

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Victor Figueiredo Pimentel

**Estudo temporal e dinâmica da diversidade do HIV-1
no Rio de Janeiro**

**Dissertação apresentada à coordenação do
programa de Pós-Graduação em Biologia
Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Área de
concentração: Ecologia e Epidemiologia**

Orientadora: **Dra Monick Lindenmeyer Guimarães**

RIO DE JANEIRO
Março de 2011

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

P644

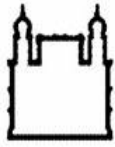
Pimentel, Victor Figueiredo.

Estudo temporal e dinâmica da diversidade do HIV-1 no Rio de Janeiro. / Victor Figueiredo Pimentel. – Rio de Janeiro, 2011.
xvii, 84 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.
Bibliografia: f. 72-84

1. HIV. 2. Subtipos. 3. Categorias de risco. 4. Rio de Janeiro. I.
Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Victor Figueiredo Pimentel

**Estudo temporal e dinâmica da diversidade do HIV-1
no Rio de Janeiro**

Orientadora: Dra Monick Lindenmeyer Guimarães

Aprovada em: 28/03/2011

BANCA EXAMINADORA:

Dra Ana Carolina Paulo Vicente (Revisora e Presidente)

Dr Jorge Simão do Rosário Casseb

Dra Esmeralda Augusta Jadim Machado Soares

SUPLENTES:

Dr Amilcar Tanuri

Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Rio de Janeiro, 28 de março de 2011

Este trabalho foi realizado no laboratório de Aids e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz-Rio de Janeiro/RJ sob orientação da Dra Monick Lindenmeyer Guimarães.

Aos meus pais com quem aprendi a ser; aos docentes com quem aprendi a aprender e pela orientação de percursos às vezes espinhosos,mas nem por isso menos prazerosos, da construção do saber; aos colegas pela cumplicidade; aos irmãos, Neto e Paula, e aos amigos pela paciência e compreensão pelas ausências (ainda há tempo para redenção!) e a minha sobrinha que veio para renovar as esperanças. Cumprida essa etapa, lancemo-nos à vida e com o suor do labor façamos um porvir promissor.

“Gostaríamos, muitas vezes, de pensar que nossas viagens de exploração no mundo do conhecimento se fizeram com orientação precisa ou que seguiram os ventos dominantes da erudição. Entretanto, com freqüência, é a tormenta inesperada que nos impele para praias insuspeitadas e nos leva a descobrir a América, apesar de estarmos à procura das Índias”

Derek de Solla Price

AGRADECIMENTOS

Na minha graduação, tive a ocasião de referir que uma monografia, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contribuições de várias pessoas. Volto a reiterar tal afirmação, com a certeza de que nunca foi tão verdadeiro quanto agora. Desde o início do mestrado, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas. Sem aquelas contribuições, esta investigação não teria sido possível. Há sempre contribuições de natureza diversa que não podem deixar de ser mencionados, pelo que expresso aqui os meus sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para este trabalho.

À minha família, pelo apoio incondicional que me deu, em especial à minha mãe pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviu e a sensatez com que sempre me apoiou e ajudou; ao meu pai que sempre ficou na minha torcida mesmo que de uma forma menos expansiva; ao meu irmão pela perseverança com que atendeu todos os meus telefonemas (rs) e me ajudou nas dificuldades de cunho econômico; à minha irmã pelo carinho e por depositar em mim a responsabilidade de ser padrinho da minha afilhada linda e teimosa MARIA EDUARDA!!!

Um agradecimento especial é direcionado à Dra Monick Lyndenmeyer Guimarães que desde a graduação aceitou me orientar e estendeu esta tarefa ao mestrado, agradeço copiosamente pelo estímulo e entusiasmo revelado por esta dissertação, pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação, pela disponibilidade sempre revelada, pelo incansável apoio moral e, sobretudo pela amizade e confiança demonstradas.

À Dra Mariza Morgado, pela oportunidade e credibilidade concedida de fazer ciência no laboratório e pelas conversas de cunho científico onde adquiri parte do meu conhecimento em HIV/Aids.

Ao Gonzalo Bello pelas excelentes sugestões durante a execução do trabalho e excelentes papos na hora do almoço, além da grande dedicação e ajuda quando precisei.

Ao Dr. Pilotto pelo incentivo e ânimo quando a tese parecia um grande obstáculo e pelo papo sempre sadio durante o famoso cafezinho na copa, além é claro, da disponibilidade sempre oferecida em ler os parágrafos da discussão do manuscrito e dos meus abstracts.

Aos meus colegas do Mestrado, pela excelente relação pessoal que criamos e que espero que não se perca, pela ajuda e intercâmbio de ideias e informação para a elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos que me entenderam pela ausência e que me estimularam pela confiança em mim depositada, fazendo-me acreditar que era possível chegar ao fim com sucesso.

À minha grande amiga Joana que sempre me encorajou nos momentos críticos sem falar na revisão dos meus abstracts. Um máster beijo pra vuxê, rs.

À Thaysse pelas conversas no corredor e durante os experimentos, sem falar na hora do “coffe”, valeu Tata!!!.

À Bianca pela atenção e sempre disposição a ajudar os colegas e sem falar no seu lado hacker, beijos.

Gostaria de estender os meus agradecimentos a todos os colegas do laboratório de Aids que foram me ajudando, fornecendo informações, ideias e críticas, algumas das quais essenciais para a prossecução deste trabalho.

Outros amigos, ainda que não tenham contribuído em nada para a própria pesquisa, ou mesmo que em alguns casos não saibam muito de ciências, eu tenho que agradecer simplesmente por terem feito com que eu sáisse de casa, conversasse e, às vezes, bem às vezes, tomasse um “chá”, sempre que meus estudos estavam quase me atirando ao estado melancólico que, como todos sabem, está sempre à espreita.

Last but not least, agradeço ao CNPq pela bolsa que permitiu que eu me dedicasse, integralmente, ao longo de todo o mestrado, à minha pesquisa. Sei que esse agradecimento é obrigatório para todos os bolsistas, mas quero assegurar que, no meu caso, ele é bastante sincero. Honestamente, eu não sei se teria conseguido terminar esta tese se tivesse que dividir meu tempo entre ela e outro trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	página
Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças portadoras do HIV/AIDS, 2010.	2
Figura 2: Representação esquemática da partícula viral madura do HIV-1.	7
Figura 3: Organização genômica do provírus HIV-1.	11
Figura 4: Representação esquemática das etapas da fusão do vírion com a célula hospedeira.	13
Figura 5: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV.	14
Figura 6: Representação esquemática do ciclo de vida com co-infecção entre dois subtipos de HIV-1.	17
Figura 7: Classificação do HIV.	19
Figura8: Representação de genomas completos de algumas formas recombinantes circulantes.	19
Figura 9: Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes	21
Figura 10: Distribuição dos subtipos e formas circulantes recombinantes do HIV-1 no Brasil com ênfase no estado do Rio de Janeiro.	23
Figura 11: Análise filogenética por NJ com modelo de substituição de k2p , correspondente à região do C2-V3 do envelope viral (404pb) de 130 amostras indivíduos masculinos HIV-1 positivos do período de 1990-92	34
Figura 12: Análise por <i>bootscan</i> de duas amostras na região C2-V3 do envelope viral.	35
Figura 13: Análise filogenética dos dois fragmentos gerados a partir da análise do <i>bootscan</i> das amostras que apresentavam indícios de	36

recombinação.

Figura 14: Gráfico em barras representativo da frequência dos subtipos B e não-B de HIV-1 nas três categorias de exposição ao risco estudadas do período de 1990-92. 37

Figura 15: Gráfico em barras representativo das frequências das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 do período de 1990-92. 39

Figura 16: Análise filogenética por NJ com modelo de substituição de k2p , correspondente à região do C2-V3 do envelope viral (404pb) de 88 amostras indivíduos masculinos HIV-1 positivos do período de 2006-10 41

Figura 17: Análise por *bootscanning* de duas amostras de HIV-1 na região C2-V3 do envelope viral 42

Figura 18: Análise filogenética de NJ com modelo de substituição K-2p de três fragmentos menores gerados a partir da análise do *bootscan* da amostra PE115 que apresentava indícios de recombinação: a) fragmento I (6876-6995 em relação ao HXB2) b) fragmento II (6996-7135 em relação ao HXB2) c) fragmento III (7136-7279 em relação ao HXB2) d) Análise dos sítios informativos da amostra 115 a partir do consenso de sequências brasileiras dos subtipos B e F. 45

Figura 19: Gráfico em barras representativo da frequência dos subtipos B e não-B do HIV-1 nas duas categorias de exposição ao risco estudadas no período de 2006-10. 46

Figura 20: Gráfico em barras representativo da frequência das 47

assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 nas categorias de exposição ao risco HET e BIS das amostras do período de 2006-10.

Figura 21: Gráfico em barras representativo da frequência das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 na categoria de exposição heterossexual nos dois períodos de estudo. 49

Figura 22: Gráfico em barras representativo da frequência das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 na categoria de exposição bissexual nos dois períodos de estudo. 49

Figura 23: Análise filogenética por NJ com k2p correspondente à região da polimerase (1200pb) de 34 amostras do período de 1990-92 previamente caracterizadas no envelope 51

Figura 24: Análise filogenética por NJ com k2p correspondente à região da polimerase (1200pb) de 45 amostras do período de 2006-10 previamente caracterizadas no envelope 52

Figura 25: Análise filogenética realizadas pelo método de NJ com modelo de correção de k2p do fragmento parcial da polimerase (1200bp) das seis amostras identificadas como recombinantes na polimerase nas duas casuísticas. 54

Figura 26: Árvore Bayesiana das 117 amostras classificadas como subtipo B no período de 1990-92 na região do *env* (404pb). b) Destaque apenas para ramos com amostras da mesma categoria de exposição ao risco que se agruparam com valores de probabilidade acima de 0,8. 56

Figura 27: Árvore Bayesiana das 117 amostras caracterizadas como subtipo B do período de 1990-92 na região do *env* (404pb). 58

Figura 28: Árvore Bayesiana das 74 amostras caracterizadas como subtipo B do período de 2006-10 na região do *env* (404pb). 60

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1: Estratégia de amplificação das regiões <i>env</i> e <i>pol</i> do HIV-1	27
Tabela 2: Iniciadores a serem utilizados na reação de sequenciamento das regiões <i>gp120</i> e <i>pol</i> .	28
Tabela 3: Distribuição das amostras do período de 1990-92 nos subtipos (B e não- B) nas três categorias de exposição ao risco (HET, BIS e UDI)	37
Tabela 4: Dispersão das assinaturas do subtipo B nas distintas categorias de exposição ao risco das amostras coletadas no período de 1990-1992 no Rio de Janeiro	38
Tabela 5: Distribuição das amostras do período de 2006-2010 por subtipo (B e não- B) e nas duas categorias de exposição ao risco (HET e BIS)	46
Tabela 6: Distribuição das assinaturas moleculares do subtipo B nas duas categorias de exposição ao risco identificadas no período de 2006-2010	47
Tabela 7: Distribuição das assinaturas moleculares do subtipo B na categoria de exposição heterossexual nas duas casuísticas do estudo	48
Tabela 8: Distribuição das assinaturas moleculares do subtipo B na	49

categoria de exposição bissexual nas duas casuísticas do estudo

Tabela 9: Teste de agrupamento filogenético das sequências de HIV do Rio de Janeiro do período de 1990-92 segundo a categoria de exposição ao risco. 55

Tabela 10: Teste de agrupamento filogenético das sequências do subtipo B do HIV de acordo com as assinaturas moleculares do topo do v3 de amostras do Rio de Janeiro do período de 1990-92 57

Tabela 11: Teste de agrupamento filogenético das sequências do subtipo B do HIV de acordo com as assinaturas moleculares do topo do v3 de amostras do Rio de Janeiro do período de 2006-10 59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BIS	Bissexuais masculinos
CCR-5	Receptor de alfa quimiocinas5
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CRF	Forma Recombinante Circulante
CXCR-4	Receptor de Beta-quimiocinas 4
ddNTP	Dideoxynucleotídeo trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
env	Gene que codifica as glicoproteínas do envelope viral
gp120	Glicoproteína de 120 Kd
gp41	Glicoproteína de 41kD
HET	Heterossexuais masculinos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOMO	Homossexuais masculinos
HXB2	Isolado Viral do HIV-1

Kb	Kilobase
K2p	Kimura dois parâmetros
LAV	Vírus Associado à Linfadenopatia
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NaCl₂	Cloreto de Sódio
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
RNA	Ácido Ribonucléico
RT	Transcriptase Reversa
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
UNAIDS/WHO	Programa das Nações Unidas no Combate ao HIV/AIDS
URF	Forma Recombinante Única

SUMÁRIO

I – Introdução

1.1 – Dados Epidemiológicos	1	
1.2 – Histórico	4	
1.3 – O agente etiológico da AIDS	5	
1.4 – Partícula Viral	6	
1.5 – Organização genômica		8
1.6 – Ciclo replicativo do HIV	12	
1.7 – Evolução e Mecanismos geradores da diversidade	14	
1.8 – Diversidade genética e epidemiologia molecular	17	
1.9 – Epidemiologia Molecular no Brasil	21	

II – Objetivos

2.1 – Objetivo Geral	24
2.2 – Objetivos Específicos	24

III – Materiais e Métodos

3.1 – Casuística	25
3.2 – Extração de DNA	26
3.3 – Amplificação por <i>nested</i> PCR das regiões <i>env</i> e <i>pol</i>	26
3.4 – Amplificação por PCR do gene da β -globina	27
3.5 – Purificação e quantificação dos produtos de PCR para seqüenciamento	27
3.6 – Reação de seqüenciamento	28
3.7 – Análise e edição de seqüências	29
3.8 – Análise das sequências deduzidas de aminoácidos na região <i>gp120</i>	30
3.9 – Identificação de genomas recombinantes	30
3.10 – Análise Bayesiana	31
3.11 – Análises estatísticas	31

IV – Resultados

4.1 – Subtipagem molecular da região do C2-V3 da <i>gp120</i> do envelope viral das amostras coletadas no período de 1990-92	32
--	----

4.2 – Distribuição dos subtipos nas categorias de exposição ao risco da casuística do período de 1990-92	37
4.3 – Caracterização molecular do C2-V3 da gp120 do envelope viral de amostras diagnosticadas e coletadas no período de 2006-2010	39
4.4 – Distribuição dos subtipos nas categorias de exposição ao risco da casuística do período de 2006-2010	46
4.5 – Análise temporal dos subtipos nas categorias de exposição ao risco	47
4.6 – Dinâmica temporal da recombinação	50
4.7 – Estudo da relação entre as formas recombinantes detectados e os CRFs descritos	53
4.8 – Estudo das redes de transmissão entre as amostras do período de 1990-1992	55
4.9 – Estudo da dispersão das assinaturas moleculares do subtipo B nos dois períodos estudados (1990-92 e 2006-10)	57
V – Discussão	
5.1 – Diversidade e dinâmica dos subtipos B e F1 no Rio de Janeiro	61
5.2 – Análise temporal dos subtipos nas distintas categorias de exposição ao risco	65
5.3 – Estudo filogenético das formas recombinantes	68
5.4 – Estudo das redes de transmissão do subtipo B entre os grupos de risco	69
VI – Conclusão	71
VII – Referências Bibliográficas	72



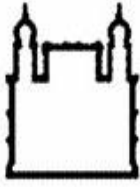
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

PIMENTEL, VF. Estudo temporal e dinâmica da diversidade do HIV-1 no Rio de Janeiro.
Dissertação de mestrado- Pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária.2011

Estudos de epidemiologia molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1) realizados no Rio de Janeiro permitiram identificar predominantemente a cocirculação dos subtipos B, da variante B'' do subtipo B, F1 e formas recombinantes

BF1. Sendo assim, o objetivo desse estudo era traçar a dinâmica temporal dos subtipos e formas recombinantes de HIV-1 em diferentes categorias de exposição ao risco: heterossexuais (HET), bissexuais (BIS) e usuário de drogas injetáveis (UDI) em dois distintos períodos [(1990-92) e (2006-2010)] da epidemia de Aids no Rio de Janeiro. A casuística deste trabalho era composta por indivíduos HIV-1 soropositivos de dois distintos períodos da epidemia de HIV/AIDS, sendo o primeiro de amostras coletas entre 1990-92 (n=130) e o segundo composto por amostras de pacientes diagnosticados entre 2006-2010 (n=88). A subtipagem das amostras foi realizada através da filogenia pelo método de NJ com correção K2p (MEGA 4.0) e a recombinação avaliada pelo bootscan (Simplot 3.2), análise de pontos e árvore de fragmentos. Para entendermos a dinâmica das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça v3 e a sua distribuição nas distintas categorias exposição de risco realizamos a análise Bayesiana (MrBayes). A análise filogenética da região da gp120 foi realizada para o primeiro período e evidenciou uma prevalência do subtipo B (90%) seguida pelo subtipo F1 (8%) e BF1 (2%). No segundo período do estudo identificamos a seguinte prevalência: (84%) do subtipo B, (9%) F1, (3.5%) C, (2.3%) BF1 e (1.2%) subtipo A. Em geral, das amostras 95 de HET e BIS caracterizadas como subtipo B no primeiro período, 40% tinham a assinatura GPG, 43% GWG e 17% GXG. Na segunda coorte, o subtipo B foi detectado em 74 amostras sendo: 62% GPG, 23% GWG e 15% GXG. A distribuição das variantes do subtipo B do HIV-1 nos dois períodos foi respectivamente: HET (GPG) [60%-69%], (GWG) [20%-13%] e (GXG) [20%-19%] e BIS (GPG) [25%-57%], (GWG) [61%-31%], (GXG) [14%-12%]. O estudo das redes de transmissão dos subtipo B realizado com as amostras do primeiro do estudo que nos permitiu detectar uma distribuição não aleatória destas segundo a categoria de exposição ao risco e assinaturas do topo do v3. De um subconjunto de 79 amostras de ambas coortes, que foram caracterizadas na região da polimerase, 8% apresentaram um perfil de recombinação, sendo estas caracterizadas majoritariamente como URFs e apenas uma amostra CRF40_BF-like. Nossos achados indicam uma redução na frequência da variante B” ao longo do tempo, e sugere que a introdução da variante B” no Rio de Janeiro estava relacionado ao grupo dos BIS.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

PIMENTEL, VF. Temporal study and diversity dynamics of HIV-1 in Rio de Janeiro. **Dissertação de mestrado- Pós-graduação *strictu sensu* em Biologia Parasitária.2011**

Human Immunodeficiency virus (HIV-1) molecular epidemiology studies carried out in Rio de Janeiro, Brazil, have identified the predominance of the co-circulation of subtypes B, B' variant, F1 and BF1 recombinants. Thus, the aim of this study was trace the temporal dynamic of subtypes and recombinants forms of the HIV-1 in different exposure categories: heterosexuals (HET), bisexuals (BIS) and injecting drug users (IDU) in two distinct periods [(1990-1992) and (2006-2010)] of the AIDS epidemic in Rio de Janeiro. The subjects of this study were composed of HIV-1 seropositive individuals from two distinct periods of the HIV/AIDS epidemic. The first samples were collected from 1990-1992 (n = 130) and the second batch of samples from patients diagnosed between 2006-2010 (n = 88). The subtyping of the samples was performed by the method of phylogeny NJ with K2p correction (MEGA 4.0) and the recombination was evaluated by bootscan (Simplot 3.2), point analysis and tree fragments. To understand the dynamics of molecular signatures of subtype B on the motif at the tip of the V3 loop, and its distribution in the different exposure categories, we applied the Bayesian analysis (MrBayes). Phylogenetic analysis of gp120 region was performed for the first period and a prevalence of subtype B (90%) was observed, followed by subtype F1 (8%) and BF1 (2%). In the second period of the study we identified the following prevalence: (84%) subtype B, (9%) F1, (3.5%) C, (2.3%) BF1 and (1.2%) of subtype A. Overall, 95 samples

from HET and BIS were characterized as subtype B in the first period, 40% were GPG, 43% GWG and 17% GXG. In the second cohort, subtype B was detected in 74 samples: GPGR (62%), GWGR (23%), and GXGR (15%). The distribution of the HIV-1 subtype B variants in the two periods were, respectively: HET (GPG) [60%-69%], (GWG) [20%-13%] e (GXG) [20%-19%] e BIS (GPG) [25%-57%], (GWG) [61%-31%], (GXG) [14%-12%]. The study of subtype B transmission network carried out within the samples from the first period of this study allowed us to detect a non random distribution, such as the category exposure and signatures from the top of v3. From a subset of 79 samples from both cohorts, which were analyzed in the polymerase region, 8% showed a recombination profile and were characterized mostly as URFs, with only one sample characterized as CRF40_BF-like. Our findings indicate a reduction of the frequency for the B' variant over time and suggest that the introduction of the B' variant in Rio Janeiro was possibly related to the BIS group.

I. Introdução

1.1) Dados Epidemiológicos

O vírus da Imunodeficiência humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) (COFFIN *et al.*, 1986A). Passadas quase três décadas da identificação da Aids, a pandemia causada por este vírus tornou-se uma das mais devastadoras da história da humanidade e está mais estreitamente relacionada a populações economicamente ativas, o que leva a grandes problemas sócio-econômicos em países emergentes. (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2008).

Com base nos dados da UNAIDS estima-se que vivam no mundo cerca de 33,3 milhões de adultos e crianças infectados pelo HIV (Figura 1), deste conjunto, 2,6 milhões de novos casos foram descritos em 2009. O número de pessoas que morreram em consequência da Aids neste mesmo ano foi de 1,8 milhões, o que aponta um decréscimo quando comparados aos dados de 2004, onde se estimou 2,1 milhões de mortes relacionadas à Aids, este fato associa-se a maior disponibilidade à terapia antirretroviral e ao melhor suporte às

peças infectadas com o HIV em países de média e baixa renda (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010). Com a intensificação dos programas de prevenção da AIDS e o comportamento mais consciente por parte da população, a prevalência e incidência dos casos de HIV/AIDS nos últimos anos tenderam a estabilizar, não obstante, o aumento do número de casos por consequência da alta densidade demográfica mundial e da melhora da expectativa de vida por consequência da terapia antirretroviral tem sido observado (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010).

Ao longo de quase três décadas de convívio com a infecção pelo HIV, constataram-se mudanças importantes no perfil epidemiológico da Aids. Nos primeiros anos da epidemia a maioria dos casos estava relacionada com determinados comportamentos/situações de risco tais como: homo/bissexuais masculinos, hemofílicos/receptores de sangue e usuários de drogas injetáveis. Com o passar do tempo a disseminação da infecção pelo HIV alcançou outros segmentos da população através da transmissão heterossexual, a qual tem sido responsável pelo aumento no número de casos de Aids em mulheres e consequentemente em crianças (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010). Com base nos dados publicados pela UNAIDS em 2010, salienta-se que a África Sub-Saariana, epicentro da epidemia de Aids, concentra o maior número de casos de adultos e crianças infectados pelo HIV: cerca de 22,5 milhões, dos quais 1,8 milhões são casos de pessoas recentemente infectadas, dentre eles, adultos e crianças. (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010). Do total de pessoas infectadas, mais de 50% são mulheres, o que acarreta no número acentuado de crianças que contraíram o vírus por transmissão vertical nesta região.

Do total estimado de 33,3 milhões de pessoas vivendo com HIV no mundo, cerca de 1,4 milhões encontram-se nas Américas do Sul e Central (Figura 1), dos quais 92.000 adultos e crianças que foram recentemente infectados. Aproximadamente 58.000 pessoas morreram devido a AIDS em 2009 na América Latina (AIDS EPIDEMIC UPDATE, 2010).

