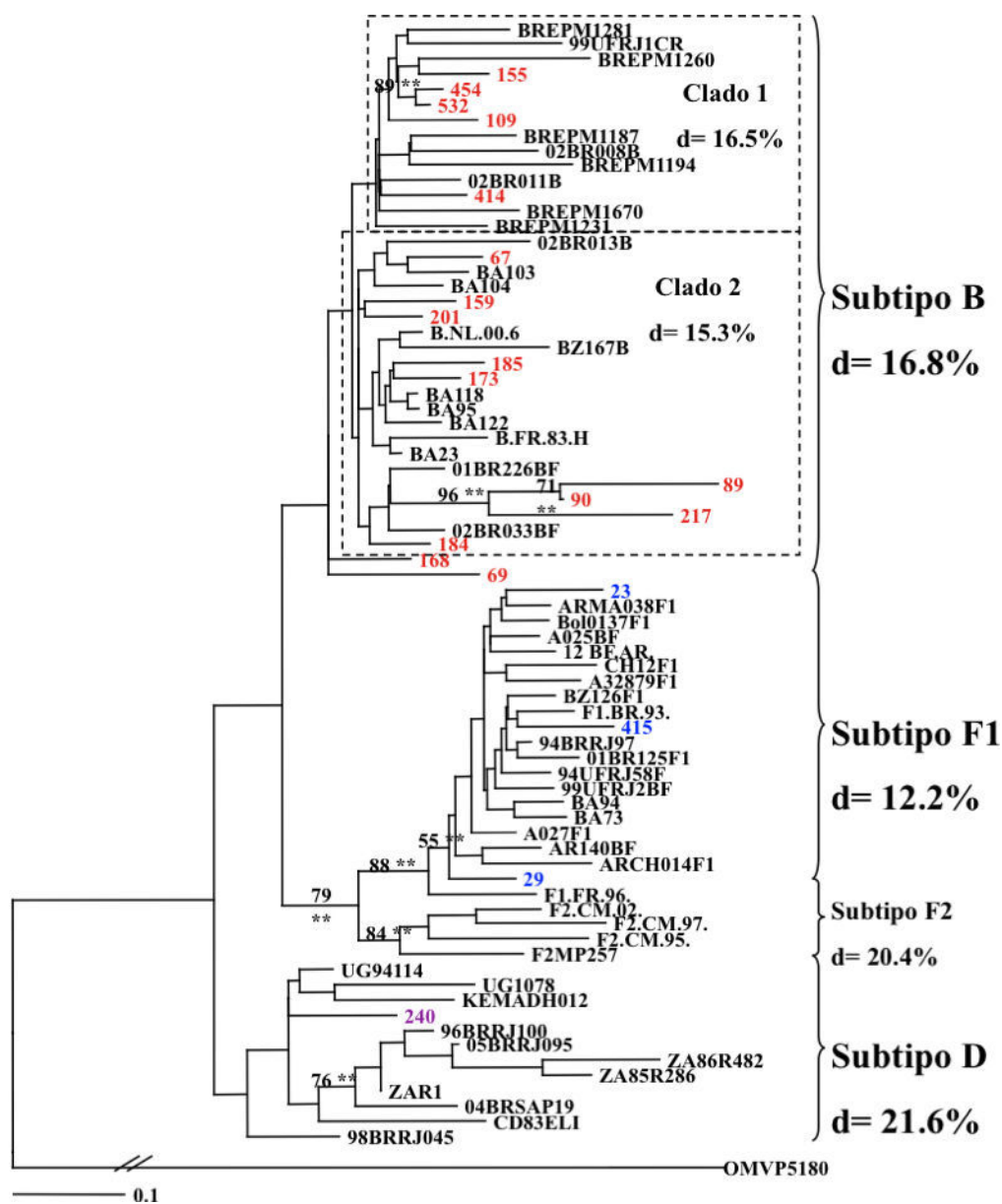
Amostra	Subtipo			Dados Clínicos e Epidemiológicos									
	gag		env	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico (ano)	Exposição de risco	Carga viral (cópias/ml)	CD4 (células/ml)	AIDS			
	HMA	Seq <sup>a</sup> .	HMA								Seq <sup>a</sup> .		
23	F	F	B	F	M	38	ND	ND	ND	ND	ND	S	
29	B	F	F	F	M	38	ND	ND	ND	ND	ND	N	
67	F	BF	B	B	F	ND	ND	Ht	ND	ND	ND	ND	
69	B	B	F	B	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
89	F	BF	B	B	M	38	1996	Ht	1600	176	176	N	
90	F	BF	B	B	M	39	1997	Hm	IND.	631	631	N	
109	F	BF	B	B <sup>b</sup>	F	ND	ND	Ht	ND	ND	ND	ND	
114	F	BF	B	NA	F	ND	1999	Ht	4700	85	85	N	
140	B	F	F	NA	F	29	1997	Ht	IND.	543	543	N	
152	F	BF	B	NA	F	28	1997	Sangue	IND.	781	781	N	
155	F	BF	B	B	M	40	1997	Ht	2300	694	694	N	
159	F	BF	B	B	F	36	1996	Ht	8700	210	210	S	
168	D	B	B	B	M	ND	ND	ND	450000	ND	ND	ND	