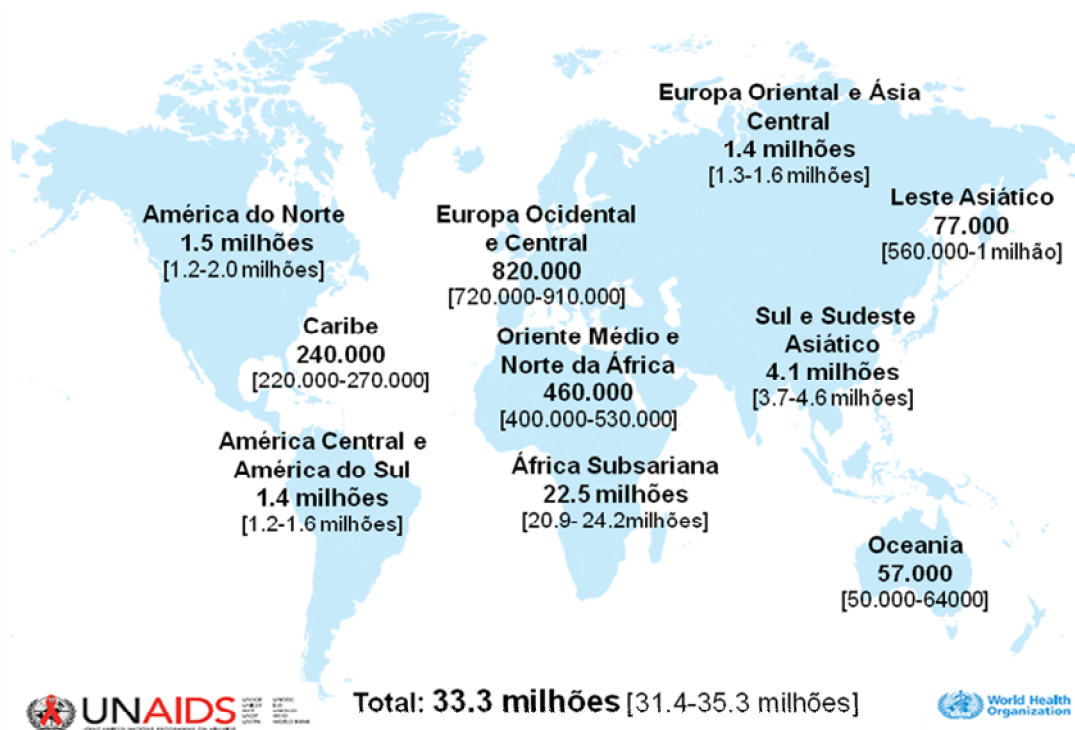


Figura 1: Estimativa do número de adultos e crianças portadoras do HIV/AIDS, 2010. Fonte: www.Unaids.org

Do total de casos notificados de pessoas portadoras do HIV na América do Sul, grande parte concentra-se no Brasil, devido a sua dimensão territorial e ao contingente populacional. As políticas de prevenção à Aids, tais como, as campanhas de conscientização da população quanto aos riscos de contaminação, a distribuição gratuita de preservativos, seringas e agulhas, assim como as políticas de tratamento, que torna universal o acesso aos antirretrovirais, reduzindo assim diretamente as taxas de transmissão vertical e indiretamente as taxas de transmissão em consequência de um maior controle da carga viral, desde o início dos anos noventa contribuem para a contenção da epidemia no Brasil.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou-se que, no Brasil, aproximadamente 630 mil indivíduos entre 15 a 49 anos eram portadoras do HIV em 2006 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010). Tomando como referência os parâmetros estabelecidos pela OMS, a epidemia de Aids no país é concentrada, ou seja apresenta taxa de prevalência da infecção pelo HIV menor que 1% entre parturientes, residentes em áreas urbanas, e maior que 5% em subgrupos populacionais sob maior risco para infecção pelo HIV(BOLTIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010).

De acordo com o último Boletim epidemiológico, com dados da epidemia brasileira de 1980 a junho de 2009, foram notificados 544.846 casos acumulados de Aids em todo o país.

A divisão destes segundo a região geográfica deu-se da seguinte forma, 21.389 casos na região Norte (4%); 64.706 na região Nordeste (12%); 323.069 na região Sudeste (59%); 31.011 na região Centro-Oeste (6%); 104.671 na região Sul (19%) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010).

A taxa de incidência vem apresentando tendência à estabilização, em patamares elevados nos últimos anos e, em 2008, atingiu 18,2 por 100.000 habitantes. Contudo, os dados indicam expressivas diferenças regionais, com declínio da taxa de incidência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, e aumento nas regiões Norte, Nordeste e Sul no período de 2000 a 2008. Na série histórica de 1980 até 2009, foram identificados no Brasil 356.427 casos de Aids. A razão entre o número de casos segundo o sexo, masculino : feminino (M:F) sofreu significativa redução do início da epidemia até os dias atuais. Em 1986, a razão M:F era de 15,1:1 e, a partir de 2002, estabilizou-se em 1,5:1 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010). No que tange a via de transmissão sexual entre os homens, 63,2% dos casos notificados no SINAN no período de 1980 até 2009, 20,6% dos casos reportam-se ao grupo de homossexuais (HOMO); 12% ao grupo de bissexuais (BIS); 30,6% ao grupo de heterossexuais (HET).

Uma análise temporal dos dados publicados pelo boletim epidemiológico do município do Rio de Janeiro, nos mostram que 33.985 casos acumulados de Aids já foram notificados na cidade do Rio de Janeiro. A distribuição por sexo dos 33.090 casos notificados em adultos desde 1984 mostra que 23.791 (72%) ocorreram em homens e 9.299 (28%) em mulheres, de modo que a razão M:F é de 2,6, com uma diminuição progressiva desta razão início da epidemia até o final dos anos 90, indo de 13:1 em 1984 para 1,9, em 1999. A partir de então, se observa uma relativa estabilização desta razão, com aproximadamente 1,7 casos diagnosticados a cada ano entre homens para cada caso diagnosticado entre mulheres (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, 2008).

Com realação a categorização segundo o grupo de risco entre os casos notificados, observa-se uma mudança do início da epidemia para os dias atuais. Dentre os homens, houve uma diminuição progressiva na proporção de casos atribuídos a relações HOMO, especialmente marcante na primeira década da epidemia de Aids no Rio de Janeiro, onde contabilizava mais de 60% dos casos e a partir de então, observa-se uma estabilização na proporção de casos novos em torno de 40%. Por outro lado, houve um aumento na proporção de casos atribuídos aos HET, se no início da epidemia, a transmissão heterossexual era atribuída a menos de 10% dos casos, atualmente esta responde por aproximadamente 30% dos novos casos de Aids no Rio de Janeiro (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, 2008).

1.2) Histórico

A Aids foi reportada pela primeira vez em 1981 pela identificação de cinco homossexuais masculinos nos Estados Unidos, quando observou-se o surgimento de infecções como sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis carinii*, consideradas raras em indivíduos saudáveis (GOTTLIEB *et al.*, 1981; SIEGAL *et al.*, 1981). O primeiro relato da possibilidade de transmissão sexual do novo vírus foi em 1982. Neste mesmo ano foi identificado o primeiro caso de Aids em um homem heterossexual que fazia uso de drogas injetáveis (GOLD *et al.*, 1982). Em seguida foram notificados casos de Aids em mulheres parceiras sexuais de homens com Aids e em consequência de crianças infectadas verticalmente. Nesta época ficou claro que se tratava de uma síndrome infecciosa, provavelmente de etiologia viral.

No ano de 1983, um grupo de pesquisadores liderados por Luc Montanier do Instituto Pasteur, em Paris na França, isolaram o agente causador desta nova patologia, sendo este denominado de “Lymphadenopathy-Associated Vírus” (LAV) (BARRE-SINNOUSSI *et al.*, 1983). No ano seguinte o grupo americano liderado por Robert Gallo isolou o vírus e o denominou de “Human T-lymphotropic Vírus Type III” (HTLV-III) (POPOVIC *et al.*, 1984). Somente em 1986 o Comitê Internacional dos Vírus renomeou o vírus da Aids como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (COFFIN *et al.*, 1986b).

No Brasil os primeiros casos de AIDS identificados datam de 1982, e a difusão da epidemia ocorreu primeiramente nas capitais metropolitanas do Sudeste, seguida de disseminação para diversas macrorregiões (Ministério da Saúde Brasília, 1998). O primeiro isolamento do HIV no Brasil foi realizado na Fundação Oswaldo Cruz em 1987 pelo grupo liderado pelo Dr. Bernardo Galvão Castro (Galvão-Castro *et al.*, 1987).

1.3) O agente etiológico da AIDS

O HIV é um retrovírus, que pertence à família *Retroviridae*, vírus com genoma RNA que possui seu genoma proviral reversamente transcrito pela transcriptase reversa, e ao gênero *Lentivirus*, que tem como importante característica o longo período de incubação entre a

infecção e o início das manifestações clínicas, além de danos progressivos no sistema imune de seu hospedeiro.

Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 estão relacionados filogeneticamente a certos vírus de macacos africanos, isto é, aos Vírus da Imunodeficiência Símia (SIVs), com os quais apresentam uma similaridade na organização do genoma viral, coincidências geográficas e rotas de transmissão plausíveis reforçam a transmissão zoonótica destes lentivírus de primatas não humanos para os humanos (GAO *et al.*, 1999).

Na tentativa de compreender melhor a origem do HIV-1, Gao e colaboradores em 1999 analisaram a filogenia dos isolados de SIV conhecidas e identificaram duas linhagens principais e divergentes que infectam duas subespécies de chimpanzés, uma da África Central: *Pan troglodytes troglodytes*, e outra da África Oriental: *Pan troglodytes schweinfurthii*. Apenas a linhagem que infecta *Pan troglodytes troglodytes* mostrou estar relacionada com o HIV-1 e parece ter originado as linhagens do grupo M e N. Outra forte evidência é que esta variante foi encontrada na mesma área geográfica da África onde podem ser encontrados todos os grupos do HIV-1 e seus subtipos. Assim, o chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* é considerado o reservatório primário do HIV-1 (HAHN *et al.*, 2000).

O grupo O do HIV-1 parece ter como reservatório animal a espécie de gorila selvagem (VAN HEUVERSWYNF *et al.*, 2006). Mais recentemente, grupo P do HIV-1 foi descrito em uma mulher de Camarões, este vírus parece ter uma relação filogenética estreita com o vírus da Imunodeficiência Símia de gorila (SIVgor) (PLANTIER *et al.*, 2009).

1.4) Partícula viral

A partícula viral infecciosa do HIV (Figura 2) tem simetria icosaédrica e aproximadamente 110 nm de diâmetro. A partícula viral é envolvida por uma bicamada fosfolipídica, derivada da célula hospedeira durante o brotamento dos vírions (GOTO *et al.*, 1994). O envelope apresenta estruturas oligoméricas das glicoproteínas *gp120* e *gp41* (Revisto por GOTO *et al.*, 1998). Na face interna do envelope viral encontramos a matriz (MA) formada pela proteína p17. Algumas funções desta matriz têm sido propostas, incluindo a sua participação na maturação da partícula viral e na incorporação das glicoproteínas do envelope na partícula viral (RUBBERT & OSTROWSKI, 2005). Estudos a partir de microscopia eletrônica revelaram uma estrutura interna e eletro-densa, denominada capsídeo (CA). O capsídeo viral geralmente cônico é constituído pela proteína p24 (RUBBERT &

OSTROWSKI, 2005). O material genético do HIV consiste de duas fitas de RNA, com cerca de 9,7 Kb, as quais, em conjunto com as enzimas virais e as proteínas acessórias encontram-se envoltas por um invólucro de proteínas virais conhecidas por nucleocapsídeo (NC) (Revisto por GOTO *et al.*, 1998).

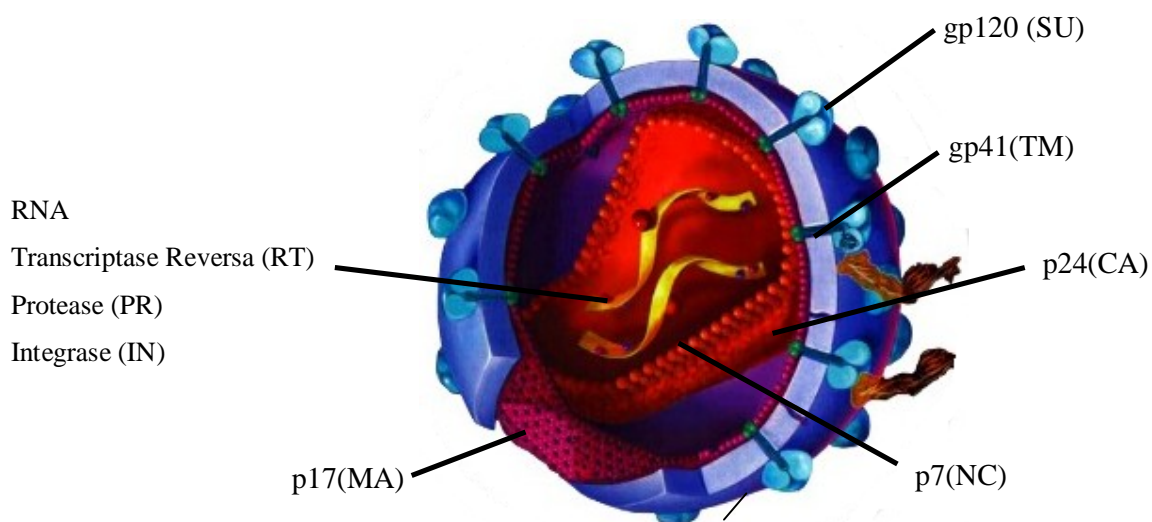


Figura 2: Representação esquemática da partícula viral madura do HIV-1, em destaque as proteínas estruturais e as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase responsáveis pela replicação e integração do genoma do vírus ao genoma do hospedeiro. Fonte: Adaptado (http://rlv.zcache.com/hiv_virus_hiv_aids_charity_sticker-p217015526087446503qjcl_400.jpg).

1.5) Organização genômica

Quando seqüências do HIV-1 começaram a ser analisadas, descobriu-se que ao contrário dos retrovírus padrões como, o Vírus da Leucemia Aviária (ALV) e o Vírus da Leucemia Murina (MuLV), o HIV não apresentava apenas os três genes comumente encontrados neles: antígeno-grupo específico (*gag*), polimerase (*pol*) e envelope (*env*). Seis outros genes, dos quais dois regulatórios, o transativador da transcrição e o regulador da expressão do víron, respectivamente *tat* e *rev* e quatro genes acessórios o fator de infectividade do vírus (*vif*), proteína viral R (*vpr*), proteína viral U (*vpu*) e fator de regulação negativa (*nef*), os quais se encontram arranjados de forma complexa entre as três fases de leitura (ORF's "open reading frame") (Figura 3).

Flanqueando as OFRs, encontram-se as LTRs (*Long terminal repeats*) que se caracterizam por serem seqüências idênticas, longas e repetidas localizadas nas extremidades 5' e 3', as quais são integradas após a transcrição do genoma proviral em DNA. Estes são divididos em três regiões definidas como U5, R e U3 que apresentam características diferentes. Todos os sinais para expressão dos genes são encontrados no LTR (promotor, iniciação de transcrição, terminador de transcrição e sinal de poliadenilação). Alguns sinais regulatórios da transcrição estão contidos na região U3 do 5' LTR e a região TATAA *Box* localiza-se a cerca de 25pb a partir do início da região R. O LTR 3' normalmente não é funcional como promotor, embora tenha a mesma seqüência que a 5' LTR. Em vez disso, age na terminação da transcrição e poliadenilação, entretanto, quando a integridade do 5' LTR é comprometida o 3' LTR funcione como promotor. (revisado por FREED & MARTIN, 2001).

O primeiro gene localizado no terminal 5' do genoma do HIV é o gene *gag*. As proteínas formadas a partir de *gag*, são sintetizadas na forma de um precursor poliprotéico, que foi nomeado com base na massa molecular deste polipeptídeo, Pr55^{gag}. O mRNA para produção do Pr55^{gag} não é processado, possui 9,2kb e requer Rev para ser transportado para o citoplasma (Luciw, 1996). Durante a maturação dos vírus ocorrem as clivagens destes polipeptídios em seis proteínas de *gag*, do sentido N terminal ao C terminal da molécula são geradas p17, p24, p2, p7, p1 e p6. Durante a tradução de *gag* pode ocorrer um deslizamento do ribossomo na região p1, graças à presença de uma região rica em "U", levando à mudança na fase de leitura (JACKS *et al.*, 1988) gerando um precursor maior P160^{gag-pol}, este quando clivado proteoliticamente, gera as proteínas de *gag* e *pol*.

O *pol* é o segundo gene na organização genômica do HIV sendo o responsável por codificar as três enzimas do HIV: protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN), tendo os seus produtos derivados do precursor P160^{gag-pol} (revisado por FREED., 2001). A proporção de formação de P160^{gag-pol} e de Pr55^{gag} é de 1:20 (SHEHU-XHILAGA *et al.*, 2001).

Das enzimas oriundas do gene da polimerase, a protease do HIV-1, responsável pelo processamento traducional das poliproteínas viral Gag e Gag-pol, transformando-as nas proteínas estruturais e enzimas presentes no vírion, é uma protease aspártica composta por dois monômeros não covalentemente associados e idênticos entre si de 99 aminoácidos em comprimento. Seu sítio ativo assemelha-se ao de outras proteases aspárticas e contém a tríade Asp - Thr - Gly nas posições 25-27 (TURNER & SUMMERS, 1999). O sítio hidrofóbico de clivagem reconhece e cliva 9 segmentos de seqüências para produzir a matriz, o capsídeo, o nucleocapsídeo, as proteínas p6 da poliproteína Gag, além da protease, transcriptase reversa e integrase. A enzima contém uma região flexível conhecida como “flap” que se fecha sobre o sítio ativo quando ligada ao substrato. A transcriptase reversa (RT) do HIV é capaz de converter o seu genoma de fita simples de RNA em uma dupla fita de DNA viral. A RT do HIV apresenta três atividades fundamentais: a DNA polimerase dependente de RNA, sintetizando a fita de DNA negativo, a atividade RNase H, utilizada para degradação do RNA viral, e a atividade de DNA polimerase dependente de DNA, gerando a fita positiva de DNA (SEVILYA *et al.*, 2001; WILHELM *et al.*, 2001). A RT incorpora nucleotídeos numa taxa de 20 nucleotídeos por segundo e, como todas as DNA polimerases, a RT necessita de um agrupamento 3' OH do iniciador durante a síntese de cDNA. A extremidade 3' OH do iniciador no complexo RT-RNA está posicionado de forma que fique próximo ao sítio ativo para o ataque nucleofílico do nucleotídeo recém chegado. A integrase é enzima necessária para que o DNA viral seja inserido no genoma da célula hospedeira humana, processo indispensável para que o vírus possa utilizar o maquinário celular para produzir novos vírions. (revisado por FREED, 2001).

O gene *env* é o responsável por codificar as proteínas do envelope viral, o qual tem o seu precursor gp160, que é traduzido no retículo endoplasmático da célula hospedeira e então é encaminhado para o complexo de golgi sendo glicosilado e clivado por proteases celulares em *gp120* e *gp41*, que são proteínas de superfície e transmembranar, respectivamente. É na *gp120* que são encontrados os sítios de ligação para os receptores celulares e, portanto, importantes domínios a serem neutralizados com a finalidade de se interromper o ciclo viral. O complexo *gp120-gp41* encontra-se numa dupla cadeia lipídica derivadas das membranas das células e onde estão, também, inúmeras proteínas celulares, incluindo antígenos de

histocompatibilidade, actina e ubiquitinam (TURNER & SUMMERS, 1999). Estas duas proteínas são indispensáveis nas etapas de adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira (CLAPHAM, WEISS, 1997).

O gene *tat* (transativador da transcrição) é fundamental durante o processo replicativo do vírus. Uma vez sintetizada, *tat* liga-se aos fatores celulares da transcrição e medeia sua fosforilação, levando a um aumento significativo nos níveis de transcritos virais no interior da célula infectada (KIM & SHARP, 2001). Alguns estudos apontam a eficiência da replicação do HIV como um fator crítico para a progressão da infecção, neste contexto a proteína Tat executa um papel fundamental (NIYASOM *et al.*, 2009).

O principal papel da proteína Rev é regular a expressão de proteínas do HIV através do controle da taxa de exportação de mRNAs do núcleo para o citoplasma. Os mRNAs do HIV são produzidos a partir do transcrito primário que sofrem uma série de transformações (processamento do RNA). Embora, os transcritos de *gag* e *gag-pol* não sofram processamento, os transcritos dos genes *vif*, *vpr*, *vpu* e *env* sofrem algum tipo de processamento. Com a finalidade de garantir a integridade desses transcritos, a proteína Rev, liga-se a uma sequência de nucleotídeos denominada RRE (rev- responsive element) permitindo o fluxo dos mesmos do núcleo para o citoplasma) (FELBER *et al.*, 1989; FREED *et al.*, 2001).

O gene *vif* (fator de infectividade do vírus) codifica uma proteína citoplasmática de 23 kD cuja função é aumentar significativamente a infecciosidade do vírion. A proteína é encontrada no interior das células infectadas pelo HIV, e a mesma atua interferindo no papel de uma proteína de restrição celular chamada APOBEC3G. Vif induz a célula a degradar a proteína APOBEC3G. Estudos *in vitro* mostraram que a construção de partículas virais sem o gene *vif* (delta *vif*) comprometiam o potencial desses vírus em infectar novas células (ROSE *et al.*, 2004; NAVARRO *et al.*, 2004; ARGYRIS *et al.*, 2004).

O gene *vpr* (proteína viral R) cujo tamanho aproxima-se dos 15 kD. Dentre as inúmeras funções conhecidas este acelera a expressão de proteínas do HIV, carrega "os sinais de localização nuclear" (seqüências de proteínas que são reconhecidas pela maquinaria celular indicando que ele deve ser transportado para o núcleo) e, em certo sentido, imita o comportamento de uma proteína chamada beta importina (HEINZINGER *et al.*, 1994), Interrompe o ciclo celular na fase G2/M, que parece ser o cenário confortável para a replicação viral (HE *et al.*, 1995).

O gene *vpu* que codifica a proteína integral de membrana (proteína viral U) tem como principais funções, auxiliar na montagem de novas partículas virais, no brotamento da

partícula viral da célula hospedeira e degradação das moléculas CD4 que ficam na superfície das células infectadas diminuindo o risco de superinfecção (revisto por BOUR & STREBEL, 2003).

O gene *nef* codifica uma grande proteína acessória, cujo papel é bastante crítico na biologia da infecção pelo HIV. Dentre as suas principais funções destaca-se a regulação negativa da expressão de moléculas CD4 e moléculas de MHC classe I na superfície das células infectadas (SCHWARTZ *et al.*, 1996). A proteína Nef do HIV parece ser capaz de gerar condições as quais permitem que o vírus entre em células não ativadas (SPINA *et al.*, 1994). Macrófagos infectados pelo HIV-1 liberam, de maneira dependente de Nef, fatores solúveis que podem deixar as células T susceptíveis à infecção (SWINGLER *et al.*, 2003). Nef pode ser expresso ainda antes do estabelecimento do provírus, tornando a célula permissiva à infecção pelo HIV (WU & MARSH, 2001)

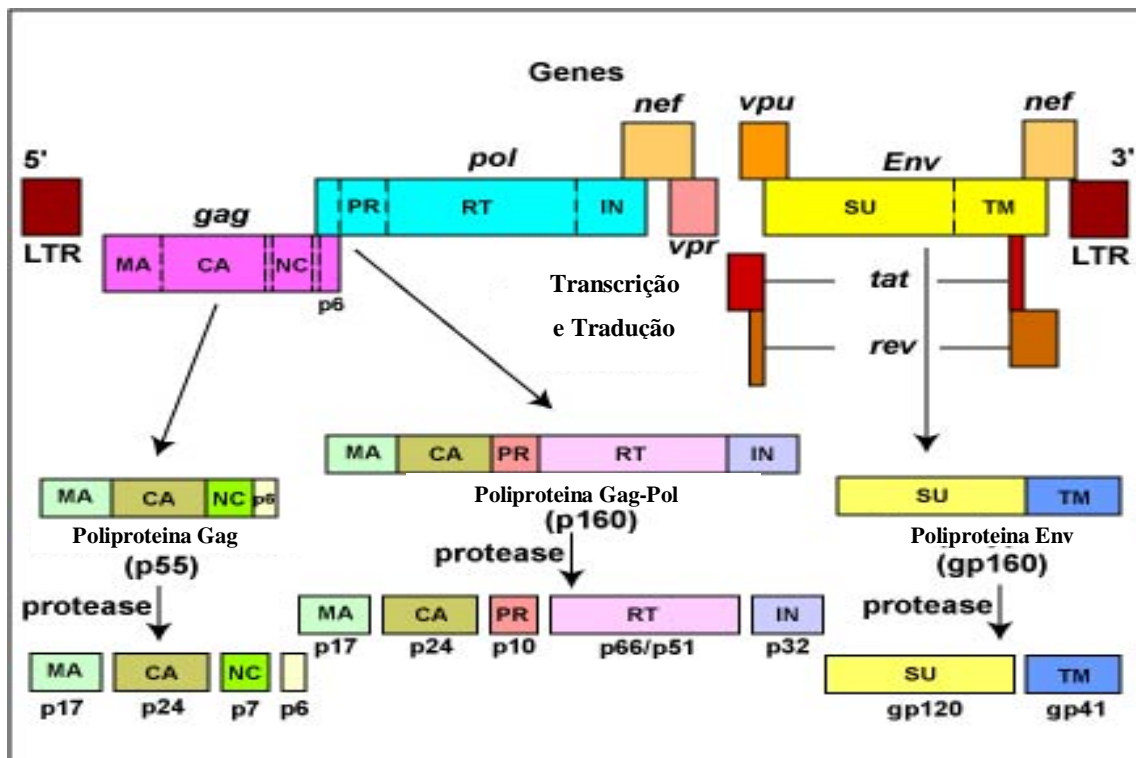


Figura 3: Organização genômica do provírus HIV-1. Destacando as poliproteínas de Gag, Gag-pol e Env e as proteínas virais pós processamento proteolítico da protease viral. Fonte: Modificado a partir de “Dr. Kaiser’s Microbiology Website” (<http://student.cbcmd.edu/courses/bio141/lecguid/unit3/viruses/hivgenes.html>) em março de 2008.

1.6) Ciclo replicativo do HIV

O processo replicativo do HIV ocorre em duas fases. A fase inicial que compreende a adsorção, fusão, desnudamento, transcrição reversa e integração do genoma viral ao cromossomo da célula hospedeira terminando com a formação do provírus. E a fase tardia caracteriza-se pela expressão regulada do genoma proviral e todos os processos que levam à montagem e a maturação do vírus. (TURNER & SAMMERS, 1999).

A primeira etapa do ciclo replicativo do HIV-1 é a ligação da partícula viral aos receptores presentes nas células-alvo. Primeiramente, a glicoproteína de superfície *gp120* liga-se à molécula CD4, o principal receptor para o HIV, presente em linfócitos T auxiliares, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células da micróglia do sistema nervoso central (revisto por GOMEZ & HOPE, 2005). A infecção pelo HIV leva a diminuição da expressão da molécula CD4 na superfície celular, fazendo com que as células infectadas tornem-se menos suscetíveis a novas infecções (FREED 2001). Essa ligação induz mudanças conformacionais na proteína *gp120*, levando à exposição de sítios que se ligam aos receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4, correceptores para o HIV. Este evento pode ser ilustrado na figura 4 (TURNER & SUMMERS 1999).

Na etapa seguinte ocorre a fusão entre a membrana celular e o envelope viral. A interação entre a proteína *gp120* e o receptor CD4 (Figura 4.2) gera alterações conformacionais do complexo *gp120-gp41*, permitindo a inserção do peptídeo de fusão, domínio altamente hidrofóbico da proteína transmembranar *gp41*, na membrana da célula-alvo (Figura 4.3), e a conseqüente aproximação das membranas (Figura 4.4). O conteúdo do capsídeo é, então, liberado no citoplasma (LEAVITT *et al.* 2004).

A transcrição reversa do RNA viral inicia-se a partir da ligação de um iniciador de tRNA complementar a um sítio próximo à extremidade 5' do RNA viral. A partir deste iniciador, a enzima transcriptase reversa sintetiza um segmento de DNA, complementar ao RNA, na direção 5'. Este segmento de DNA sintetizado é translocado para o término 3' da molécula, para completar a síntese da fita de DNA. Concomitantemente a enzima RNase H é necessária para degradar o RNA do híbrido DNA-RNA. A síntese da fita de DNA complementar é realizada pela atividade DNA-polimerase RNA dependente da transcriptase reversa.

O DNA viral é transportado para o núcleo juntamente com a enzima integrase, integrando-se, então, ao genoma hospedeiro, assumindo a forma conhecida como provírus. Posteriormente ocorre a transcrição do RNA viral, síntese das proteínas, a montagem e

liberação de novas partículas de HIV-1, que sofrem maturação pela enzima protease (BARBER *et al.* 1990; HOTTIGER *et al.* 1994; HOTTIGER & HUBSCHER 1996; Freed 2001). Uma representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1 pode ser visualizado na figura 5.

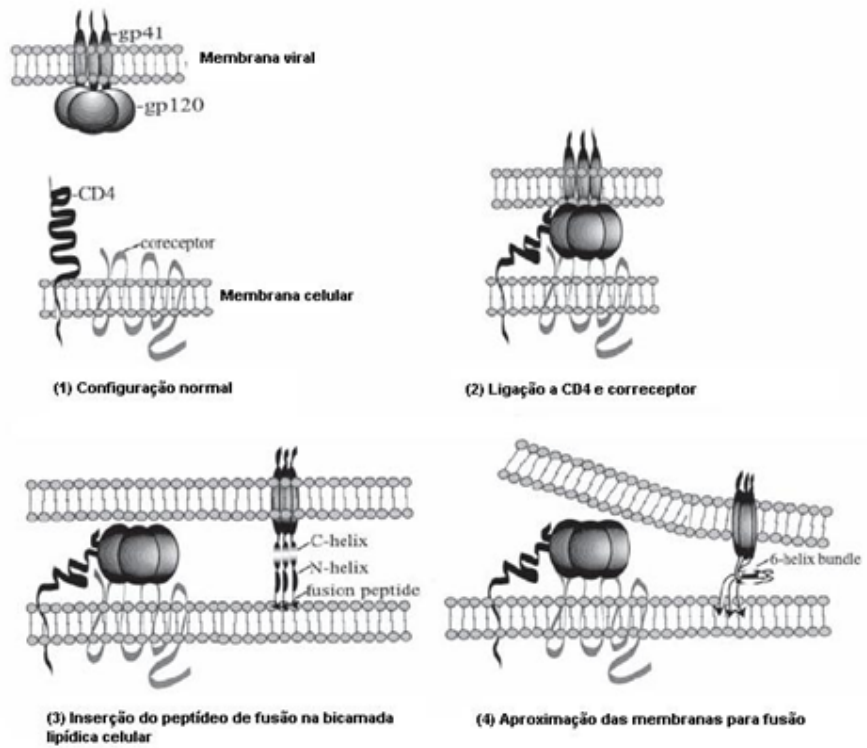


Figura 4: Representação esquemática da etapa da fusão do vírion com a célula hospedeira. Traduzido de Freed, 2001.

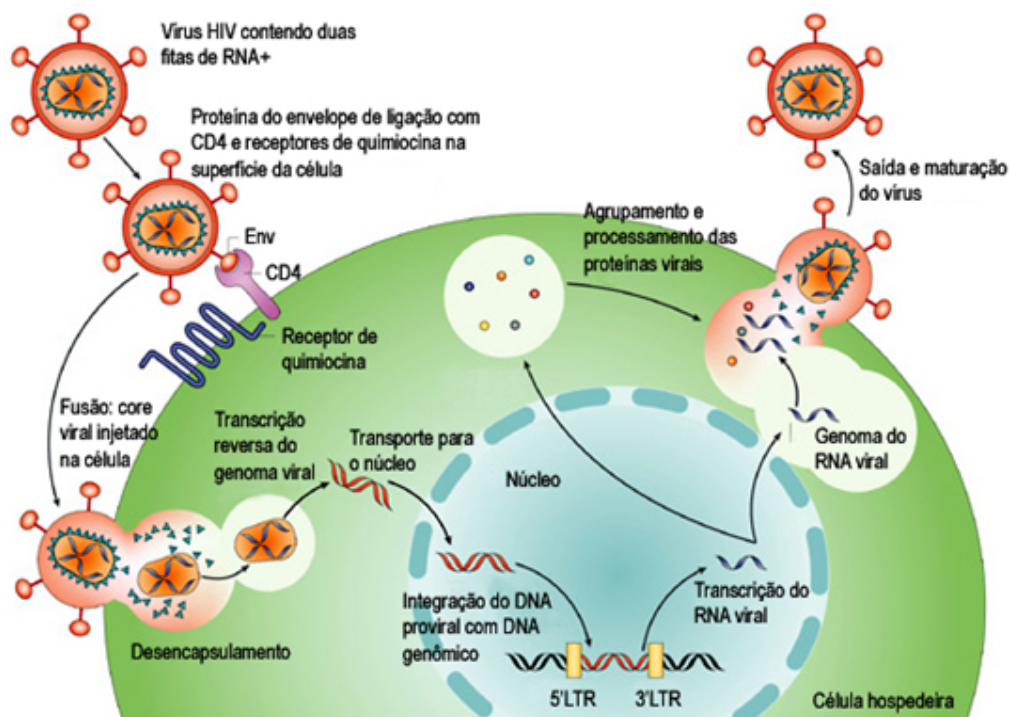


Figura 5: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV. Fonte: Traduzido a partir de Peterlin e col., 2003

1.7) Evolução viral e Mecanismos geradores da diversidade

Mutação, recombinação homóloga, seleção natural, deriva genética e migração são as principais forças evolutivas que interferem nas mudanças evolucionárias dos vírus de RNA como o HIV (revisto por MOYA *et al.*, 2004).

O HIV apresenta uma variabilidade genética elevada decorrente da alta replicação viral, da biologia viral e dos mecanismos de controle da infecção por conta do hospedeiro infectado (WEI *et al.*, 1995).

No curso natural da infecção pelo HIV, o elevado índice de replicação viral, com produção de 10^{12} partículas virais em condições não inibitórias leva a uma larga densidade populacional que sofre os efeitos mais visíveis da pressão de seleção natural que tem papel fundamental no controle da dinâmica evolutiva (DRAKE, 1993; ROBERTSON *et al.*, 1995).

Durante o processo replicativo do HIV ocorre uma pré-disposição natural ao erro ocasionado pela transcriptase reversa (RT) que, por ser uma DNA polimerase RNA

dependente, não apresenta atividade exonucleasica de reparo 3'-5' ao transcreever reversamente o RNA viral em DNA (COFIN *et al.*, 1986; WOOLEY *et al.*, 1998), gerando substituições, deleções e inserções de bases (ROBERTS *et al.*, 1988,). Assim, estima-se que ocorram 7×10^{-6} a $1,4 \times 10^{-4}$ mutações por pares de bases para cada ciclo de replicação resultante de erros da RT. Sendo o genoma do HIV de 9,7 kb, sugere-se que a taxa de mutação seja por volta de uma substituição de nucleotídeo por ciclo replicativo (revisto por SUBBARAO e SCHOCHETMAN, 1996). Neste contexto a alta taxa de mutação parece limitar o tamanho do genoma viral, visto que se o genoma do HIV fosse muito extenso certamente teria muitas mutações acumuladas ao longo de todo o genoma o que poderia refletir em genomas com alta capacidade de traduzir proteínas truncadas (revisto por MOYA *et al.*, 2004).

A recombinação homóloga decorrente dos mecanismos naturais de replicação retroviral (CLAVEL *et al.*, 1989), e bem provável que seja o responsável por mediar o reparo dos genomas defectivos (BOULERICE *et al.*, 1991) e pode acelerar a dispersão de mutações benéficas na quasispécie viral. Este potencial de variação pode conferir a capacidade de rapidamente responder às alterações da pressão seletiva (MOUTH *et al.*, 1996), exercidas pelo sistema imunológico ou pela terapia antirretroviral.

O evento de recombinação é um importante mecanismo gerador da diversidade do HIV (ROBERTSON *et al.*, 1995). Este processo é freqüente entre os retrovírus, devido à presença de duas fitas de RNA no mesmo compartimento e a capacidade da transcriptase reversa em se transferir de uma fita de RNA para outra, durante a etapa de retrotranscrição. A RT necessita saltar de uma extremidade a outra da fita de RNA para retrotranscrever adequadamente o material genético viral. Além desses saltos obrigatórios, a RT também pode alternar a fita molde em diferentes regiões do RNA, gerando assim genomas recombinantes. No HIV-1, ocorre uma média de três saltos da RT entre as diferentes fitas de RNA durante a retrotranscrição (YU *et al.*, 2004).

A recombinação do HIV pode ocorrer entre genomas de HIV-1 do mesmo subtipo (DIAZ *et al.*, 1995; BUTTÓ *et al.*, 1997), entre dois ou mais subtipos (SABINO *et al.*, 1994; SALMINEN *et al.*, 1997) e entre diferentes grupos (M e O) (TAKEHISA *et al.*, 1999).

Os eventos conhecidos por recombinação ilegítima parecem depender de características do RNA viral. Os sítios que apresentam características propícias aos eventos de recombinação são conhecidos por *hot spots* (WOOLEY, BIRCHER, SMITH, 1998) que nada mais são que seqüências de nucleotídeos idênticos ou de alta similaridade entre as seqüências nucleotídicas das fitas de RNA doadora e acceptora. Se tratando de eventos de recombinação

entre subtipos diferentes, onde há maior divergência entre as seqüências de nucleotídeos, este evento parece ocorrer em regiões mais conservadas do genoma viral, como a *RT*, a *integrase* e *gp41* (MAGIORKINIS *et al.*, 2003).

A formação de um vírus recombinante requer duas etapas, a primeira consiste que dois vírus infectem a mesma célula, simultaneamente ou sequencialmente, em múltiplos eventos de transmissão e no co-empacotamento dos dois genomas de RNA em cada vírion, o que leva à produção de partículas virais heterozigóticas (Figura 6A). A formação de genoma recombinante pode ocorrer no próximo ciclo de infecção através da leitura alternada executada pela transcriptase reversa entre ambos os genomas co-empacotados (Figura 6B) Em termos genéticos, por exemplo, se ambos forem idênticos, do mesmo subtipo, a descendência originada será também “idêntica”. Esta forma de recombinação entre vírus isogênicos ocorre freqüentemente no decorrer da infecção pelo HIV-1 e dificilmente se poderia identificar o verdadeiro fragmento recombinado (HOWELL *et al.*, 1991; MORRIS *et al.*, 1999). No entanto, quando dois vírus de subtipos diferentes infectam a mesma célula, gerando um vírus híbrido sendo mais provável a identificação do verdadeiro fragmento recombinado (HU & TEMIN, 1990, KATZ & SKALKA, 1990).

Outro mecanismo comum que favorece a diversidade genética é a hipermutação de nucleotídeo G → A. Este evento pode ocorrer durante a transcrição reversa do RNA viral em cDNA (VARTANIAN *et al.*, 1991; MANSKY, TEMIN, 1995).

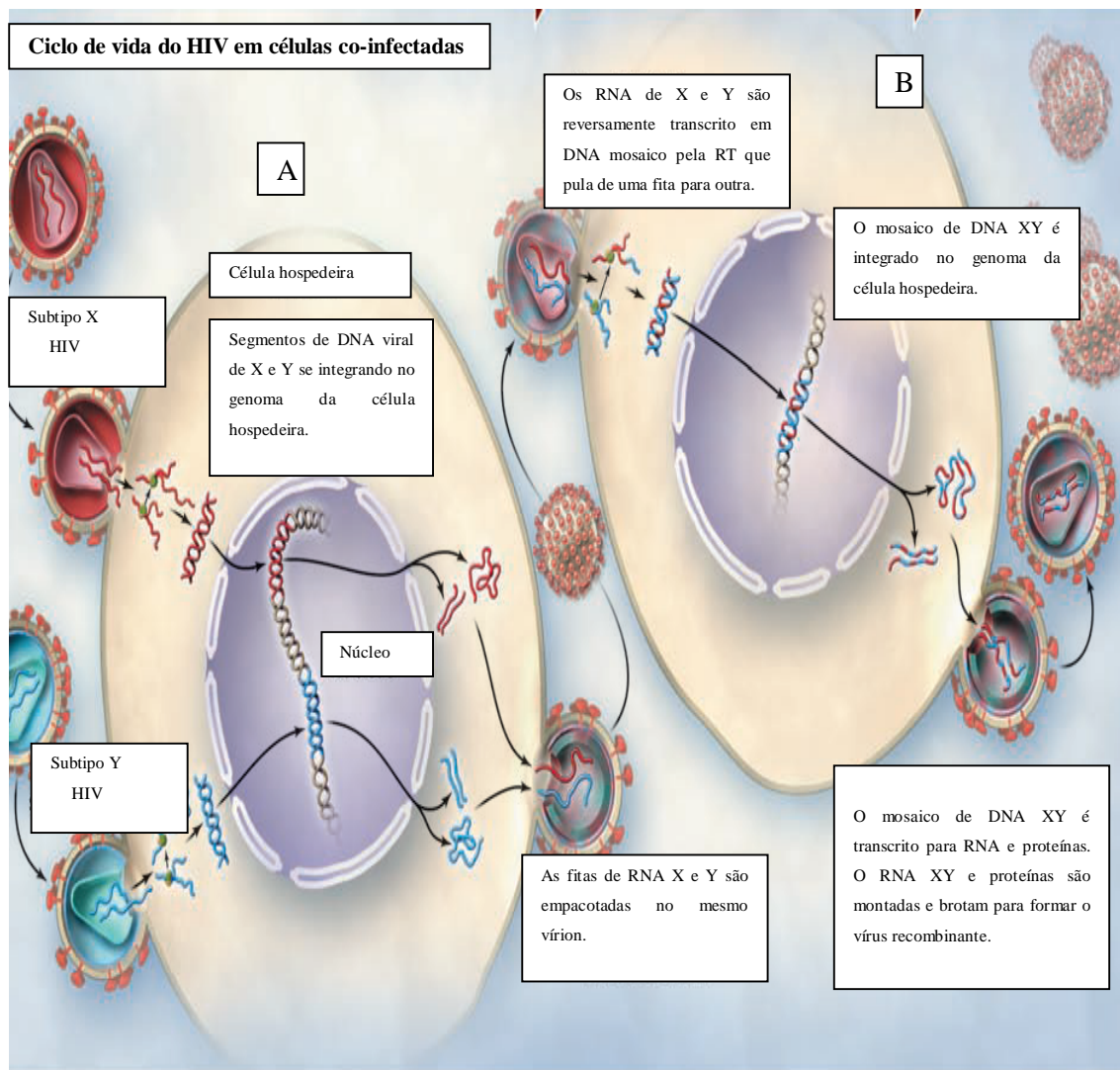


Figura 6: Representação esquemática do ciclo de vida com co-infecção entre dois subtipos de HIV-1. Fonte: Adaptado a partir de Taylor *et al.*, 2008.

1.8) Diversidade genética e epidemiologia molecular

O HIV se caracteriza por um enorme polimorfismo genético. Inicialmente as variantes do vírus eram identificadas como *americanas* ou *africanas* de acordo com o seu local de origem. Mais recentemente fez-se necessário à classificação baseada nas relações filogenéticas de genomas completo, em grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (CRFs) e de formas recombinantes únicas (URFs) (ROBERTSON *et al.*, 2000).

Assim, o HIV é classificado em dois tipos, HIV-1 e HIV-2 que embora apresentem organização genômica similar, podem diferir em 70% os níveis de identidade nucleotídica. O

HIV-1 é o responsável pela pandemia e pode ser segregado em três grupos distintos: M (*Major*), O (*Outlier*) (GURTLER *et al.*, 1994), N (novo ou não-M, não O) (SIMON *et al.*, 1998) e P (PLANTIER *et al.*, 2009) com base na análise dos genomas completos os grupos de HIV-1 compartilham menos que 70% de identidade nucleotídica.

O grupo M é o mais representativo sendo dividido em nove subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, K (ROBERTSON *et al.*, 2000). As variantes dos subtipos A e F podem ainda ser classificadas em sub-subtipos [A1-A5] e [F1-F2] (GAO *et al.*, 1999; TRIQUES *et al.*, 2000; VIDAL *et al.*, 2006). A figura 7 apresenta de forma esquemática a classificação do HIV.

Eventos de recombinação são comuns em áreas onde existe uma co-circulação de subtipos gerando linhagens mosaicas as quais são responsáveis por 10-20% de novas seqüências geradas. Dois tipos de genomas mosaicos podem ser gerados, as formas recombinantes circulantes (CRFs) quando identificadas em pelo menos três indivíduos HIV infectados sem vínculo epidemiológico direto e que apresentam os mesmos pontos de recombinação ao longo do genoma, estas geralmente apresentam importância epidemiológica. Atualmente 48 formas recombinantes circulantes foram descritas <http://www.hiv.lanl.gov>, e alguns destes encontram-se representados na figura 8. Além deste conjunto, existem as formas recombinantes únicas (URFs) que são formas recombinantes entre os subtipos, mas que são encontradas em apenas um indivíduo infectado. Centenas de URFs foram encontradas com base na análise parcial das seqüências do genoma e algumas possuem análise completa do genoma, porém o seu potencial de propagação epidêmica é pouco conhecido (TAYLOR *et al.*, 2008).

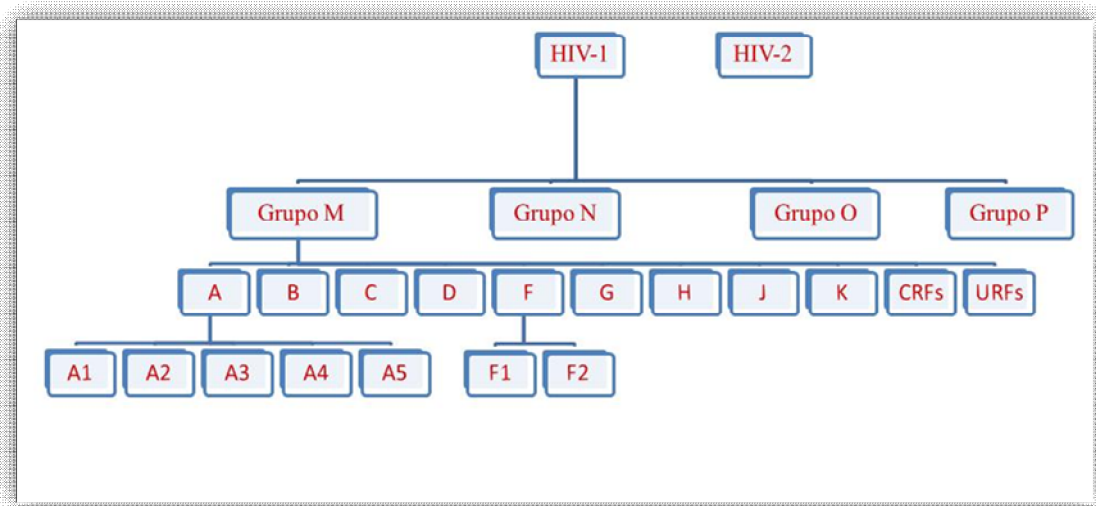


Figura 7: Classificação atualizada do HIV baseada em genomas completos com separação em tipos, grupos, subtipos e sub-subtipos., Fonte: Robertson *et al.* 2000 & Plantier *et al.*, 2009 modificado.