173	F	BF	B	B	M	25	1999	Ht	250000	233	233	N	
184	F	BF	B	B	F	23	1996	Ht	ND	65	65	S	
185	F	BF	B	B	F	ND	ND	Ht	ND	ND	ND	ND	
188	F	BF	B	NA	F	ND	ND	Ht	ND	ND	ND	ND	
201	F	BF	B	B	M	35	ND	UDEV	66000	156	156	ND	
217	F	BF	B	B	F	41	2000	UDEV	<40	157	157	N	
239	B	B	F	NA	F	30	1999	Sangue	<80	223	223	N	
240	F	F	B	D	F	38	1998	Ht	110	246	246	ND	
250	B	B	F	NA	F	ND	ND	UDEV	61000	407	407	N	
332	F	F	F	NA	M	ND	2001	ND	1700	393	393	N	
393	F	B	B	NA	F	37	ND	Ht	14000	534	534	N	
414	F	BF	B	B	M	39	2002	Ht	10000	303	303	N	
415	B	B	F	F	F	ND	ND	Ht	ND	ND	ND	ND	
454	F	BF	B	B	F	ND	ND	Ht	ND	ND	ND	ND	
500	F	BF	B	B <sup>*</sup>	F	39	ND	Ht	IND.	612	612	ND	
522	F	B	B	B <sup>*</sup>	F	41	ND	Ht	480	200	200	N	
524	B	BF	F	NA	F	35	ND	Ht	IND.	549	549	N	
532	F	F	B <sup>b</sup>	B <sup>b</sup>	F	35	1996	Ht	IND.	550	550	N	
547	F	BF	B	NA	F	ND	ND	Ht	ND	ND	ND	ND	