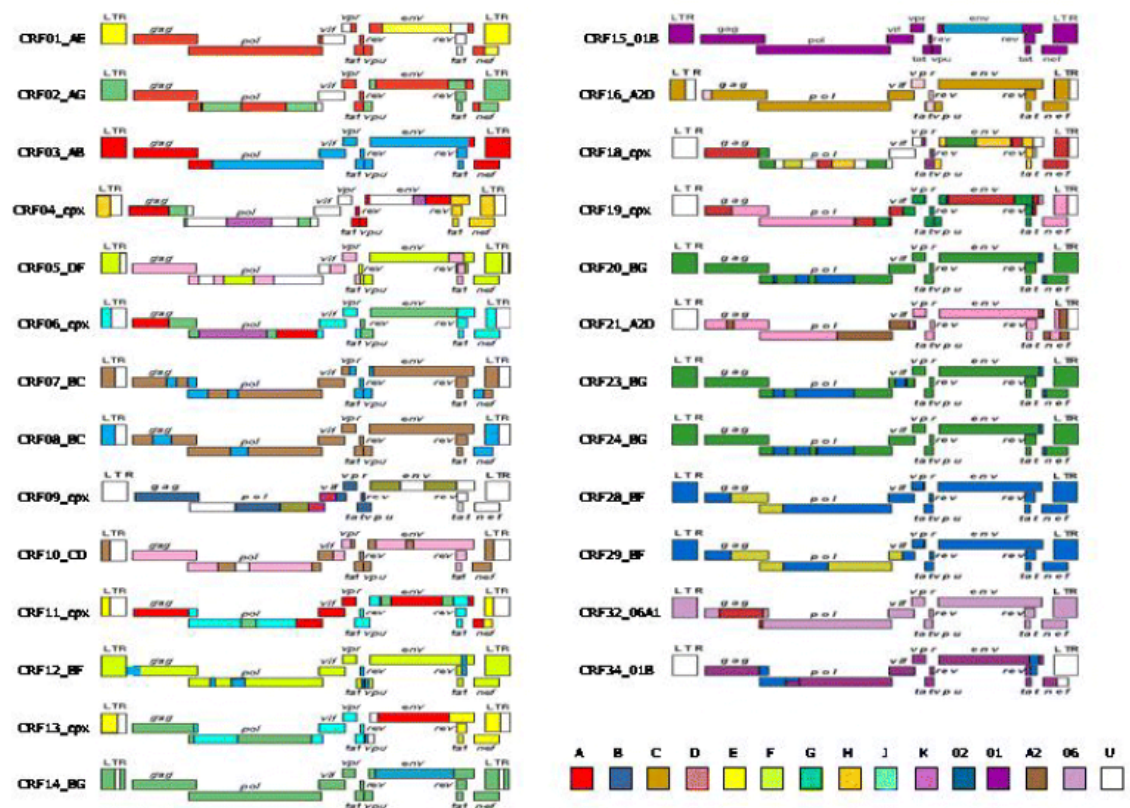


Figura 8: Representação de genomas completos de algumas formas recombinantes circulantes. Destacando que a nomenclatura dos CRFs segue a seguinte regra, um número que corresponde à ordem de descrição destes genomas mosaicos, seguido dos subtipos virais envolvidos na recombinação. Os genomas mosaicos complexos que refletem a recombinação envolvendo mais de dois subtipos virais são denominados cpx. Fonte: Buonaguro *et al.*, 2007.

A distribuição global dos subtipos do HIV-1 varia de acordo com a região geográfica, esta parece estar relacionada com eventos fundadores, imigração e deslocamento internacional e não com as diferentes vias de transmissão (PARASKEVIS & HATZAKIS, 1999).

Todos os subtipos podem ser encontrados na África (MBOUDJEKA *et al.*, 1999; PAPATHANASOPOULUS *et al.*, 2003). A África Subsaariana é a região mais acometida pela epidemia e abrange cerca de 64% das infecções pelo HIV em todo o mundo, o que em conjunto com a coexistência geográfica de primatas não humanos infectados com SIV, sugere que esta região seja o epicentro da epidemia mundial (SALEMI *et al.*, 2005). Neste continente, a distribuição dos subtipos virais é bastante complexa. O subtipo C do HIV-1 é o subtipo viral mais prevalente em países com altas taxas de infecção como a Índia, China e África Sub-saariana, sendo responsável por mais de 50% dos casos de infecção no mundo (SENGUPTA *et al.*, 2005).

Os subtipos A, B, D e G são responsáveis por 12%, 11%, 2% e 5%, respectivamente, das infecções mundiais, enquanto que os subtipos F, H, J e K juntos causam menos que 1% das infecções. As duas formas circulantes mais comuns; o CRF01_AE e o CRF02_AG são responsáveis por 5% e 8% das infecções mundiais, respectivamente, enquanto que CRF03-AB é responsável por apenas 0,1% da epidemia global. Juntas, as formas recombinantes do HIV-1 são responsáveis por 20% das infecções mundiais (HEMELAAR *et al.*, 2011).

Aproximadamente, 12% da pandemia do HIV são decorrentes de infecções pelo subtipo B (OSMANOV *et al.*, 2002), o qual possui um amplo predomínio em muitos países europeus, na América do Sul, na América do Norte e na Austrália. Na América do Sul, responsável por 4% das infecções neste continente, o subtipo prevalente é o B, que representa mais de 70% dos casos. Os subtipos F1, C e recombinantes BF1 são também encontrados nessa região (HEMELAAR *et al.*, 2006). O subtipo F1 está presente em grande parte dos países do cone sul, tendo como maior destaque o Brasil (MORGADO *et al.*, 1994, MORGADO *et al.*, 1998), Argentina (THOMSON *et al.*, 2000), Bolívia (VELARDEDUNOIS *et al.*, 2000) e Uruguai (HIERHOLZER *et al.*, 2002). No entanto, com exceção do Brasil, amostras F1 puras são raramente encontradas, na maioria dos casos, o subtipo F1 é encontrado na sua forma recombinante BF1 e destas, dentre os CRFs destacamos o CRF12_BF e em menor extensão o CRF17_BF encontrados na Argentina, Uruguai e Paraguai e mais recentemente o CRF38_BF foi identificado no Uruguai (RUCHANSKY *et al.*, 2009)

A presença de uma grande variedade de tipos e subtipos de HIV-1 descritos, com diferentes zonas de ocorrência (Figura 9) pode ter como consequência uma potente barreira

antigênica para o desenvolvimento de moléculas candidatas a vacinas, além de implicações na transmissão, terapia, patogênese viral e diagnóstico.

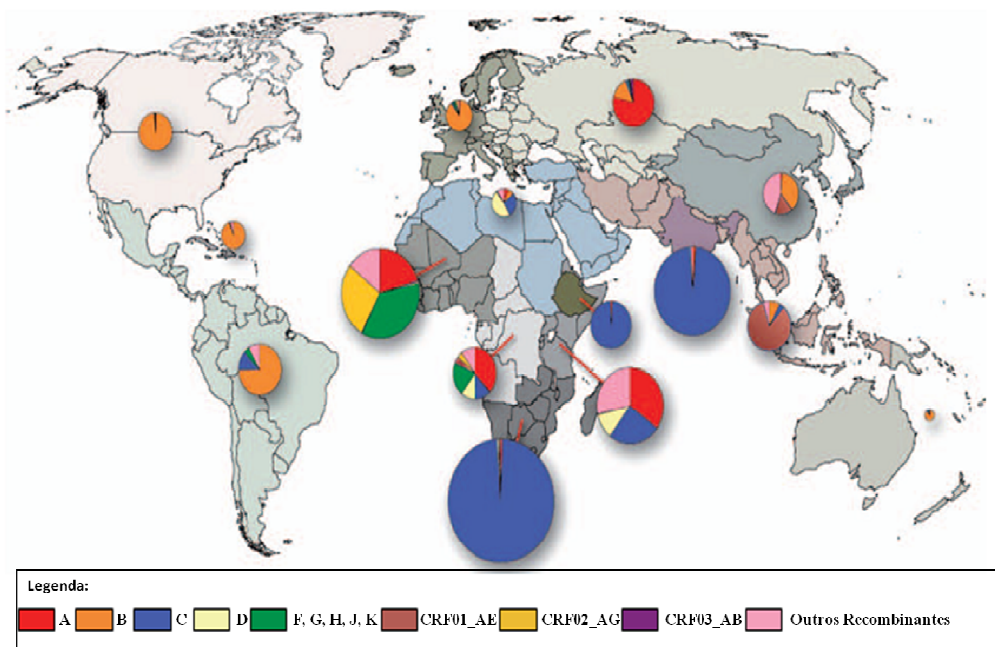


Figura 9: Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e formas recombinantes, sendo o tamanho de cada gráfico de pizza representativo do número de casos de infecção local e as cores representativas dos subtipos ou formas recombinantes. Fonte: Adaptado de Hemelaar *et al.*, 2006.

1.81) Epidemiologia Molecular no Brasil

Estudos sobre a evolução do HIV no Brasil sugerem que o primeiro subtipo a ser introduzido na população brasileira foi o subtipo B (por volta de 1965-1970), seguido pelo subtipo F1 (~1975-1980) (BELLO *et al.*, 2006). As primeiras descrições do subtipo F1 em amostras brasileiras são de dois trabalhos de 1994 com amostras do início dos anos 90 (MORGADO *et al.*, 1994; LOUWAGIE *et al.*, 1994), sendo também da mesma época a identificação do primeiro genoma recombinante B/F (SABINO *et al.*, 1994).

No Brasil, estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 permitiram identificar até o momento uma alta prevalência do subtipo B, seguida em menor extensão pelo subtipo F1 e recombinantes BF1 na maior parte do território nacional (Figura 10) Esta co-circulação possibilita a ocorrência de eventos de recombinação entre estes subtipos, com a formação de formas recombinantes únicas (URFs) ou formas recombinantes circulantes (CRFs).. Até o presente momento cinco CRFs envolvendo os subtipos B e F1 já foram descritos, CRF28_BF, CRF29_BF e CRF46_BF em São Paulo (DE SÁ FILHO *et al.*, 2006; SANABANI *et al.*,

2010) e no Rio de Janeiro CRF39_BF e CRF40_BF (GUIMARÃES *et al.*, 2008), Casos isolados dos subtipos D, A, CRF02_AG *like* e C também foram detectados (MORGADO *et al.*, 1998; POTTS *et al.*, 1993 GUIMARÃES *et al.*, 2002, COUTO-FERNANDEZ *et al.*, 2005). A região Sul tem um perfil diferente onde foi verificado um grande percentual de amostras do subtipo C, seguido do subtipo B e recombinantes BC, e um alto percentual de CRF31_BC e baixa prevalência do subtipo F₁ (GUIMARÃES *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006). O papel do CRF_31BC parece estar bem definido na região Sul, sobre tudo na cidade de Porto Alegre, onde a prevalência desse recombinante é na ordem de 7% - 21% (SANTOS *et al.*, 2006, BRIGIDO *et al.*, 2007). No entanto, a distribuição dos subtipos e recombinantes BF₁ é bastante heterogênea e o seu impacto epidemiológico pode oscilar dentro de uma mesma região geográfica. Como exemplo podemos citar a relevância epidemiológica dos CRF39_BF e CRF40_BF que no Rio de Janeiro é baixa (GUIMARÃES *et al.*, 2008), contrastando com o perfil epidemiológico dos CRF28_BF e CRF29_BF em Santos (DE SÁ *et al.*, 2008) e São Paulo (DE SOUZA *et al.*, 2008), onde com base na estrutura do pol estes representam 83% e 30%, respectivamente.

A caracterização de amostras do subtipo B revelou a existência de diferenças genéticas e antigênicas entre os vírus deste subtipo circulantes no Brasil, com a ocorrência de uma variante do subtipo B denominada B”, que se difere do subtipo B clássico por apresentar um motivo GWGR no topo da alça do V3 da glicoproteína do envelope *gp120* em contraste com o motivo GPGR, característico dos isolados do subtipo B predominantes no continente americano, inclusive o Brasil, e na Europa. Essa substituição de aminoácidos causa alterações na estrutura secundária no topo do V3 nesses isolados refletindo em propriedades bioquímicas particulares (MORGADO *et al.*, 1996). A emergência dessa variante parece ter ocorrido desde a introdução do HIV no Brasil cuja origem parece ser monofilética e local, devido a sua baixa dispersão em outros países (BELLO *et al.*, 2007).

Uma prevalência em torno de 10-15% de amostras pertencentes ao subtipo F₁ foi detectada na região Sudeste em estudos baseados na região C2-V3 do genoma viral (MORGADO *et al.*, 1998; GUIMARÃES *et al.*, 2001), porém vários estudos envolvendo a subtipagem de mais de uma região genômica do HIV têm descrito que um grande número de amostras previamente subtipadas como F₁ na região do envelope viral, representam URFs_BF.

O estado do Rio de Janeiro segue o padrão descrito para a maior parte do território nacional com a co-circulação dos subtipos B (75-80%) e F₁(10-15%) (MORGADO *et al.*,

1994, MORGADO *et al.*, 1998, GUIMARÃES *et al.*,2002) , como pode ser ilustrado na figura 10.

Alguns estudos descreveram os subtipos de HIV-1 circulantes no Rio de Janeiro, no entanto ainda são poucos os estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 focando o princípio da epidemia, e nenhum estudo sobre a dinâmica temporal destes subtipos foi realizado, assim como da evolução das formas recombinantes BF1. Além de quase todos os estudos restringem a alguma categoria de exposição e com um número restrito de amostras.

Desta forma, justifica-se o monitoramento da epidemiologia molecular do HIV no Rio de Janeiro assim como o acompanhamento da evolução molecular dos subtipos aqui encontrados e a dinâmica temporal, ou seja, o estudo da distribuição dos subtipos B, variante B'' e F1 ao longo do tempo assim como dos recombinantes BF1 encontrados nas categorias de exposição ao risco heterossexual, bissexual e usuário de drogas.

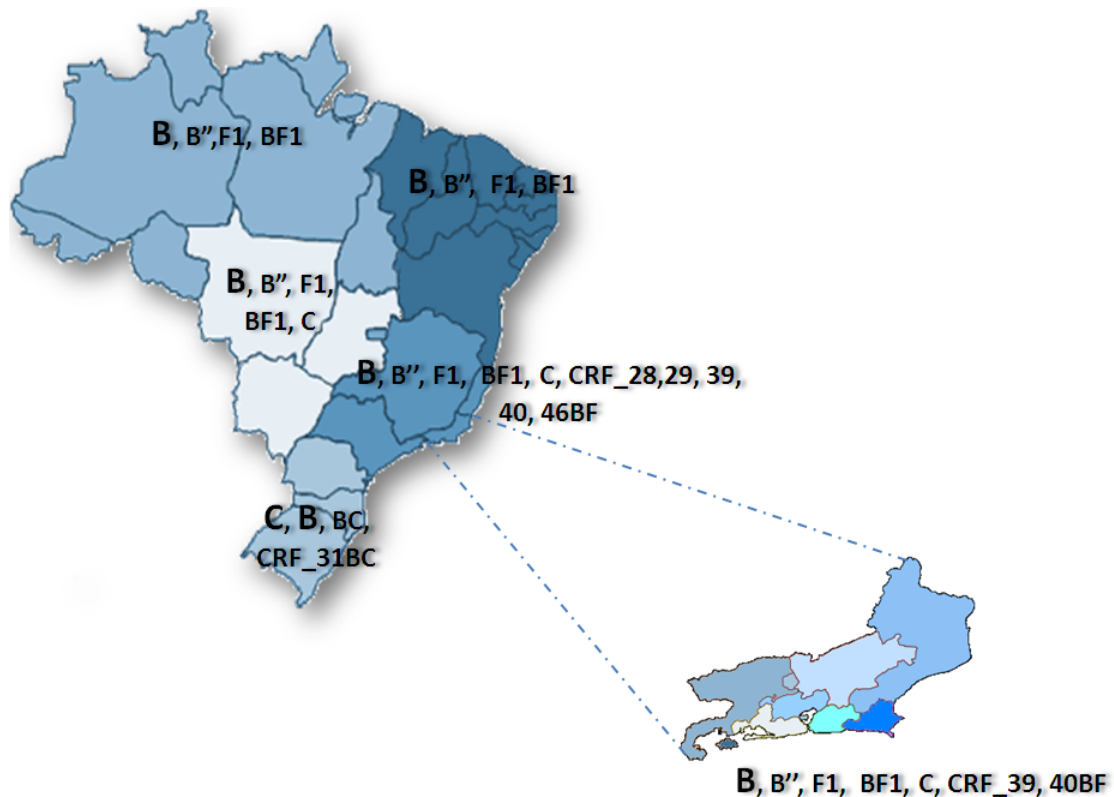


Figura 10: Distribuição dos subtipos e formas circulantes recombinantes do HIV-1 no Brasil com ênfase no estado do Rio de Janeiro. Atualizado a partir de Morgado *et al.*,2002.

II. OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo retratar a dinâmica temporal dos subtipos B, F1 e da variante B'' do subtipo B, assim como das formas recombinantes BF1 na epidemia de Aids no Rio de Janeiro.

2.2) Objetivos específicos

- Subtipar as amostras nos dois períodos do estudo (1990-92 e 2006-10) na região C2-V3 da gp120;
- Subtipar um sub-grupo de amostras previamente classificadas como B ou F1 no item anterior na região da protease e transcriptase reversa;
- Comparar perfis de recombinação inter/intra-subtipo nas amostras dos dois períodos do estudo, a fim de analisar como estes se comportam ao longo do tempo;
- Estudar a relação entre as formas recombinantes BF1 encontrados com os CRF_BF1 descritos, assim como verificar se há a ocorrência de algum possível novo CRF_BF.
- Estudar a dinâmica temporal dos subtipos virais de HIV-1 nos distintos grupos de exposição ao risco;
- Explorar as amostras do início da epidemia de modo a verificar a ocorrência de redes de transmissão nas distintas categorias de exposição ao risco;
- Estudo da dispersão das assinaturas moleculares do subtipo B nos dois períodos do estudo

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Casuística:

A primeira etapa do nosso estudo consistiu na seleção das amostras de indivíduos do sexo masculino HIV-1 positivos, acompanhados no Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC), em dois momentos diferentes da epidemia de Aids no Rio de Janeiro.

As amostras da primeira casuística do presente estudo (n=130) foram coletadas no contexto do projeto intitulado “Projeto de Transmissão Heterossexual” cuja coleta do material data de 1990-1992. Este projeto visava acompanhar a transmissão heterossexual de indivíduos HIV-1 masculinos para suas parceiras. Estes indivíduos em sua maioria já tinham evoluído para Aids já que neste momento a terapia antirretroviral de alta potência (HAART) ainda não estava disponível. Sendo assim, podemos especular que estes se infectaram nos anos 80. A segunda casuística deste estudo é oriunda de estudos vigentes no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular (n=88). O critério para inclusão de amostras no presente estudo era os indivíduos possuísem diagnóstico entre 2006-2010.

A utilização dessas amostras no presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, sob os pareceres 388/07 e 16/2008. As amostras biológicas utilizadas neste estudo (sangue total, PBMCs e DNA) encontram-se estocadas a -20°C no Laboratório de Aids e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz.

3.2) Extração de DNA

A extração do DNA proviral a partir de células mononucleares do sangue periférico e sangue total procedeu-se pelo método cromatográfico (colunas de sílica), utilizando-se o QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), conforme indicação do fabricante. Neste kit, a lise celular ocorre através do uso de tampões contendo Isotiocianato de Guanidina, e a digestão dos componentes protéicos da célula ocorre sob ação da enzima Protease (QIAGEN). O DNA extraído foi identificado e estocado a -20°C.

3.3) Amplificação por *nested* PCR das regiões *env* e *pol*

Com o intuito de caracterizar os subtipos/variantes virais em indivíduos HIV-1 positivos no Rio de Janeiro nos períodos de 1990-1992 e 2006-2010, utilizamos a técnica de *nested* PCR para amplificar as regiões *env* e *pol*.

Para amplificação de um fragmento de 564pb (correspondente a posição 6817-7381 em relação a cepa HXB2) contendo a região gênica C2-V3 da *gp120* do envelope viral utilizou-se como iniciadores externos ED5/ED12 e iniciadores internos ED31/ED33 (Tabela 1).

Para amplificação de um fragmento de 1322pb (correspondente a posição 2252-3574 em relação a cepa HXB2) da região da polimerase viral, região gênica que compreende a protease e parcialmente a RT, utilizamos como iniciadores externos DP10/MMRT6 e como iniciadores internos DP16/MMRT5 (Tabela 1).

Os reagentes utilizados em todas as reações de PCR para cada amostra foram 10µl do Tampão 5X da Enzima; 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.25 mM MgCl₂; 200mM de cada dNTP; 20pmol de cada iniciador (senso e anti-senso) , 2.5U Taq polimerase e 33,2µl de água DEPC. A essa solução adicionamos 5µl do DNA de cada amostra. Para a amplificação das regiões alvo do estudo a ciclagem de PCR foi a seguinte: 3 ciclos de 97°C por 1 min, 55°C 1min, 72°C por 2 min seguindo-se de 32 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 1 min, 72° por 2 min e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Após a primeira reação de PCR foram transferidos 5µl do produto amplificado para a segunda reação de PCR, totalizando um volume de 50µl.

Para verificar se houve amplificação dos fragmentos foram aplicados 5µl do produto da segunda reação de PCR adicionado de 1µl do corante Azul de Bromofenol (Azul de Bromofenol 28%; EDTA 10mM pH8,0 e Sacarose 40%) em gel de agarose 1% corado com

brometo de etídeo 0,001% (v/v). As amostras foram submetidas à eletroforese (80V por uma hora e trinta minutos) utilizando o TBE 1X (Tris-HCl 1M, Ácido Bórico 1M e EDTA 20mM) como tampão de corrida. O fago Φ X174 digerido com a enzima Hae III (1353, 1078, 872, 603, 310pb) foi utilizado como padrão de peso molecular. Todas as reações foram monitoradas através da utilização de controles positivos (DNAs de amostras HIV positivas amplificáveis) e negativos (todos os reagentes do PCR excluindo DNA).

Tabela 1: Estratégia de amplificação das regiões *env* e *pol* do HIV-1

Região Genômica	Primers	Sequência dos primers	Posição genômica relativa ao HXB2	Tamanho
<i>gp120</i>	ED5 – ED12	ATGGATCAAGCTAAARCATGTC AGTGCTTCTGCTGCTCCCAAG	6557-7543	986pb
	ED31 – ED33	CCTCARYCATWACACARGCYTGTC CCTCARYCATWACACARGCYTGTC	6817-7381	564pb
<i>pol</i>	DP10 – RT6	CAACHCCTCTCMGAAGCAGGAGCCG TTTTACATCATTAGTGTGGG	2197-3648	1451pb
	DP16 – RT5	CCTCARRTCACTCTTGCARC TAAATTIGATATGTCATTG	2252-3574	1322pb

3.4) Amplificação por PCR do gene da β globina

Com a finalidade de investigar a não amplificação de algumas amostras para o fragmento padronizado da *gp120*, nós submetemos estas amostras ao PCR da β -globina (fragmento de 300pb) que é um gene constitutivo do hospedeiro que se apresenta em dupla cópia e, portanto facilmente amplificável. Para amplificação da β -globina foi utilizado o par de iniciadores GH20/PC04. Os reagentes e a ciclagem para amplificação deste fragmento foram os mesmo empregados para amplificação dos genes do envelope e polimerase viral.

3.5) Purificação e quantificação dos produtos de PCR para sequenciamento

As amostras amplificadas para as regiões *gp120* e *pol* foram purificadas para o uso nas reações de sequenciamento por método cromatográfico, através de colunas de purificação, utilizando-se o kit em colunas (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação dos produtos purificados foi realizada em gel de agarose (2%, corado com brometo de etídeo 0,001% (v/v)). Foram aplicados 2 μ l do produto purificado adicionado de 1 μ l do corante Azul de Bromofenol (Azul de Bromofenol 28%; EDTA 10mM pH8,0 e Sacarose 40%) no gel. As amostras foram submetidas à eletroforese (80V por duas horas)

utilizando o tampão TBE 1X como tampão de corrida. Como padrão de peso molecular, utilizamos 2µl do Low DNA Mass Ladder. Este padrão apresenta bandas de 100, 200, 400, 800, 1200 e 2000pb que correspondem a 5, 10, 20, 40, 60 e 100ng de DNA, respectivamente. A intensidade das bandas correspondentes às amostras foi comparada com as bandas do padrão, a fim de estimar a - concentração, em nanogramas, do produto purificado e o volume do mesmo a ser utilizado na reação de sequenciamento.

3.6) Reação de sequenciamento

Na reação de sequenciamento, utilizamos 1µl do Big Dye v.3.1 (Ready Reaction Mix), 1,5µl do tampão de diluição 5X (BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer), 1µl do oligonucleotídeo iniciador a 5pmol/µl e a essa solução adicionamos 60 a 100ng do produto da segunda reação de PCR purificada. Água Milli-Q foi adicionada à reação para completar um volume final de 10µl.

O emprego dos iniciadores na reação de sequenciamento das regiões gênicas descritas (*gp120* e *pol*) está sumarizado na tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores a serem utilizados na reação de sequenciamento das regiões *gp120* e *pol*

<i>Fragmento</i>	<i>Região do Genoma</i>	<i>Iniciadores utilizados no sequenciamento</i>
A	<i>gp120</i>	ED31/ED33
B	<i>pol</i>	DP11/DP16/LR49/LR54/MMRT-5

A ciclagem utilizada para a reação de sequenciamento foi a seguinte 25 ciclos: 96°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento, foi realizada a etapa de precipitação do produto sequenciado. A cada poço da placa de sequenciamento foram adicionados 80µl de Isopropanol 75%. A placa foi incubada ao abrigo da luz por 15 minutos e então centrifugada em centrífuga com rotor adaptado para placas (Eppendorf 5804-R) a 4000rpm por 45 minutos. Após a centrifugação o Isopropanol foi removido vertendo-se a placa e o excesso removido através da centrifugação da placa invertida a 900rpm por um minuto, protegida com papel absorvente. Com a finalidade de garantir a ausência de Isopropanol nos poços da placa a mesma foi

levada ao termociclador a 95°C por 5 minutos. A partir de então a placa foi mantida ao abrigo da luz a -20°C até o dia em que seria submetida ao sequenciador.

Antes de serem colocadas no sequenciador as amostras foram ressuspensas em 10µl de Formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA), aquecidas em termociclador por 5 minutos a 95°C, para garantir que o “template” fosse desnaturado e então submetidas imediatamente ao gelo para evitar que as fitas de DNA voltassem a parear.

O sequenciador *DNA Sequencer* modelo 3100 (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado para o sequenciamento automatizado das amostras. O protocolo utilizado para o sequenciamento seguiu a recomendação do fabricante para a versão 3.1 do kit *Big Dye Terminator*.

3.7) Análise e edição de sequências.

Os cromatogramas gerados a partir do sequenciamento foram visualizados e editados utilizando o pacote de programas DNASTAR 4.0 (DNASTAR Inc., EUA). Utilizando o software SeqMan 4.0, as sequências geradas foram alinhadas e editadas manualmente, gerando uma sequência consenso correspondente à região amplificada.

As sequências editadas foram alinhadas através do programa ClustalX juntamente com sequências de referência correspondentes aos diferentes subtipos de HIV-1, obtidas do banco de dados de Los Alamos, (<http://hiv-web.lanl.gov>) para posterior análise filogenética e determinação do subtipo viral no programa MEGA 4.0 – Molecular Evolutionary Genetic Analysis (TAMURA H, *et al.*, 2007).

O método de análise utilizado foi o *Neighbor Joining* e o modelo matemático de correção da substituição de nucleotídeos foi o Kimura dois parâmetros (K-2p) (KIMURA, 1977). O método de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas) foi utilizado para dar suporte aos grupamentos filogenéticos.

3.8) Análise das sequências deduzidas de aminoácidos na região *gp120*

A partir da utilização do software Editseq 4.00 do pacote de programas DNASTAR as sequências de nucleotídeos editadas manualmente foram traduzidas em sequências de aminoácidos.

O alinhamento de nucleotídeos obtido no tópico anterior foi utilizado para gerar através da tradução a as sequências de aminoácidos, para tal foi realizado utilizando o programa MEGA 4.0 (KUMAR, TAMURA, NEI, 2004). Este alinhamento nos permitiu identificar o polimorfismo no topo da alça hipervariável (V3) do envelope viral, bem como a discriminar as amostras B em B pandêmico com a assinatura (GPGR), variante B” tipicamente brasileira com assinatura (GWGR) e demais assinaturas.

3.9) Identificação de genomas recombinantes

Após a análise filogenética, utilizamos o programa Simplot 3.5.1 (LOLE *et al.*, 1999) para a identificação de recombinação nas amostras que apresentaram um agrupamento filogenético divergente, ou seja não se agruparam com amostras de referência de nenhum subtipo.

Para esta análise utilizamos o método de *bootscan*. Esta metodologia utiliza o método de NJ com fator de substituição de nucleotídeos K-2 (KIMURA, 1977) para fazer a análise filogenética do fragmento alvo, esta se dá através de fragmentos menores (janelas), que são analisados por sobreposição (passos). O suporte dos grupamentos filogenéticos foi realizado pelo *bootstrap* de 100 pseudoréplicas. Os parâmetros utilizados na análise de *bootscan* foram: janela = 300pb e passos de 20pb. Nossas amostras foram analisadas frente às sequências disponíveis no banco de dados de Los Alamos consideradas puras para cada subtipo viral (A192UG037, B83HXB2, CB92BR025, F193BR020, GKE93HH8793, HBE93VI991, J94SE7022, K96MP535).

A partir do perfil apontado pelo *bootscan*, geramos árvores utilizando fragmentos menores da região estudada e submetemos a análise filogenética frente as sequências dos diversos subtipos de HIV-1 puras na região alvo.

Após identificação dos genomas recombinantes, buscamos identificar os - pontos de recombinação (SIERRA *et al.*, 2005, SANTOS *et al.*, 2006). Os mesmos são determinados através da identificação do ponto médio obtido entre o último nucleotídeo informativo de determinado subtipo e do primeiro nucleotídeo informativo do outro subtipo. Para tal análise

verificamos o padrão de assinaturas moleculares entre a amostra em análise e os consensos correspondentes aos subtipos envolvidos na recombinação.

3.10) Análise Bayesiana

As relações filogenéticas entre as amostras do nosso estudo caracterizadas B no envelope viral foram realizadas pelo método Bayesiano. As sequências do subtipo B foram submetidos ao programa jModeltest 0.1.1 para a escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos sob o critério Akaike resultando na escolha do modelo TVM + I + G, no entanto como este modelo não é implementado na versão 3.1.2 do MrBayes (Ronquist & Huelssenbeck., 2003), substituímos para o modelo mais próximo o GTR + I + G. Foi submetido duas corridas de quatro cadeias para cada data set. Foram realizadas 4×10^7 gerações com o “burnin” de 4×10^6 gerações.

A verificação das possíveis relações entre as redes de transmissão do subtipo B e as categorias de exposição ao risco de infecção pelo HIV foram realizadas pelo teste Bayesiano de Cadeia de Monte Carlo (MCMC) utilizando o programa BaTS (PARKER *et al.*, 2008). O programa BaTS estima a associação de caráter filogenético usando os testes estatísticos: Índice de Associação (AI) (Wang *et al.*, 2001) e o Índice de Parcimonia (PS) (SLATIKIN & MADDISON, 1989) com intervalo de confiança de 95%. Para tal análise utilizamos a posterior distribuição de árvores decorrentes do MrBayes.

3.11) Análise estatística

O teste do qui-quadrado foi realizado para comparação da dispersão dos subtipos B, F1 e variante B” nas categorias de exposição ao risco (HET, BI e UDI) e avaliação da distribuição das assinaturas moleculares do subtipo B nas respectivas categorias de exposição. Para ambas análises o teste do qui-quadrado foi realizado utilizando-se o *programa* GraphPad Prism 5.

IV. Resultados

4.1) Subtipagem molecular da região do C2-V3 da *gp120* do envelope viral das amostras coletadas no período de 1990-92

A primeira etapa do estudo consistiu na caracterização molecular da região do envelope viral das 130 amostras coletadas no período entre 1990-92 de indivíduos masculinos virgem de tratamento, os quais em parte já tinham evoluído à Aids. Neste contexto realizamos a análise filogenética da região do envelope viral, a qual encontra-se representada na figura 11, por uma árvore de NJ com representação topológica circular, não enraizada. Nesta, podemos observar que as amostras objeto deste estudo se agruparam de forma consistente com as respectivas sequências de referência B e F1 obtidas do Banco de Dado de Los Alamos com o bootstrap de 89 e 98, respectivamente. Assim, a caracterização molecular obtida através da filogenia evidenciou uma prevalência de 90% do subtipo B, seguida em menor extensão pelo subtipo F1 (8%), duas amostras (2%) que se agruparam entre si e tiveram agrupamento em ramos adjacentes as amostras de referência do subtipo B e, portanto, apresentaram indícios de recombinação intragênica foram submetidas a novas análises. As duas amostras, PTH163 e PTH701, que apresentaram indícios de recombinação estão assinaladas com losangos marrom na figura 11.

Para confirmação da recombinação realizamos o *bootscan* dessas amostras frente a amostras de referência do grupo M do HIV-1 (Figura 12) e em adição geramos duas árvores filogenéticas a partir de dois fragmentos menores com base no perfil apontado pelo *bootscan* das amostras estudadas. O primeiro fragmento (13.A) correspondente à posição (6876-7156 relativa ao HXB2), o segundo fragmento (13.B) correspondente à posição (7157-7280 em relação ao HXB2). Com base nestas análises foi possível caracterizar as amostras PTH163 e PTH701, como rescombinantes BF1. A partir da tradução das seqüências geradas desta primeira casuística foi possível discriminar as assinaturas do topo da alça V3 das amostras caracterizadas filogeneticamente como subtipo B. Do total de 117 amostras pertencentes ao subtipo B, 48 amostras apresentavam o motivo (GPG) característico do B pandêmico, 47 amostras que apresentaram motivo (GWG) característico da variante B'' e 21 amostras com assinaturas menos freqüentes (GXG), sendo o X correspondente a qualquer aminoácido não W não P. respectivamente representadas na figura 11 como círculos pretos, círculos verdes e círculos roxos.

Com base na topologia da árvore filogenética, verificamos que o ramo do subtipo B apresentou 3 agrupamentos principais, onde o ramo superior é representado majoritariamente por amostras B”, um ramo intermediário, bastante heterogêneo, com frequências iguais para as assinaturas B pandêmico, da variante B” (GWG) e assinaturas B menos frequentes e por fim um ramo inferior representado pelo B pandêmico.

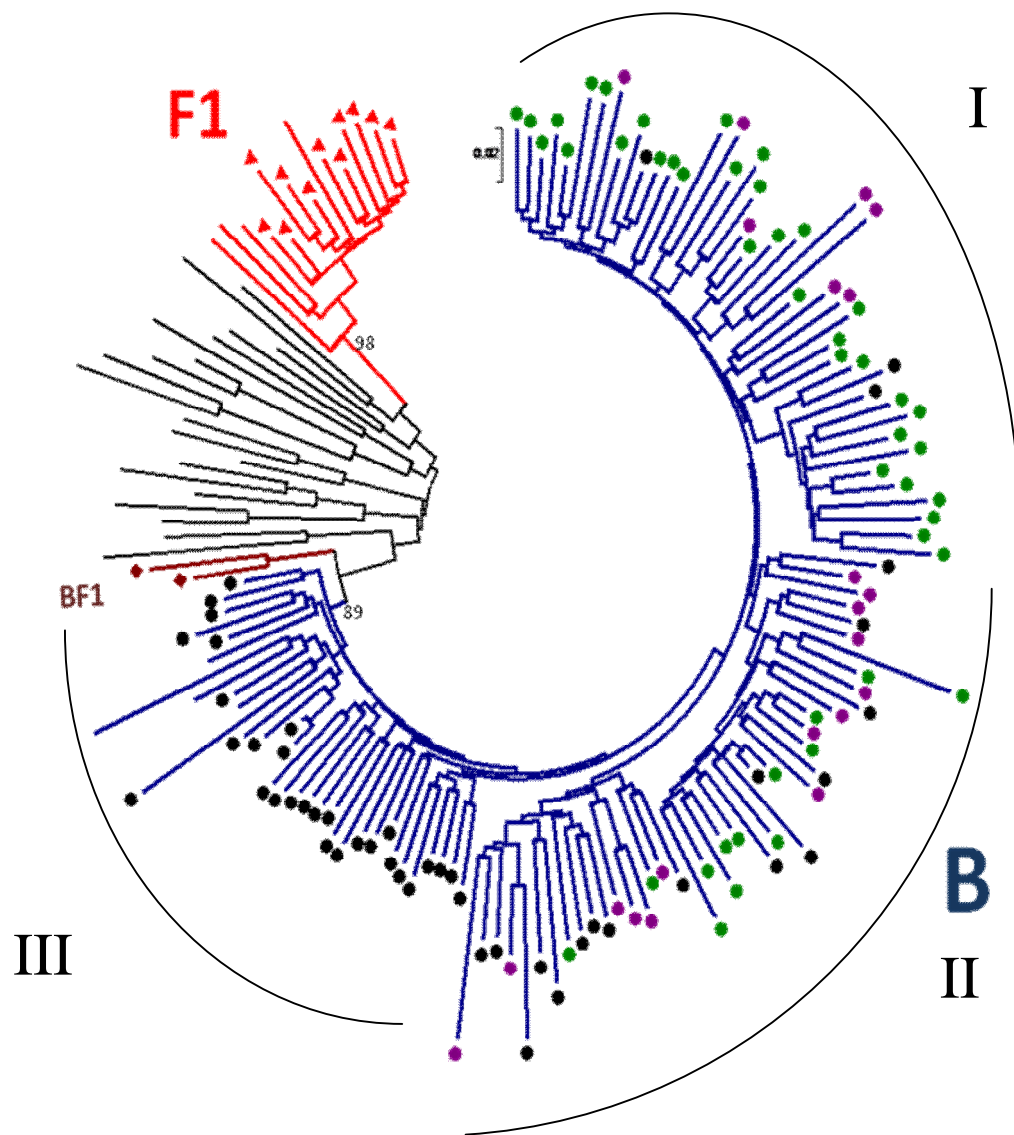
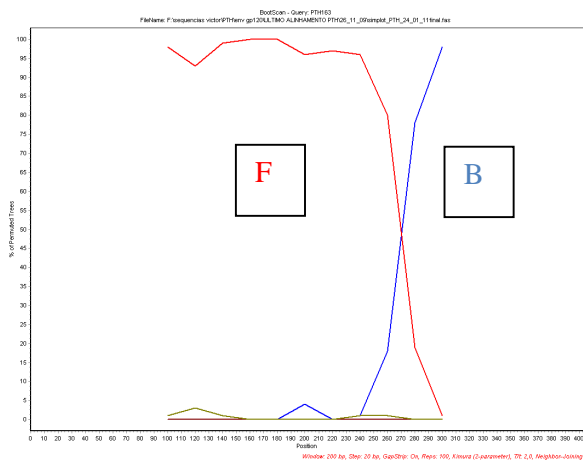


Figura 11: Análise genética de clusterização por NJ com modelo de substituição de k2p , correspondente à região do C2-V3 do envelope viral (404pb) de 130 amostras indivíduos masculinos HIV-1 positivos do período de 1990-92. As sequências foram alinhadas com sequências de referências obtidas do Banco de Dados de Los Alamos, representando os subtipos do grupo M. A barra da escala indica 2% da divergência na sequência de nucleotídeo. As amostras caracterizadas como subtipo B estão com os ramos assinalados em azul, os do subtipo F1 estão em vermelho e em preto encontram-se os outros subtipos do grupo M. As amostras estudadas estão representadas da seguinte maneira: Amostras B pandêmico (GPG) assinaladas com círculos pretos, amostras da variante B'' (GWG) com círculos verdes, amostras B (GXG) assinaladas com círculos roxos, amostras recombinantes com losangos marrom e as amostras F1 com triângulos vermelhos.

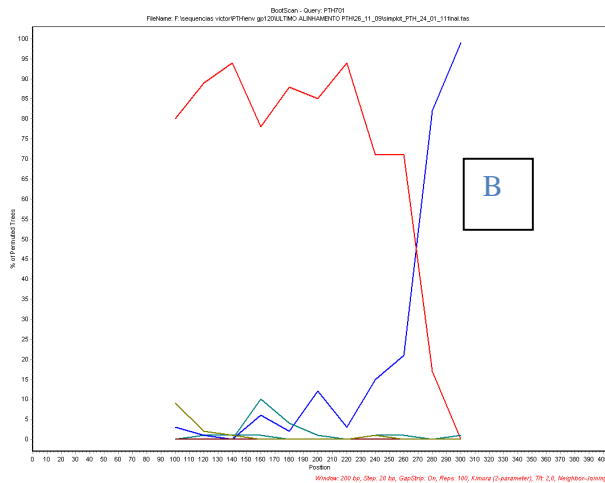


PTH163-recombinante BF1

12 (A)

Legenda

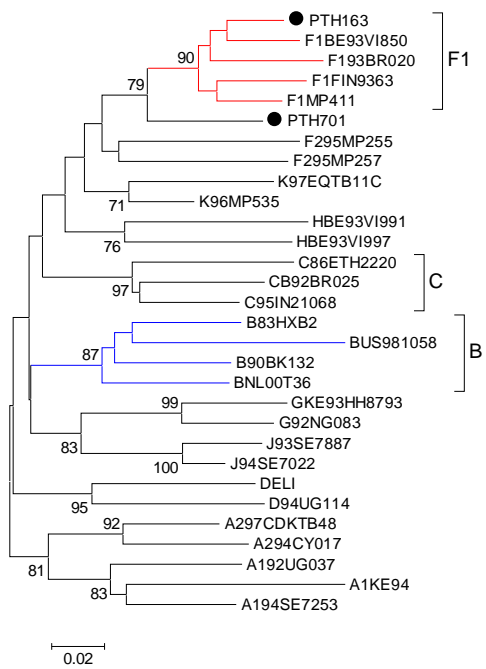
- A192UG037
- B83HXB2
- CB92BR025
- F193BR020
- GKE93HH8793
- HBE93V1991
- J94SE7022
- K96MP535



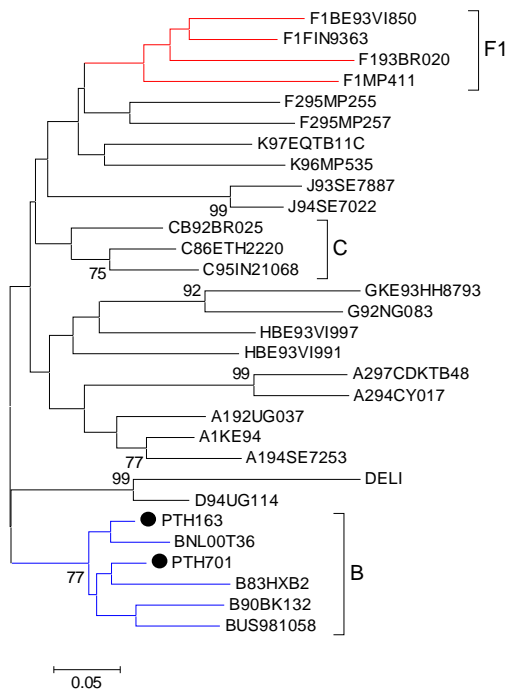
PTH701-recombinante BF1

12 (B)

Figura 12: Análise por *bootscan* das amostras PTH163 (Fig.12A) e PTH701 (Fig.12B) na região C2-V3 do envelope viral. Os parâmetros utilizados na análise foram: janela = 200pb, passos de 20pb. As seqüências de referência do grupo M do HIV-1 utilizadas encontram-se representadas na legenda. Os fragmentos representativos de cada subtipo encontram-se assinalados nas figuras.



A



B

Figura 13: Análise filogenética de NJ com modelo de substituição K-2p dos dois fragmentos gerados a partir da análise do *bootscan* das amostras PTH163 e PTH701 que apresentavam indícios de recombinação: a) fragmento I (6876-7156 em relação ao HXB2) b) fragmento II (7156-7280 em relação ao HXB2).

4.2) Distribuição dos subtipos nas categorias de exposição ao risco da casuística do período de 1990-92

Numa análise pontual da distribuição dos subtipos nas três categorias de exposição ao risco, heterossexual (HET), bissexual (BIS) e usuários de drogas intravenosas (UDI) verificamos que do total de 46 indivíduos declarados HET estudados, 43 amostras (93%) foram caracterizadas como subtipo B e 3 amostras (7%) foram caracterizadas como não-B (FI e recombinantes). Das 58 amostras de BIS estudadas, 52 (90%) foram caracterizadas como B e 6 (10%) não-B e por fim, das 26 amostras de usuários de drogas, 22 (85%) foram caracterizadas como B e 4 (15%) não -B, estes dados estão sumarizados na tabela 03. A frequência desses subtipos nas respectivas categorias de exposição ao risco podem ser visualizadas na figura 14.

Tabela -3: Distribuição das amostras do período de 1990-92 nos subtipos (B e não- B) nas três categorias de exposição ao risco (HET,BIS e UDI)

Subtipo	HET	BIS	UDI
B	43(93%)	52(90%)	22(85%)
Não- B	3(7%)	6(10%)	4(15%)
	46	58	26

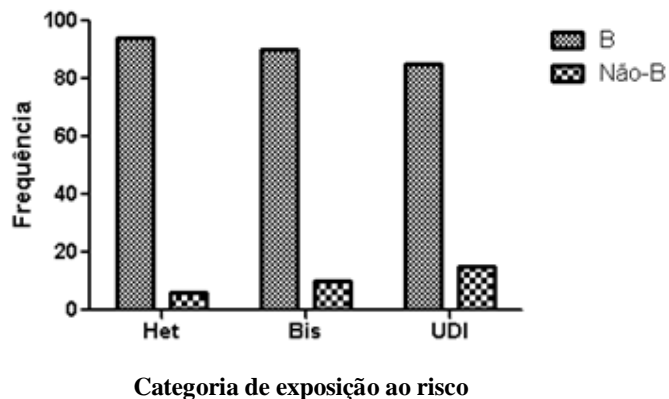


Figura 14: Gráfico em barras representativo da frequência dos subtipos B e não-B de HIV-1 nas três categorias de exposição ao risco estudadas do período de 1990-92.

O Brasil apresenta uma alta frequência da variante B” dentro do grupo de amostras do subtipo B, por isso, estratificamos as amostras caracterizadas como B de acordo com a assinatura do topo do V3 em GPG, GWG e GXG.. Neste contexto, na população de heterossexuais estudados caracterizados B no envelope (n=43), 25 (58%) apresentaram assinatura GPG, 9 (21%) GWG e 9 (21%) GXG, entre os bissexuais (n= 52), 13 (25%) apresentam assinaturas GPG, 32 (61%) GWG e 7 (14%) GXG. e por fim, entre os usuários de drogas (n=22), 10 (45%) apresentam assinaturas GPG, 5 (23%) GWG e 7 (32%) GXG. Nossos dados apontam para uma distribuição desigual com significância estatística (p=0,0009) entre as assinaturas B nas respectivas categorias de exposição. A categoria de exposição HET e UDI apresentou um perfil muito semelhante na distribuição das assinaturas do subtipo B com uma frequência mais acentuada do B pandêmico (GPG), no entanto na categoria de bissexuais a variante B” apresenta uma frequência expressivamente significativa. Estes dados estão sumarizados na tabela 4 e o gráfico destas frequência está ilustrado na figura 15.