Seq., seqüenciamento; Amostras que tiveram seqüências viáveis em ambas as regiões genômicas estão em negrito. B<sup>b</sup>, Subtipo B Brasileiro; \*, analisadas com um par de inicializadores diferente (ES7/ES8); ND, não disponível; M, masculino; F, feminino; Ht, heterossexual; Hm, homossexual; UDEV, usuário de drogas endovenosas; Ind., Indetectável; S, sim; N, não.

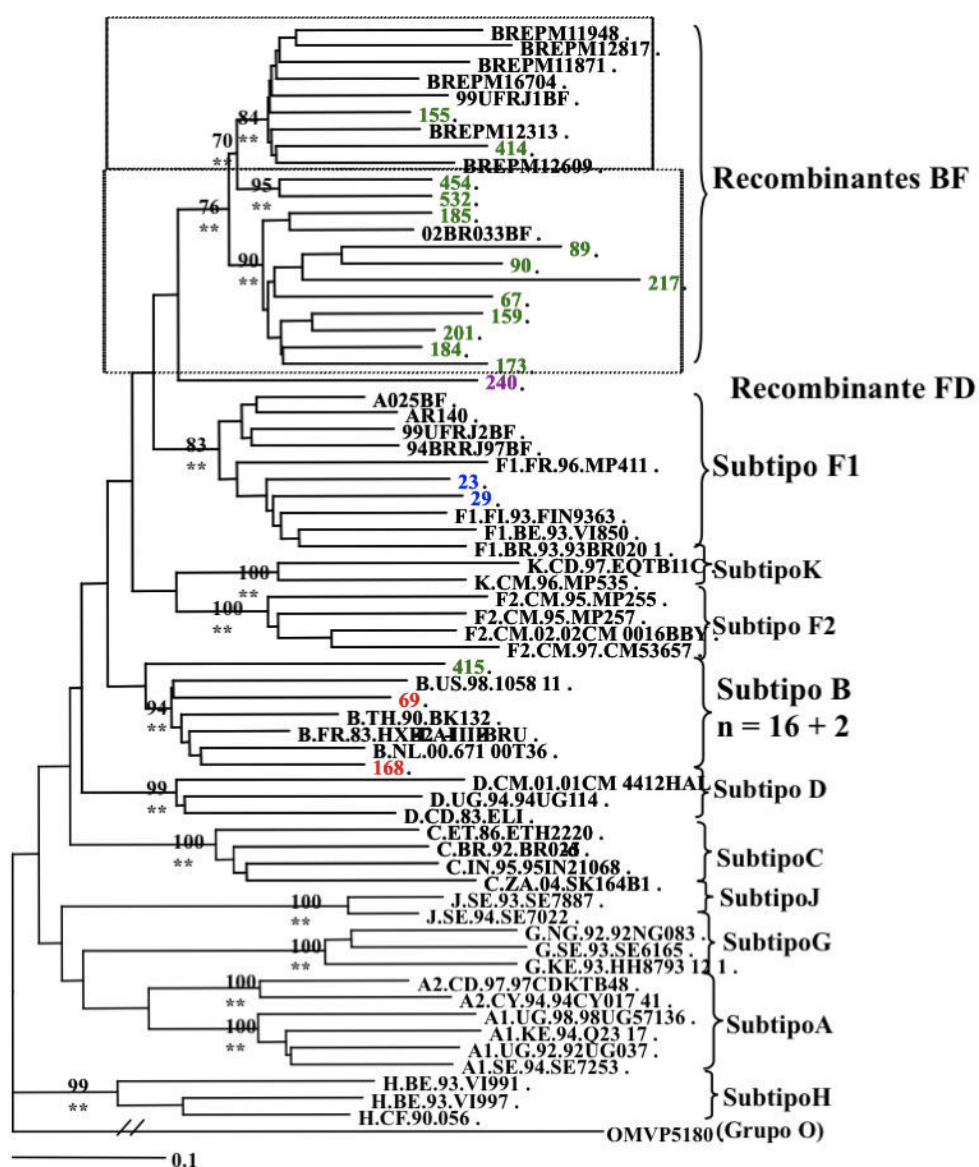


a) gag



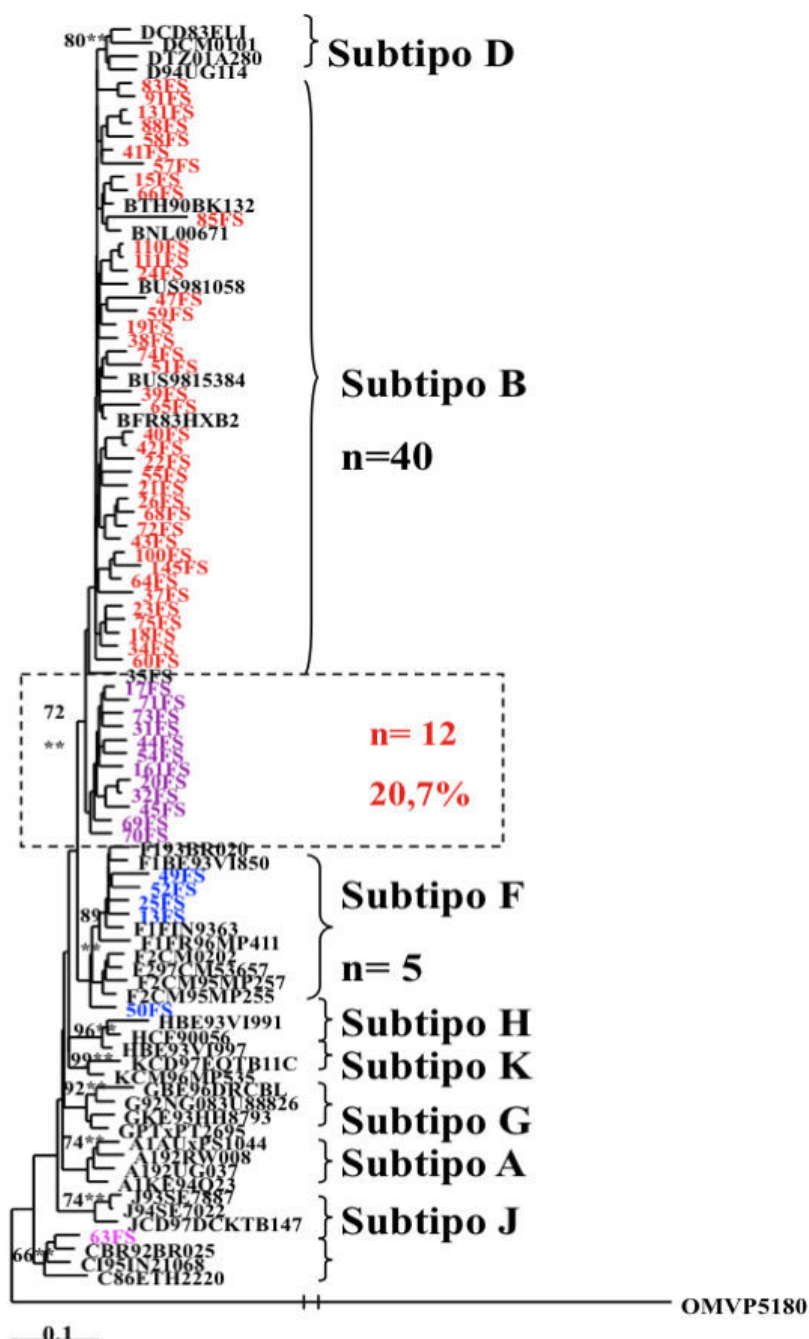
b) *env*

**Figura A.3:** Relações filogenéticas das seqüências *gag* (a) e *env* (b) de recombinantes BF da Bahia comparadas com seqüências de vírus dos subtipos B, F e recombinantes BF circulantes em outras regiões geográficas. As árvores foram construídas baseadas no método NJ com os modelos de substituição de nucleotídeo K81uf+I+G (*gag*) e GTR+I+G (*env*) respectivamente. Os valores de Bootstrap para 1000 réplicas estão indicados. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de  $p < 0,001$ . As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: vermelho = subtipo B, roxo = subtipo D, azul = subtipo F e verde = recombinantes BF.

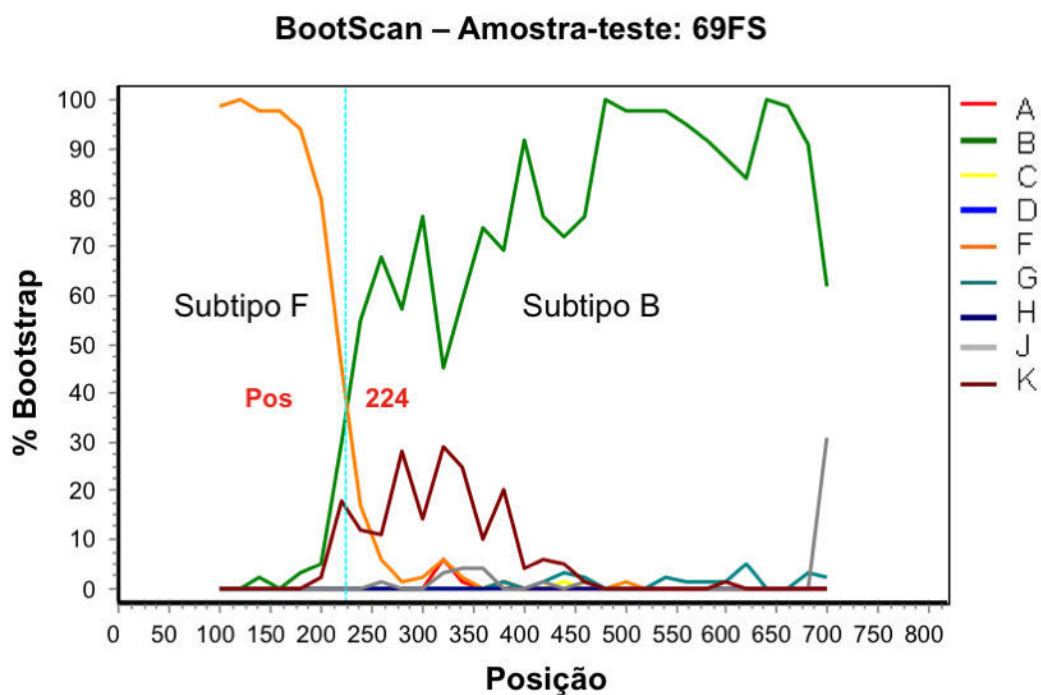


**Figura A.4:** Árvore NJ com base nos fragmentos concatenados de *gag* e *env* mostrando as relações filogenéticas dos recombinantes BF circulantes no Brasil com outros subtipos e cepas recombinantes. As árvores foram construídas utilizando-se o modelo de substituição de nucleotídeo TVM+I+G. Uma sequência do grupo O foi usada como grupo externo. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de  $p < 0,001$ . As sequências geradas neste estudo estão representadas por cores: vermelho = subtipo B, roxo = subtipo D, azul = subtipo F e verde = recombinantes BF.

APÊNDICE B – Classificação dos subtipos de HIV-1 com base no gene *pol* de 58 amostras de indivíduos infectados acompanhados no Centro de Referência em Doenças Sexualmente Transmissíveis (CDST/HIV/AIDS) da cidade de Feira de Santana, Bahia.



**Figura B.1:** Árvore Neighbor-Joining (NJ) mostrando as relações filogenéticas das seqüências de *pol* das amostras de Feira de Santana com seqüências de referência dos subtipos do grupo M. Uma seqüência do grupo O (OMVP5180) foi usada como grupo externo. O modelo de substituição de nucleotídeo GTR+I+G foi utilizado. Os valores de “bootstrap” para 1000 réplicas estão indicados nos ramos. Os asteriscos significam que o método ML foi altamente significativo, com um valor de  $p < 0,001$ . As seqüências geradas neste estudo estão representadas por cores: vermelho = subtipo B, rosa = subtipo C, azul = subtipo F e roxo = indeterminadas.



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

**Figura B.2:** As seqüências do gene *pol* de isolados de Feira de Santana que não agruparam dentro dos subtipos de referência foram submetidas às análises de recombinação no programa SIMPLOT (SALMINEN et al., 1995) A figura representa a análise Bootscanning de uma das amostras (69FS) mostrando o padrão de recombinação entre os subtipos B e F.

ANEXO A – Termo de Consentimento Informado assinado pelos pacientes participantes desta pesquisa acompanhados no Hospital Universitário Professor Edgard Santos/HUPES em Salvador, Bahia, Brasil.



Ministério da Saúde  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz  
Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-Ba.

### **Termo de Consentimento Informado**

Os Pesquisadores Bernardo Galvão, Carlos Brites, Marco Mello, Geraldo Argôlo Ferraro, André Costa Ramos, Diana Pedral Sampaio, e outros colaboradores da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Saúde Coletiva e Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, estão desenvolvendo uma pesquisa para verificar a prevalência e caracterizar o HIV (vírus que causa AIDS) na cidade de Salvador - BA.

Estes estudos podem fornecer informações valiosas para o melhor combate da epidemia de AIDS, e sua colaboração será muito importante para este objetivo. Para este estudo será necessário a coleta de 5 ml de sangue através de punção venosa, utilizando seringas e agulhas estéreis e descartáveis.

Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para este ou outro estudo, e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo a você no futuro. Caso você concorde em participar desta pesquisa acontecerá o seguinte:

Um dos pesquisadores irá fazer uma breve entrevista, e perguntará alguns aspectos da sua vida pessoal. Estes serão anotados de forma anônima e confidencial, não identificando o voluntário em nenhum momento durante ou após a pesquisa. Mesmo participando, você poderá se recusar a fornecer algumas informações solicitadas.

Serão coletados 5ml de sangue do seu braço, o equivalente ao volume de aproximadamente 4 colheres de sopa.

Este estudo não prevê benefícios diretos para você, mas poderá ajudar a orientar o Ministério da Saúde no desenvolvimento de métodos para o combate da AIDS, atualização dos Kits para diagnóstico e nos estudos para o desenvolvimento de vacinas. Como em qualquer coleta de sangue, pode haver desconforto local e pode ocorrer raramente infecção no local da punção. As medidas habituais para coleta de sangue serão tomadas para que isso não aconteça.

A sua identidade será preservada e nenhum resultado obtido com esta pesquisa conterà o seu nome.

Não haverá problema em não aceitar participar desta pesquisa agora ou no futuro.

Eu li este termo de consentimento e concordei em participar desta pesquisa.

ANEXO B – Aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**

**PARECER Nº 79**

**Protocolo : 079**

**Projeto de Pesquisa: "Vigilância do Polimorfismo do HIV-I em Salvador e Avaliação da Prevalência em População de Anônimos não vinculados".**

**Pesquisador Responsável : Bernardo Galvão Castro Filho**

**Instituição ou Departamento: Laboratório Avançado de Saúde - LASP**

**Considerações:**

Após a análise ética do projeto, tendo sido feitos pelo responsável os esclarecimentos solicitados e pelo mesmo adequadas as pendências apontadas, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

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

Salvador , Bahia, 11 de março de 2002

Dr. Italo A. Sherlock  
Coordenador do  
CEP-CPqGM/FIOCRUZ

ANEXO C – Aprovação do estudo “Variabilidade genética do HIV-1 em mulheres e crianças infectadas de Feira de Santana” pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação para Desenvolvimento das Ciências/ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.



ANEXO D – Termo de Consentimento Informado assinado pelos pacientes participantes desta pesquisa acompanhados no Centro de Referência em Doenças Sexualmente Transmissíveis (CDST/HIV/AIDS) da Secretaria Municipal de Saúde, na cidade de Feira de Santana, Bahia, Brasil.