Tabela 4: Dispersão das assinaturas do subtipo B nas distintas categorias de exposição ao risco das amostras coletadas no período de 1990-1992 no Rio de Janeiro

Subtipo (*)	Heterossexuais	Bissexuais	Usuários de drogas
B (GPG)	25(58%)	13(25%)	10(45%)
B” (GWG)	9(21%)	32(61%)	5(22.5%)
B (GXG)	9(21%)	7(14%)	7(32.5%)
	43	52	22

* Estratificação das amostras do subtipo B quanto assinatura do tripeptídeo do topo da alça do V3
p=0,0009



Figura 15: Gráfico em barras representativo das frequências das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 do período de 1990-92

4.3) Caracterização molecular da região do C2-V3 da *gp120* do envelope viral de amostras diagnosticadas e coletadas no período de 2006-2010.

Uma vez subtipadas as amostras do período de 1990-1992 no envelope viral, partimos para a caracterização molecular das amostras da segunda coorte que contempla pacientes com diagnóstico entre 2006-2010. A análise filogenética da região do envelope viral, correspondentes às amostras datadas entre 2006-2010 (n=88) encontra-se representada na figura 16, por uma árvore de NJ com topologia circular, não enraizada. Nesta, podemos observar que as amostras objeto desse estudo agruparam-se com as respectivas sequências de referência F1, C e A obtidas do Banco de Dados de Los Alamos com bootstrap de 94, 96 e 92, respectivamente. O valor de *bootstrap* no ramo que agrupa as sequências de nossas amostras com sequências de referências do subtipo B foi menor que 70%, provavelmente, por causa da presença de amostras recombinantes que se agruparam no ramo adjacente fazendo o valor de *bootstrap* baixar. Assim, a caracterização molecular obtida através da filogenia evidenciou uma prevalência de (84%) do subtipo B, (9%) F1, (3.5%) C, (2.3%) BF1 e (1.2%) A.

A partir da análise da topologia da árvore (Figura 16) verificamos que duas amostras assinaladas com losangos de cor marrom apresentaram um agrupamento filogenético divergente em um ramo adjacente ao grupo B. As mesmas foram excluídas da análise e o ramo que reuniu amostras do subtipo B passou a apresentar um valor de *bootstrap* mais elevado 68% (dados não apresentados) o que nos permitiu inferir que estas amostras se tratavam de possíveis recombinantes. A partir disto, submetemos as referidas amostras a

análise de *bootscan* (Figura 17) que nos revelou um evento de recombinação evidente entre os subtipos B e F1 na amostra PE93 (Figura 17A), não obstante a amostra PE115, não apresentou um perfil evidente de recombinação (Figura 17B), no entanto a mesma apresenta nos extremos do *bootscan* uma queda de homologia com o subtipo F1, o que poderia sugerir recombinação nas extremidades do fragmento estudado, porém há uma perda de sensibilidade deste método nas extremidades do fragmento. Com a finalidade de ter um resultado mais robusto, realizamos as árvores com fragmentos menores (Figura 18.A, B e C) e análise de pontos comparando a sequência da referida amostra frente à sequências consenso do subtipo B e F1 (Figura 18.D) evidenciando a presença de fragmento não F1 na referida amostra como pode ser visualizado na figura 18.

Através da tradução das sequências de nucleotídeo das amostras desta casuística, discriminamos a sequência de aminoácidos do topo da alça V3 do envelope viral das amostras classificadas como subtipo B. Do total de 74 amostras classificadas como subtipo B, 46 (62%) destas eram GPG, 17 (23%) eram GWG e 11 (15%) eram GXG. A marcação destas distintas assinaturas pode ser visualizada na figura 16.

As amostras assinaladas com um círculo tracejado na figura 16 tiveram suas sequências comparadas a fim de detectar os pontos de discordância nucleotídica (dados não mostrados) o que nos permitiu concluir que se tratavam de amostras relacionadas com alta identidade, o que poderia sugerir contaminação na sequência das mesmas e que as mesmas não foram exclusas das análises visto que só verificamos este alto grau de identidade na revisão final deste documento.

As amostras desta segunda coorte caracterizadas como B'' não tiveram um agrupamento diferenciado das amostras B (GPG) e B (GXG) pelo método de NJ, que temos ciência não ser o método mais robusto para este tipo de análise e por isso serão estudadas pelo método Bayesiano mais a frente neste manuscrito.

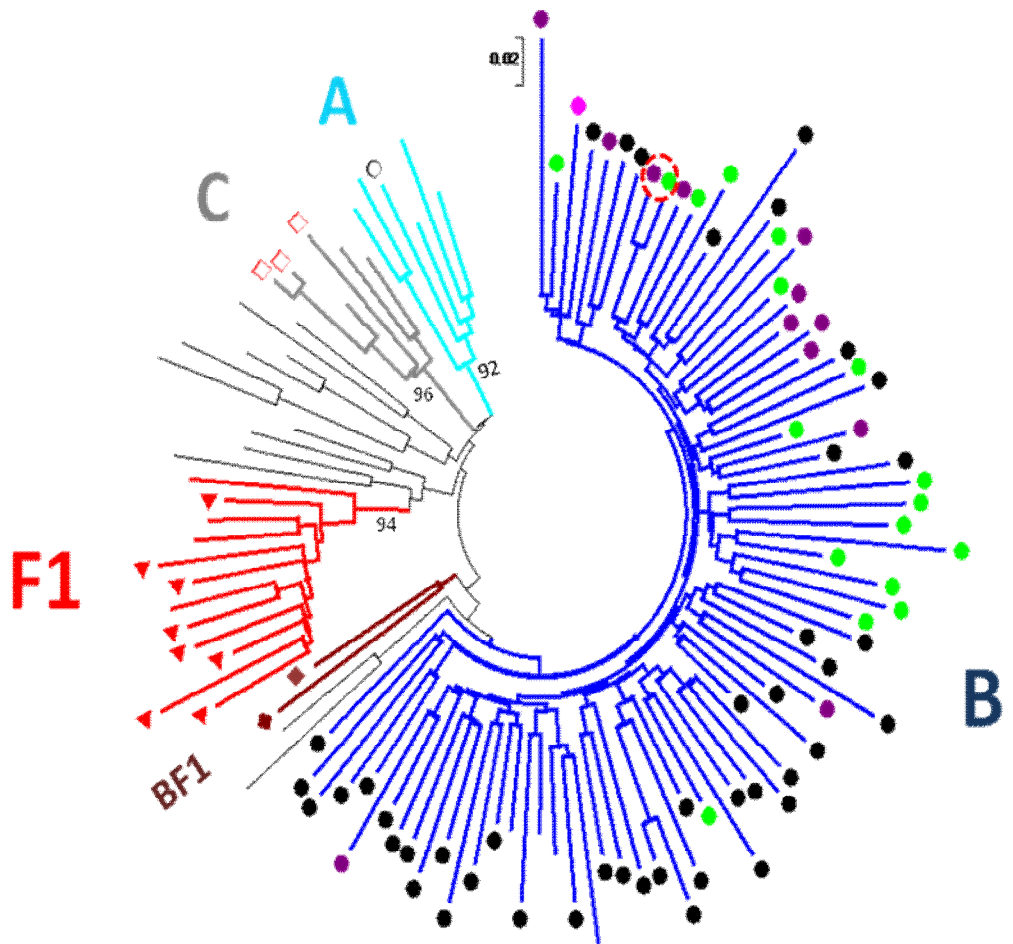
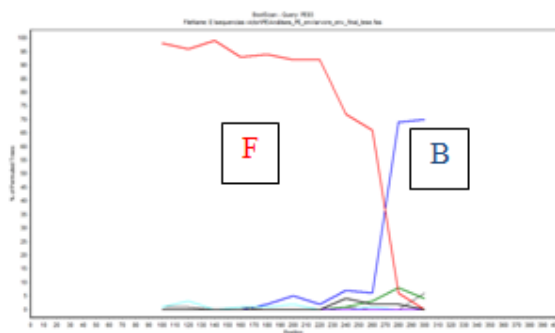


Figura 16: Análise filogenética por NJ com modelo de substituição de k2p , correspondente à região do C2-V3 do envelope viral (404pb) de 88 amostras indivíduos masculinos HIV-1 positivos do período de 2006-10. As sequências foram alinhadas com sequências de referências obtidas do Banco de Dados de Los Alamos, representando os subtipos do grupo M. A barra da escala indica 2% da divergência na sequência de nucleotídeo. As amostras caracterizadas como subtipo B estão com os ramos assinalados em azul, os do subtipo F1 estão em vermelho e em preto encontram-se os outros subtipos do grupo M. As amostras estudadas estão representadas da seguinte maneira: Amostras B pandêmico (GPG) assinaladas com círculos pretos, amostras da variante B'' (GWG) com círculos verdes, amostras B (GXG) assinaladas com círculos roxos, amostras recombinantes com losangos marrom e as amostras F1 com triângulos vermelhos, amostras C com quadrados vazios e amostra A com círculo vazio.

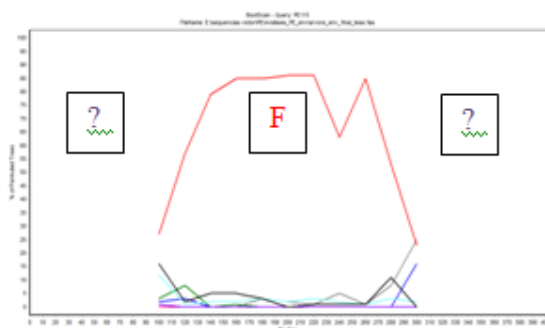


PE93- recombinanteBF1

17 (A)

Legenda

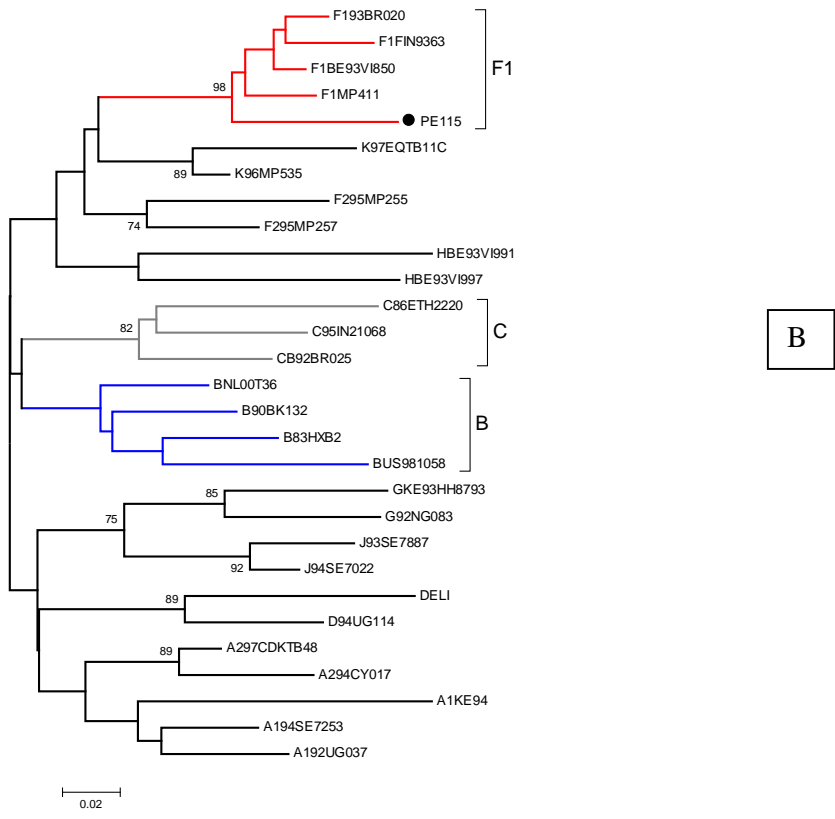
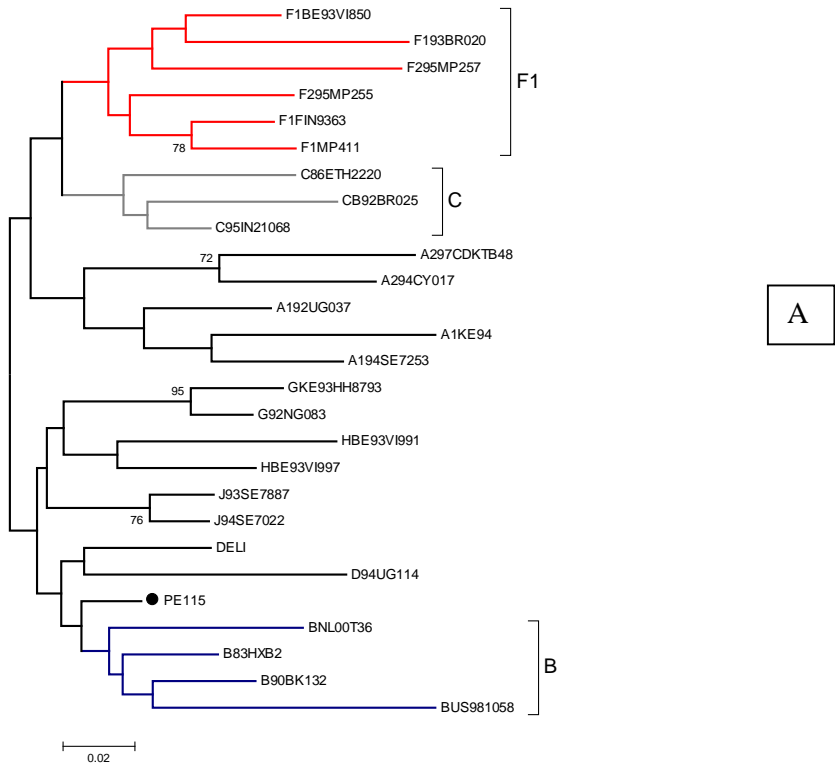
- A1KE94
- B83HXB2
- CB92BR025
- DELI
- F193BR020
- GKE93HH8793
- HBE93V1991
- J94SE7022
- K96MP535

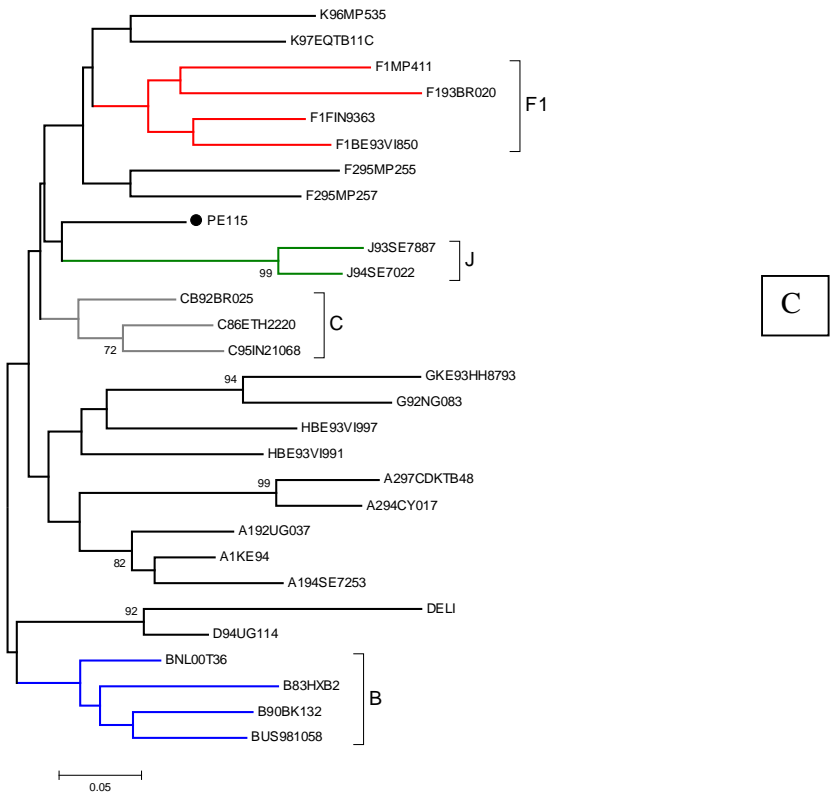


PE115- recombinanteUF1

17 (B)

Figura 17: Análise por *bootscanning* de duas amostras de HIV-1 na região C2-V3 do envelope viral: a) bootscan da amostra PE93 os parâmetros utilizados foram: janela = 200pb, passos de 20pb, b) bootscan da amostra PE115 janela = 200pb, passos de 20pb.





```

#ConsensoB   TGT GCC CCG GCT GGT TTT GCG ATT CTA AAG TGT AAT GAT AAG AAG TTC
#ConsensoF1  ... ..T ..A ... ..A ... ..A ... ..A ... ..A ... ..A ... ..A ...
#PE115       ... ..T ..A ... ..A ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
                 ↓ ↓
#ConsensoB   AAT GGA ACA GGA CCA TGT ACA AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT ACA CAT
#ConsensoF1  ... ..G ... ..G ... ..C ..AG ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
#PE115       ... ..C ..G ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C

#ConsensoB   GGA ATT AGG CCA GTA GTG TCA ACT CAA CTG CTG TTA AAT GGC AGT CTA
#ConsensoF1  ... ..A ..A ... ..G ..A ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
#PE115       ... ..A ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C

#ConsensoB   GCA GAA GAA GAG GTA GTA ATT AGA TCT GAA AAT TTC ACG GAC AAT GCT
#ConsensoF1  ... ..T A.. A.. ..C ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
#PE115       ... ..- --- --- -.. A.. ..C ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C

#ConsensoB   AAA ACC ATA ATA GTA CAG CTG AAT GAA TCT GTA GAA ATT AAT TGT ACA
#ConsensoF1  ... ..C ..T ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
#PE115       ..G .A. ... ..A.T ..C ..T ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C

#ConsensoB   AGA CCC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT ATG GGA CCG GGG AGA
#ConsensoF1  ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C CA.
#PE115       ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C CA.
                 ↓ ↓
#ConsensoB   GCA TTT TAT GCA ACA GGA GAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA CAA GCA CAT
#ConsensoF1  ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
#PE115       ... ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
                 ↓ ↓
#ConsensoB   TGT AAC CTT AGT AGA ACA AAA TGG AAT AAC ACT TTA AAA CAG ATA GCT
#ConsensoF1  ... ..G ..G ... ..G ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C
#PE115       ... ..A ..G ..G ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C ..C

#ConsensoB   ATA AAA AAT TAA GA
#ConsensoF1  GC. ... .G. ... AG
#PE115       C.. T.. ... ..

```

Figura 18: Análise filogenética de NJ com modelo de substituição K-2p dos dois fragmentos gerados a partir da análise do *bootscan* das amostras PE93 e PE115 que apresentavam indícios de recombinação: a) fragmento I (6876-6995 em relação ao HXB2) b) fragmento II (6996-7135 em relação ao HXB2) c) fragmento III (7136-7279 em relação ao HXB2) d) Análise dos sítios informativos da amostra 115 a partir do consenso de sequências brasileiras dos subtipos B e F. As setas assinaladas em azul reportam-se a identidade com o consenso B e as setas em vermelho reportam-se a identidade com o consenso F1. Os retângulos em vermelho indicam o segmento com identidade com o subtipo F1.

4.4) Distribuição dos subtipos nas categorias de exposição ao risco da casuística do período de 2006-2010

Do total de 39 amostras de indivíduos HET estudados, 32 (82%) foram caracterizados como B e 7 (18%) caracterizados como não-B, das 49 amostras de BIS estudadas, 42 (86%) foram caracterizados B e 7 (14%) não-B. A distribuição dos subtipos B e não- B de HIV-1 nos grupos de heterossexuais e bissexuais, não apresentou diferença estatística significativa. Estes dados estão sumarizados na tabela 5 e a frequência desses subtipos nas respectivas categorias de exposição ao risco é visualizada na figura 19.

Tabela5: Distribuição das amostras do período de 2006-2010 por subtipo (B e não- B) e nas duas categorias de exposição ao risco (HET e BIS)

Subtipo	(HET)	(BIS)
B	32(82%)	42(86%)
Não- B	7(18%)	7(14%)
	39	49

(p>0,05)



Figura 19: Gráfico em barras representativo da frequência dos subtipos B e não-B do HIV-1 nos nas duas categorias de exposição ao risco estudadas no período de 2006-10.

Quando avaliamos as assinaturas moleculares no topo da alça V3 das amostras caracterizadas como B no período de 2006-2010 na população de heterossexuais estudados,

(n=32), 22 (69%) apresentaram assinatura GPG, 4 (13%) GWG e 6 (18%) GXG. , Entre os bissexuais caracterizados B (n= 42), 24 (57%) apresentam assinaturas GPG, 13 (31%) GWG e 5 (12%) GXG e. Estes dados estão sumarizados na tabela -6 e figura 20.

Tabela 6: Distribuição das assinaturas moleculares do subtipo B nas duas categorias de exposição ao risco identificadas no período de 2006-2010

Subtipo (*)	Heterossexuais	Bissexuais
B (GPG)	22(69%)	24(57%)
B'' (GWG)	4(12%)	13(31%)
B (GXG)	6(19%)	5(12%)
	32	42

* Estratificação das amostras do subtipo B quanto assinatura do tripeptídeo do topo da alça do V3

P>0,05

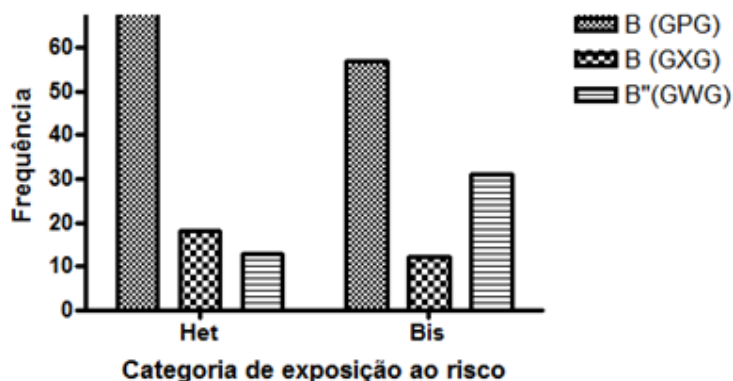


Figura 20: Gráfico em barras representativo da frequência das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 nas categorias de exposição ao risco HET e BIS das amostras do período de 2006-10.

4.5) Análise temporal dos subtipos nas categorias de exposição ao risco

Com o intuito de avaliarmos temporalmente a distribuição dos subtipos nas duas categorias de exposição ao risco (HET e BIS) presentes em ambas casuísticas do estudo, fizemos uma análise comparativa das mesmas. No grupo de heterossexuais a frequência do subtipo B foi de [93% para 82%] e a frequência dos não- B foi [7% para 18%], sendo estas

freqüências relativas à primeira casuística e a segunda do estudo, respectivamente. Quanto ao grupo de bissexuais a freqüência do subtipo B foi de [90% - 86%] e a dos não- B foi de [10% - 14%]. Assim, quando comparamos a distribuição dos subtipos B e não- B dentro das categorias de exposição ao risco, heterossexual e bissexual, ao longo do tempo não evidenciamos uma diferença no perfil epidemiológico no Rio de Janeiro.

Com a análise temporal da dispersão das distintas assinaturas moleculares do topo do V3 nas amostras do subtipo B nas duas categorias de exposição observamos que a na categoria de HET a freqüência da assinatura GPG do subtipo B foi de [58% - 69%] da assinatura da GWG [21% - 13%] e GXG foi de [21% - 18%], sendo primeiro e o segundo percentual relacionado a primeira e a segunda casuística do estudo respectivamente. Estes resultados apontam que a dispersão das assinaturas moleculares do subtipo B dentro do grupo de heterossexuais mostrou-se similar ao longo do tempo, com um ligeiro aumento do motivo GPG e pequena queda da motivo GWG como podemos verificar na tabela 7 e na Figura 21. A distribuição das assinaturas do subtipo B no grupo de bissexuais nos dois períodos do estudo segue a seguinte distribuição: GPG [25% - 57%], GWG [61% - 31%] e GXG [14% - 12%]. Estes achados revelam um perfil epidemiológico bastante dinâmico da dispersão das assinaturas do subtipo B, onde a variante B'' teve uma prevalência acima de 60% da freqüência total do subtipo B no grupo de bissexuais no período de 1990-92, no entanto uma mudança expressiva foi verificada neste cenário com uma redução na ordem de 50% desta variante e um aumento em 32% da assinatura GPG, apresentando significância estatística (p=0,0048). Já a assinatura (GXG) não teve sua freqüência alterada ao longo do tempo como podemos ilustrar na tabela 8 figura 22). Assim, ao analisarmos temporalmente a dispersão das assinaturas moleculares do subtipo B dentro do grupo de heterossexuais e bissexuais verificamos uma dinâmica diferente dentro de cada grupo.

Tabela 7: Distribuição das assinaturas moleculares do subtipo B na categoria de exposição heterossexual nas duas casuísticas do estudo

Subtipo (*)	Het-1990-92	Het-2006-10
B (GPG)	25 (58%)	22(69%)
B'' (GWG)	9(21%)	4(12%)
B (GXG)	9(21%)	6(19%)
	43	32

* Estratificação das amostras do subtipo B quanto assinatura do tripeptídeo do topo da alça do V3

p>0,05

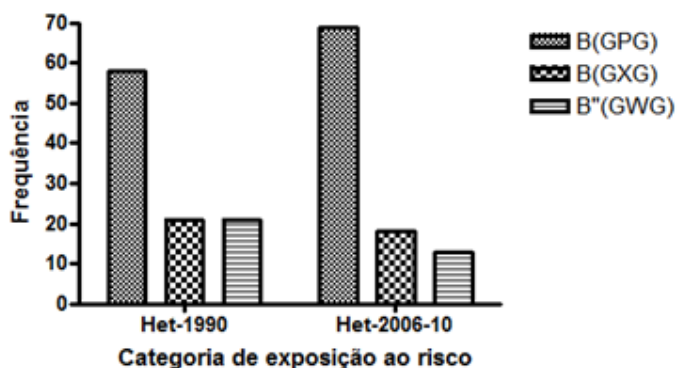


Figura 21: Gráfico em barras representativo da frequência das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 na categoria de exposição heterossexual nos dois períodos de estudo.

Tabela 8: Distribuição das assinaturas moleculares do subtipo B na categoria de exposição bissexual nas duas casuísticas do estudo

Subtipo (*)	Bis-1990-92	Bis-2006-10
B (GPG)	13(25%)	24(57%)
B'' (GWG)	32(61%)	13(31%)
B(GXG)	7(14%)	5(12%)
	52	42

* Estratificação das amostras do subtipo B quanto assinatura do tripeptídeo do topo da alça do V3

p>0,0048

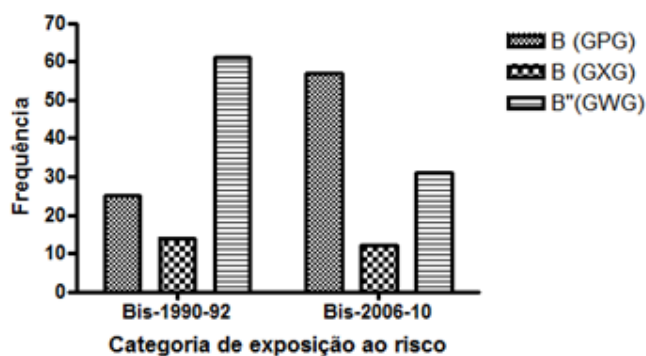


Figura 22: Gráfico em barras representativo da frequência das assinaturas moleculares do subtipo B no topo da alça do V3 na categoria de exposição bissexual nos dois períodos de estudo.

4.6) Dinâmica temporal da recombinação

Objetivando estudar a dinâmica da recombinação, selecionamos, randomicamente, um subconjunto de amostras caracterizadas previamente na região do envelope viral dos dois períodos estudados, 1990-92 e 2006-10. Para tal análise, incluímos a análise filogenética da região da polimerase, que é uma região altamente recombinogênica.

Das 34 amostras analisadas filogeneticamente na região da polimerase, correspondentes as amostras da primeira casuística, 30 se agruparam de forma consistente com amostras de referência do subtipo B (*bootstrap* = 99), três amostras se agruparam com amostras de referências do subtipo F1 (*bootstrap* = 90) e a amostra PTH367 apresentou-se num ramo adjacente ao do subtipo F1, sugerindo a ocorrência de recombinação intragênica (Figura 23). A amostra PTH367 foi posteriormente avaliada através da metodologia de *bootscan*, a qual confirmou o evento de recombinação entre os subtipos B e F1, esta amostra está assinalada com uma seta vermelha na figura 23. (Os dados do *bootscan* serão apresentados no tópico 4.7).

A maioria das amostras caracterizada na região do envelope como pertencentes a variante B” apresentou um agrupamento diferenciado das amostras B, sugerindo que podemos identificá-las como um grupo distinto na região estudada, muito embora com valores de *bootstrap* menores que 70%.

Da análise comparativa dos subtipos nas duas regiões alvo do estudo, *env* e *pol* foi possível verificar a ocorrência de recombinação intergênica, ou seja, de genomas com subtipos discordantes entre as duas regiões, em quatro amostras. Estas amostras estão assinaladas com setas amarelas na figura 23.

Das 45 amostras analisadas filogeneticamente na região da polimerase, correspondentes as amostras da segunda casuística, 37 se agruparam de forma consistente com amostras de referência do subtipo B (*bootstrap* = 80), 2 amostras se agruparam com amostras de referência do subtipo F1 (*bootstrap* = 77), 1 amostra se agrupou ao subtipo C e cinco amostras (PE16, PE25, PE43, PE54 e PE65) que estão assinaladas com setas vermelhas na figura 24 apresentaram um agrupamento divergente e por isso, foram submetidas a análise do *bootscan* que confirmou a recombinação intragênica das mesmas (Figura 24). Os dados apontados no *bootscan* serão melhor apresentados no item 4.7.

A análise conjunta das duas regiões gênicas estudadas revelou uma frequência bastante similar dos eventos de recombinação intergênica/intragênica em torno de 14% nas amostras do período de 1990-92 e de 11% nas amostras do período de 2006-10.

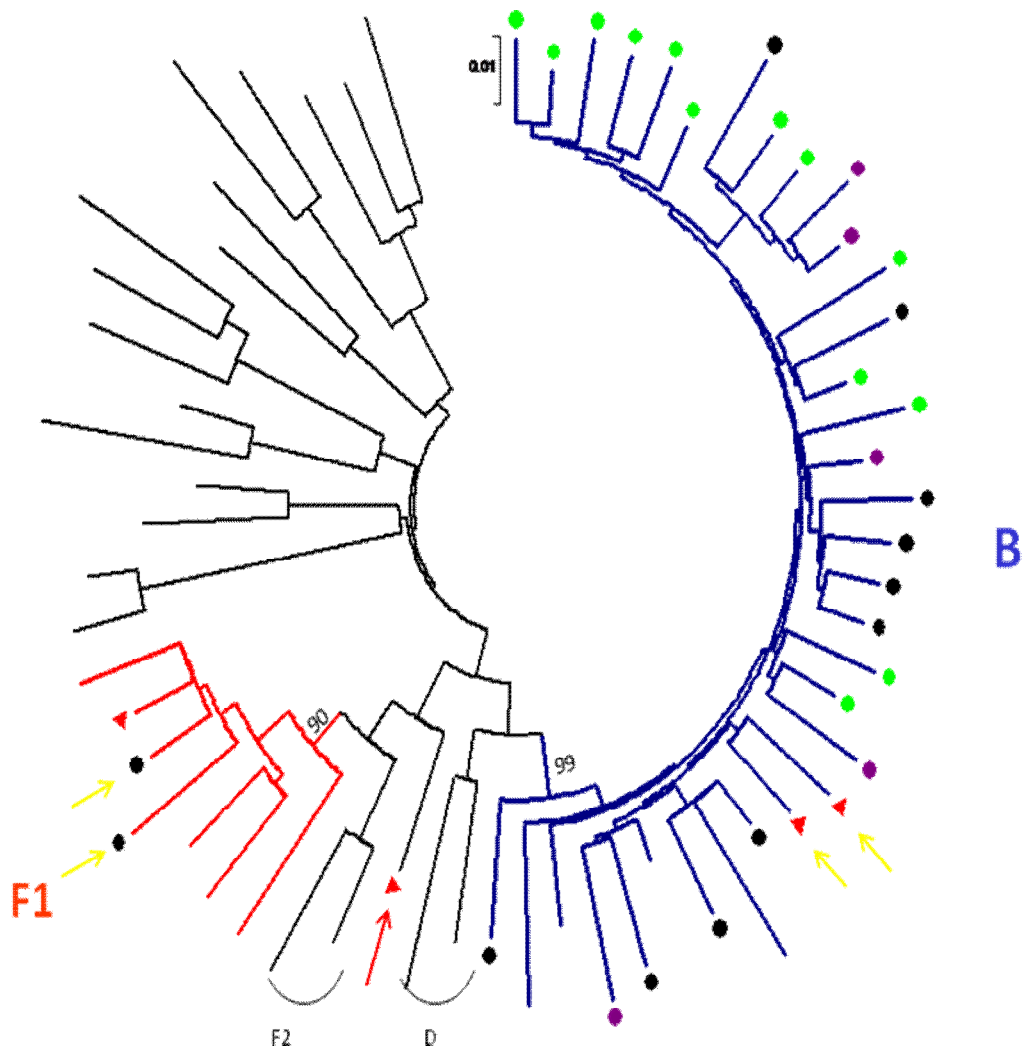


Figura 23: Análise filogenética por NJ com k2p correspondente à região da polimerase (1000pb) de 34 amostras do período de 1990-92 previamente caracterizadas no envelope. As sequências foram alinhadas com sequências de referências obtidas do Banco de Dados de Los Alamos, representando os subtipos do grupo M. A barra da escala indica 1% da divergência na sequência de nucleotídeos. - As amostras classificadas como subtipo B, ramos azuis, foram discriminadas quanto a assinatura do topo do V3 em GPG (círculos pretos), GWG (círculos verdes), GXG (círculos roxos). O ramo das amostras do subtipo F1 está ressaltado em vermelho. As amostras previamente classificadas no *env* como subtipo F1 estão marcadas com triângulos vermelhos F1. As setas amarelas representam os recombinantes intergênicos e a seta vermelha o recombinante intragênico.

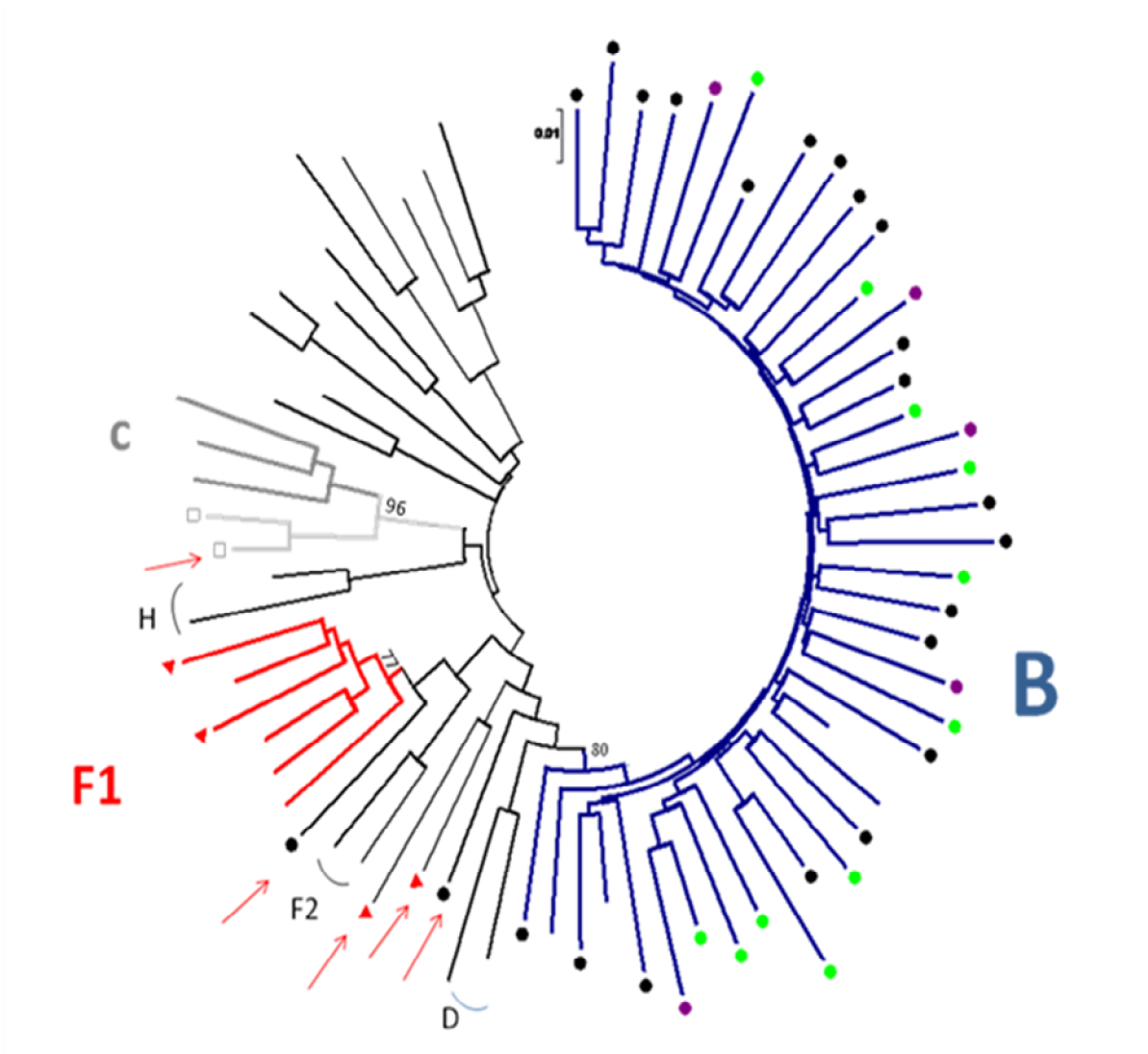


Figura 24: Análise filogenética por NJ com k2p correspondente à região da polimerase (1000pb) de 45 amostras do período de 2006-10 previamente caracterizadas no envelope. As sequências foram alinhadas com sequências de referências obtidas do Banco de Dados de Los Alamos, representando os subtipos do grupo M. A barra da escala indica 1% da divergência na sequência de nucleotídeos. As amostras classificadas como subtipo B, ramos azuis, foram discriminadas quanto a assinatura do topo do V3 em GPG (círculos pretos), GWG (círculos verdes), GXG (círculos roxos) . O ramo das amostras do subtipo F1 está ressaltado em vermelho. As amostras previamente classificadas no *env* como subtipo F1 estão marcadas com triângulos vermelhos. A seta vermelha o recombinante intragênico.

4.7) Estudo da relação entre as formas recombinantes detectados e os CRF descritos

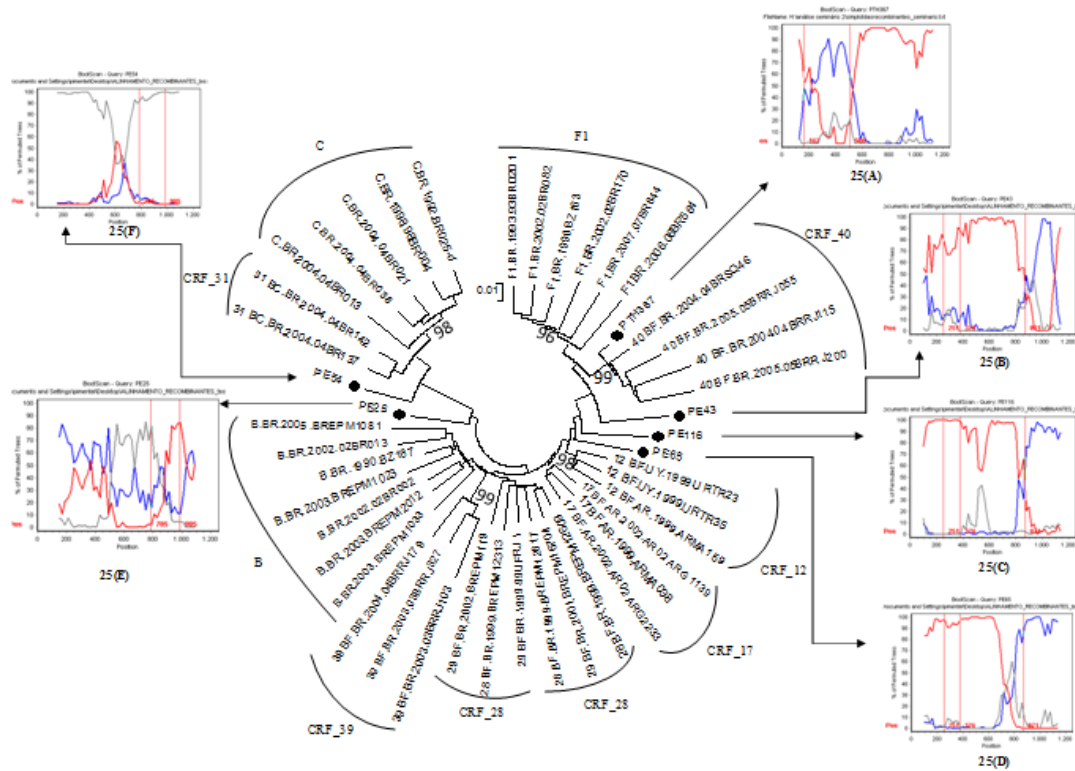
As amostras que apresentaram indícios de recombinação a partir da sua distribuição topográfica nas árvores filogenéticas da região da polimerase dos dois períodos estudados e que tiveram este evento confirmado pelo perfil do *bootscan*, árvores filogenéticas dos fragmentos com subtipos distintos e análises dos sítios informativos foram estudadas em conjunto com os CRF_BFs com recombinação na região *pol*. Tal análise encontra-se apresentada na figura 25.

Na figura 25 foi possível verificar que a amostra PTH367 agrupou-se no mesmo ramo que os CRF_40BF com alto valor de *bootstrap* (99). O *bootscan* das mesmas representado na figura 25(A) revelou que a nossa amostra apresenta os mesmos pontos de recombinação que o CRF_40BF, onde as barras verticais em vermelho representam os pontos de recombinação dos subtipos B e F1 do referido CRF na região da polimerase.

As amostras PE43, PE116 e PE65, agruparam-se independentes entre si, no entanto em ramos adjacentes ao CRF12_BF. Os gráficos *bootscan* das referidas amostras estão ilustrados respectivamente nas figuras 25(B), 25(C) e 25(D), revelaram que todas elas apresentaram um ponto (terceiro) de recombinação igual ao CRF12_BF. As barras verticais em vermelho destes *bootscans* representam os pontos de recombinação do CRF12_BF na região da polimerase.

As amostras PE25 e PE54 apresentaram um agrupamento filogenético independente, em ramos adjacentes ao CRF31_BC, como pode ser visualizado na figura 25. A análise do *bootscan* revelou que as respectivas amostras não apresentaram nenhum ponto de recombinação comum ao CRF31_BC como pode ser visualizado nas figuras 25(E) e 25(F), onde as barras verticais em vermelho representam os pontos de recombinação do CRF_31BC na região da polimerase.

Das seis amostras do nosso estudo caracterizadas como recombinantes, apenas uma delas apresentou um perfil similar a um CRF já descrito e, portanto, como não foi estudado em todas as regiões gênicas nos limitamos a classificá-la como um CRF40_BF- *like*. As demais amostras são exemplos de formas recombinantes únicas, e nenhuma delas parece ter uma relação filogenética estreita na região da polimerase viral.



Legenda

—	A192UG037
—	B83HXB2
—	CB92BR025
—	F193BR020
—	GKE93HH8793
—	HBE93V1991
—	J94SE7022
—	K96MP535

Figura 25: Análise filogenética realizadas pelo método de NJ com modelo de correção de k2p do fragmento parcial da polimerase (1200bp) das seis amostras identificadas como recombinantes na polimerase nas duas casuísticas. As sequências foram alinhadas com sequências correspondentes aos 7 CRFs descritos na América Latina com recombinação neste fragmento. Para esta análise também foram incluídas amostras de referência dos subtipos B, C e F1. Os gráficos de bootscan destas seis amostras recombinantes no *pol* detectadas no presente estudo estão representados nas figuras 25 (A-F). Os parâmetros utilizados no bootscan foram: janela = 300pb, passos de 20pb, as linhas vermelhas do bootscan refletem a identidade com o subtipo F1, a linha azul com o subtipo B e a linha cinza subtipo C. Já as linhas verticais vermelhas representam os pontos de recombinação dos CRFs possivelmente relacionados com a amostra analisada

4.8) Estudo das redes de transmissão entre as amostras do período de 1990-92

Objetivando identificar a ocorrência de redes de transmissão entre as amostras da primeira casuística previamente classificadas como subtipo B nos distintos grupos de risco (HET, BIS e UDI), realizamos a análise Bayesiana da região do envelope que nos gerou uma árvore filogenética mais - robusta para este tipo de análise.

A árvore Bayesiana ilustrada na figura 26A, que representa as amostras de acordo com a categoria de exposição ao risco, HET (verde), BIS (roxo) e UDIs (vermelho), nos permitiu verificar o agrupamento entre muitas amostras pertencentes a distintas categorias de risco, mostrando que desde o início dos anos 90 as redes de transmissão não se limitavam a um grupo específico, mas que já haviam redes de transmissão que transitavam entre as distintas categorias de risco. No entanto na figura 26B, salientamos numa árvore idêntica a demonstrada na figura 26A, o agrupamento de algumas amostras de acordo com a categoria de risco com alto suporte (acima de 0,85), mostrando que há indícios de rede de transmissão entre indivíduos da mesma categoria de exposição.

As relações filogenéticas estabelecidas pela análise bayesiana entre as amostras da primeira casuística foram usadas para avaliar o grau de agrupamento de acordo com a categoria de exposição ao risco. O grau de relação filogenética das sequências de HIV do subtipo B nas distintas categorias de exposição ao risco foi estimado pelos testes estatísticos AI e PS -implementados no programa BaTS. Quando a estrutura filogenética das amostras do subtipo B do HIV estudadas foi analisada pelo teste PS, o mesmo rejeitou a hipótese nula de distribuição aleatória ($p=0.001$), enquanto que o teste AI foi quase significativo ($p=0,079$) (Tabela 9).

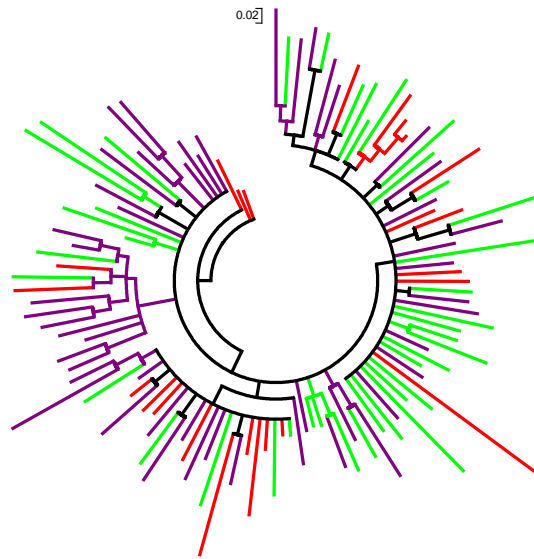
Tabela 9: Teste de agrupamento filogenético das sequências de HIV do Rio de Janeiro do período de 1990-92 segundo a categoria de exposição ao risco

Subtipo	Estatística	categoria de exposição	Valor observado (95%)*	Valor esperado ^a (95%)*	p
B	AI	HET, BIS e UDI	6.80 (5.88-7.76)	7.73 (6.68-8.71)	0.079
B	PS	HET, BIS e UDI	43.34 (41.0-46.0)	49.20 (45.94-52.30)	<0,001

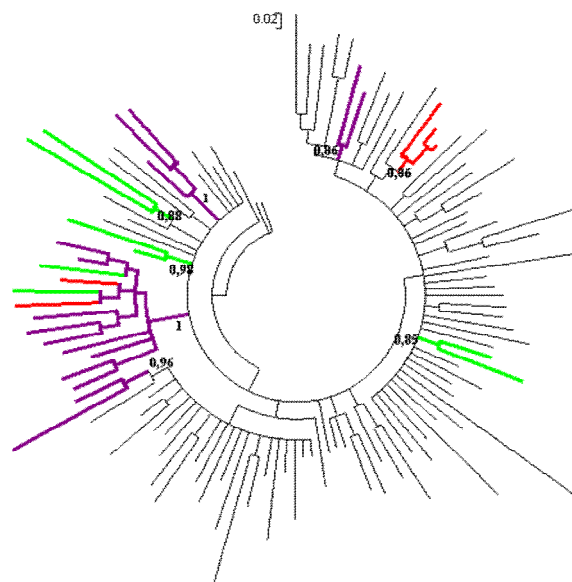
O valor destacado em negrito refere-se ao valor menor que 0,05

* Intervalo de confiança

a – Valores de AI ou PS esperados sob a hipótese nula (a hipótese de não agrupamento das amostras segundo a categoria de risco).



26(A)



26(B)

Figura 26: Árvore Bayesiana das 117 amostras classificadas como subtipo B no período de 1990-92 na região do *env* (404pb). Os ramos verdes indicam amostras de HET, os ramos em vermelho são de UDI e os ramos em roxo representam amostras de indivíduos BIS, b) Destaque apenas para ramos com amostras da mesma categoria de exposição ao risco que se agruparam com valores de probabilidade acima de 0,8.

4.9) Estudo da dispersão das assinaturas moleculares do subtipo B nos dois períodos estudados (1990-92 e 2006-10)

A fim de confirmar as relações filogenéticas apontados pela árvore de *Neighbor Joining* de amostras classificadas como B de acordo com as diferentes assinaturas moleculares do topo V3 do *env* (GPG, GXG e GWG) realizamos a análise Bayesiana das amostras do Rio de Janeiro do período de 1990-92. Esta análise nos possibilitou visualizar uma segregação entre as amostras B com as distintas assinaturas moleculares conforme pode ser visualizado na figura 27.

O grau de relação filogenética das sequências de HIV do subtipo B foi estimado pela utilização pelos testes estatísticos AI e PS. Quando a estrutura filogenética das amostras do subtipo B foi analisada ambos os teste rejeitaram a hipótese nula de agrupamento aleatório, salientando portanto a agregação das amostras segundo a assinatura no topo do V3 ($p < 0,05$) como pode ser visualizada na tabela 9.

Tabela 10: Teste de agrupamento filogenético das sequências do subtipo B do HIV de acordo com as assinaturas moleculares do topo do v3 de amostras do Rio de Janeiro do período de 1990-92

Subtipo	Estatística	Grupo	Valor observado (95%)*	Valor esperado ^a (95%)*	p
B	AI	GPG, GXG e GWG	4.31 (3.49-5.20)	7.82 (6.94-8.74)	<0,001
B	PS	GPG, GXG e GWG	27.02 (25.0-29.0)	50.37 (46.26-54.85)	<0,001

O valor destacado em negrito refere-se ao valor menor que 0,05

* Intervalo de confiança

a – Valores de AI ou PS esperados sob a hipótese nula (a hipótese de não agrupamento das amostras segundo as assinaturas moleculares do topo do V3).

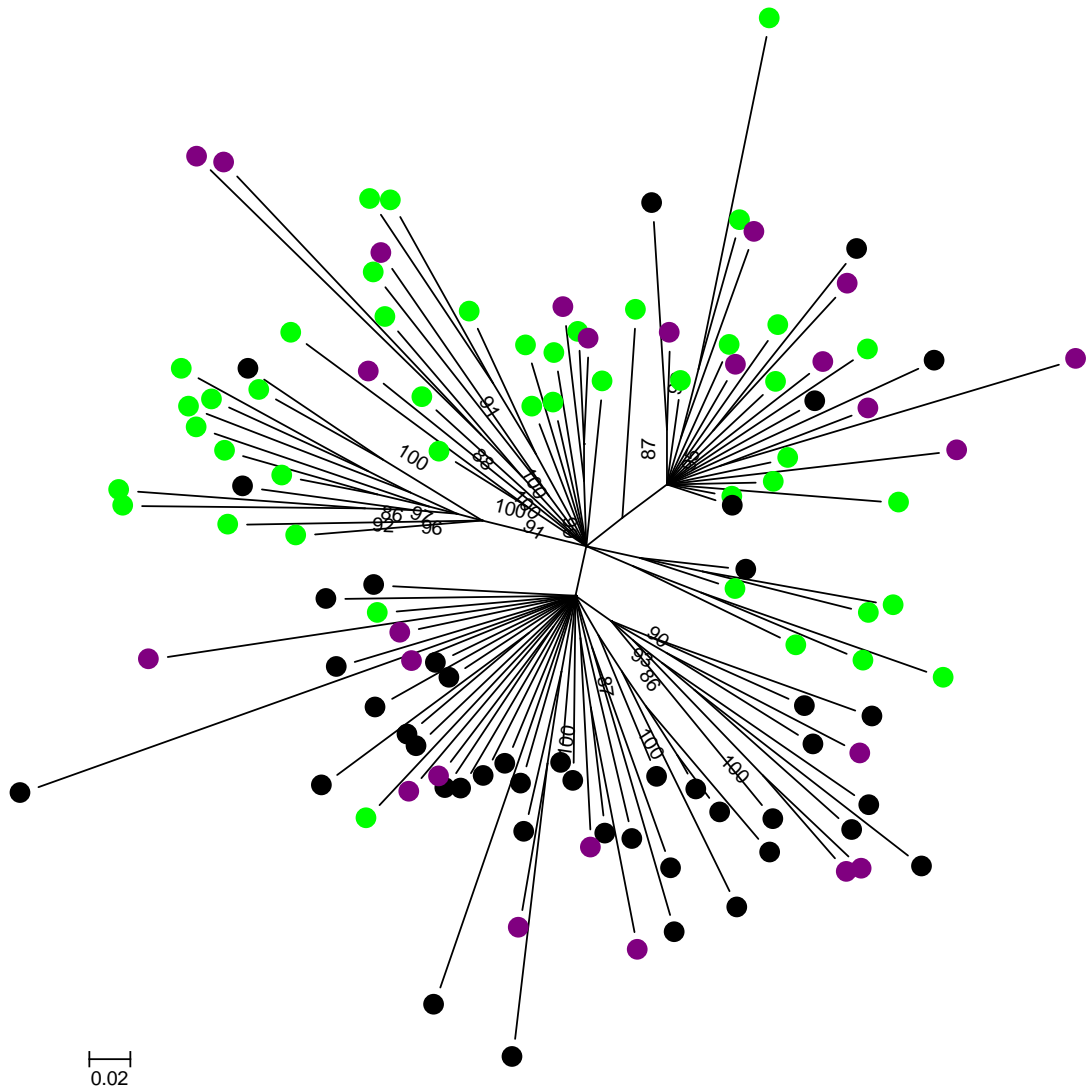


Figura 27: Árvore Bayesiana das 117 amostras caracterizadas como subtipo B do período de 1990-92 na região do *env* (404pb). Amostras assinaladas com círculos em verde correspondem à assinatura GWG, círculos roxos GXG e os círculos em preto GPG.

A partir do momento que foi confirmada a segregação das amostras do subtipo B segundo as suas assinaturas moleculares do topo do v3 nas amostras da primeira casuística deste projeto, a mesma análise foi estendida para as amostras estudadas do segundo período que, reflete o momento mais atual da epidemia de Aids no Rio de Janeiro. A árvore gerada pelo Mrbayes (Figura 28) nos permitiu distinguir diferentes agrupamentos entre as amostras do subtipo B com ramos predominantemente ou exclusivamente com assinatura GPG, ao passo que outros ramos apresentavam um predomínio das assinaturas GWG. Neste contexto submetemos os dados gerados pela análise de Mrbayse aos testes estatísticos AI e PS que refutam a hipótese nula de que as amostras se agruparam de forma randômica (Tabela 10). Os perfis apontados nos dois momentos do nosso estudo 1990-92 e 2006-10 revelaram uma congruência na dispersão das variantes do subtipo B, indicando que estas se mantêm ao longo do tempo.

Tabela 11: Teste de agrupamento filogenético das sequências do subtipo B do HIV de acordo com as assinaturas moleculares do topo do v3 de amostras do Rio de Janeiro do período de 2006-10

Subtipo	Estatística	Grupo	Valor observado (95%)*	Valor esperado ^a (95%)*	p
B	AI	GPG, GXG e GWG	2.36 (1.75-2.98)	4.8 (4.1-5.4)	<0,001
B	PS	GPG, GXG e GWG	14.3 (12-16)	26.4 (24.3-28.1)	<0,001

O valor destacado em negrito refere-se ao valor menor que 0,05

* Intervalo de confiança

a – Valores de AI ou PS esperados sob a hipótese nula (a hipótese de não agrupamento das amostras segundo o grupo de risco).

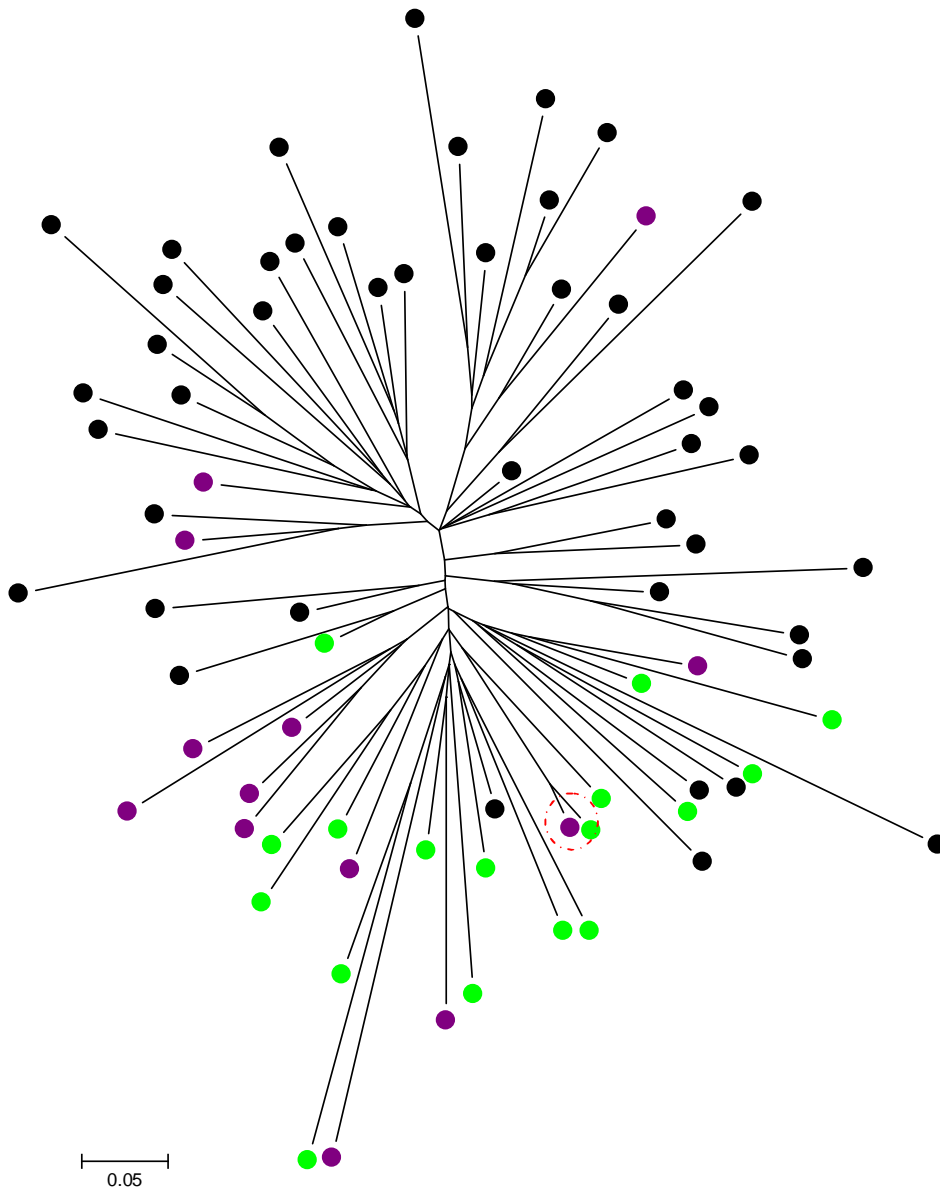


Figura 28: Árvore Bayesiana das 74 amostras caracterizadas como subtipo B do período de 2006-10 na região do *env* (404pb). Amostras assinaladas com círculos em verde correspondem à assinatura GWG, círculos roxos GXG e os círculos em preto GPG.

V. Discussão

5.1) Diversidade e dinâmica dos subtipos B e F1 no Rio de Janeiro

O presente trabalho tem por finalidade entender a diversidade e dinâmica dos subtipos e formas recombinantes de HIV-1 no Rio de Janeiro em distintas categorias de exposição ao risco. Para tal, este estudo contou com amostras de pacientes masculinos HIV-1 soropositivos em dois cortes da epidemia de Aids na cidade do Rio de Janeiro. A primeira casuística do estudo conta com amostras de pacientes que em sua grande maioria já havia evoluído à Aids no período entre 1990-1992 e portanto, representando o contexto inicial desta epidemia na nossa cidade. A segunda casuística era formada por amostras de indivíduos diagnosticados no período de 2006-2010. Assim, a caracterização molecular destas duas casuísticas nos permitiu compreender a dinâmica da diversidade e dispersão das variantes virais entre as categorias de exposição ao risco (HET e BIS) num intervalo de aproximadamente 20 anos e comparar os resultados obtidos para UDIs da primeira casuística com dois estudos posteriores focados nesta população. Embora existam alguns estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 no Rio de Janeiro, nenhum deles traçou a dinâmica temporal dos subtipos dentro de cada categoria de exposição ao risco.

O primeiro objetivo deste trabalho foi estudar destas duas casuísticas em duas regiões gênicas possuidoras de taxas de evolução nucleotídica marcadamente distintas, sendo o primeiro alvo a região c2-v3 da *gp120*, uma região bastante polimórfica, e, portanto rica em informações filogenéticas e sobre o qual versaram os primeiros trabalhos de epidemiologia molecular do HIV-1 Além disso, esta região é determinante no tropismo de células T e macrófagos (SHIODA *et al.*, 1993; HWANG *et al.*, 19991), onde com base nas posições 11 e 25 da alça v3 podemos prever o co-receptor utilizado pelo vírus (CHOE *et al.* 1996, COAKLEY *et al* 2005), esta contém o epítipo reconhecido pelos anticorpos que neutralizam a infecção pelo HIV *in vitro* (PALKER *et al.*, 1988; LAROSA *et al.*, 1990) e estimula uma potente resposta imunológica citotóxica e auxiliar por linfócitos T (TAKAHASHI *et al.*, 1992; PALKER *et al.*, 1989). E a segunda, a região da polimerase, mais especificamente a região genômica correspondente às enzimas protease e transcriptase reversa, a qual será abordada no tópico 5.3 desta discussão.

Diante deste panorama, o primeiro passo do nosso trabalho foi estabelecer a caracterização molecular das amostras de HIV-1 datadas de 1990-92, na região do envelope

viral (*gp120*), onde foi possível constatar uma alta prevalência do subtipo B (90%) e menor frequência dos subtipos não- B (8% F1 e 2%BF1). Os presentes dados corroboram os percentuais anteriormente descritos, em dois estudos pioneiros, para os subtipos B e F1 na região do envelope viral com amostras do mesmo período. No estudo desenvolvido por Lowagie e cols. estudando de 21 amostras, 81% destas foram caracterizadas como subtipo B e 19% amostras caracterizadas como F1. Já no estudo realizado por Morgado e cols. de um total de 28 amostras, 92% foram caracterizadas como subtipo B, 4% caracterizadas como subtipo F e 4% recombinante BF. Em virtude desta co-circulação dos subtipos B e F1 no Rio de Janeiro nos anos 90, também foi documentada a presença do primeiro recombinante BF no Brasil (MORGADO *et al.*, 1994; SABINO *et al.*, 1994), dentre as amostras da primeira casuísticatambém encontramos duas amostras com perfil recombinante BF1 no envelope viral. Embora apenas 2% das amostras tenham sido identificadas como recombinantes nesta região, essa baixa representatividade de recombinantes já era esperada, pois a região do envelope viral possui um alto grau polimórfico e em consequência disso apresenta uma frequência baixa de recombinação (majorkins *et al.*, 2003).

Das amostras estudadas no período de 2006-10 na região do envelope, 84% foram caracterizadas como B ao passo que 16% foram classificadas como não-B (9%F1, 3,5%C, 2,3%BF1, 1,2%A), quando comparamos os nossos achados ao estudo de Cabral e cols. publicado em 2006 com amostras mais recentes do Espírito Santos nas regiões do *env* e *gag* verificamos uma frequência dos subtipos próximos ao nosso, onde 76% das amostras foram classificadas como B, 9.3% F1, 12% BF1, e 3.1% subtipo C. Como recentemente quase todos os estudos estão baseados na região da polimerase viral, torna-se precária a comparação dos dados atuais com outros estudos. . No entanto, a partir da análise desta casuística, que reflete o momento mais atual da epidemia de Aids no nosso estado, podemos reafirmar a alta prevalência do subtipo B em detrimento dos demais subtipos. Embora atualmente o percentual do subtipo B seja em torno dos 80-85%, onde se pode constatar um decréscimo em torno de 10% quando comparado com as amostras HIV-1 no início dos anos 90, o que pode ser justificado pela emergência dos recombinantes ou de outros subtipos não-B.

Estudos de evolução viral estimam que a introdução do subtipo F1 no Brasil tenha ocorrido entre 10 a 15 anos depois da introdução do subtipo B, ou seja, no final dos anos 70 ou início dos anos 80 (BELLO *et al.*, 2006). Bello e cols. acreditam que as infecções pelo subtipo F1 tiveram um crescimento exponencial nos primeiros 10 anos após a sua introdução tendendo a estabilização na sua expansão no final dos anos 80. Isto pode explicar o aparecimento precoce de recombinantes BF1 desde o início dos anos 90 e a frequência do

subtipo F1 constante em torno de 10% nos dois momentos do nosso estudo. Nossos achados concordam com estudo prévios baseados em apenas uma região gênica que apontam a frequência do subtipo F1 em torno de 10-15,4% (MORGADO *et al.*, 1998; TANURI *et al.*, 1999; BRINDEIRO *et al.*, 2003). Aqui, ressaltamos que em alguns trabalhos de epidemiologia molecular no Rio de Janeiro a frequência do subtipo F1 oscila entre 8-25%, visto que a maioria dos trabalhos utiliza amostras de conveniência desconsiderando as categorias de exposição ao risco e isso pode refletir na incongruência dos dados epidemiológicos, a exemplo de dois trabalhos conduzidos em nosso laboratório que tiveram suas casuísticas enriquecidas de amostras de usuário de drogas injetáveis que permitiu um aumento da frequência do subtipo F1, e em consequência dos recombinantes BF (GUIMARÃES *et al.*, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

O subtipo F1 foi encontrado em vários países do cone Sul tais como: Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia (CAMPODONICO *et al.*, 1996; MARQUINA *et al.*, 1996). No entanto, estudos envolvendo genomas completos ou quase completos verificaram que a grande maioria desses casos de subtipo F1 detectados no envelope é de recombinantes BF1 (BARRETO *et al.*, 2006). Os principais CRFs que circulam nesses países do cone Sul CRF12BF, CRF17_BF e CRF38_BF, e que a porção F1 desses mosaicos estão relacionados com o F1 encontrado no Brasil o que reforça a ideia de o subtipo F1 tenha sido introduzido no Brasil e se expandido para alguns países da América do Sul (AULICINO *et al.*, 2007).

A existência em alta prevalência de uma variante do subtipo B brasileira tipicamente brasileira, denominada variante B”, antigênicamente distinta das formas convencionais do subtipo B, por apresentarem o triptofano em substituição da prolina na posição 328 do envelope, no topo da alça v3 do HIV-1, foi documentada em 1993 por POTTS e colaboradores. No que tange a importância desta variante com relação a progressão da doença em indivíduos por esta infectados, recentemente foi descrito que o vírus com esta assinatura (GWG) preferencialmente utiliza o correceptor CCR5, de acordo com a análise preditiva do fenótipo baseada nas posições 11 e 25 de sequências do topo da alça v3, estabelecendo uma associação entre fase inicial da doença e a variante B”. Outros estudos apontam para uma progressão mais lenta para a Aids, maior número de linfócitos TCD4+ e menores níveis de carga viral plasmática neste grupo (SANTORO-LOPES *et al.*, 2000; CASSEB *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2006).

Devidos a estas importantes características apontadas e da alta prevalência desta assinatura em amostras do subtipo B, resolvemos caracterizar as amostras do subtipo B de acordo com as assinaturas moleculares presentes no topo do v3. O percentual das amostras

subtipadas como B'' (GWGR), no primeiro momento do nosso estudo, foi de aproximadamente 40% ao passo que apenas 41% das amostras B analisadas tiveram o motivo (GPGR) no topo da alça do v3 e apenas 19% apresentaram outras assinaturas no topo do v3. Estes resultados corroboram os dados da literatura onde o percentual do B'' se aproxima de 40% para amostras brasileiras estudadas no início dos anos 90 (MORGADO *et al.*, 1994). Assim, conseguimos confirmar uma alta circulação desta variante no início da epidemia no Brasil, o que não se aplica a outros países, visto que esta variante B'' não é freqüente. Corroborando a hipótese da origem monofilética reflexo do efeito do fundador (BELLO *et al.*, 2007).

Ao explorarmos as amostras da segunda casuística, identificamos um importante decréscimo no percentual desta variante B'' de 43 % para 23% na população estudada (heterossexuais e bissexuais). No entanto, o decréscimo na freqüência desta assinatura não pode ser justificada pelo estágio da doença desses pacientes, visto que, no primeiro momento do nosso estudo grande parte dos pacientes haviam evoluído a Aids e tinha uma alta freqüência dessa assinatura na população estudada, já no contexto da segunda casuística os pacientes não apresentavam nenhuma doença indicadora de Aids e apresentaram uma menor freqüência desta assinatura. Uma hipótese para redução dessa variante na população pode ser que esta esteja atrelada a um menor *fitness* viral.

Estudos prévios utilizando-se a região do envelope indicavam um agrupamento entre as amostras da variante B''. Afim de confirmar esses dados submetemos todas as amostras caracterizadas como subtipo B nos dois momentos do estudo a uma análise filogenética mais refinada, pelo método Bayesiano que apontou um perfil bastante similar na dispersão das assinaturas do subtipo B, onde quase todas as amostras da variante B'' se dispersaram em ramos superiores na árvore filogenética, no entanto detectamos a presença de outras amostras entre estas com distintas assinaturas (GXG). A fim de verificar se outras assinaturas moleculares além das do topo do v3 estariam contribuindo para o agrupamento da variante B'', foi excluída da análise o topo do v3, o que nos revelou um resultado bastante similar ao anteriormente encontrado (dados não mostrados), sugerindo que outras assinaturas além do v3 estariam influenciando neste agrupamento, assim como verificado por Diaz e cols. em 2008.. Alguns outros estudos já haviam demonstrado que o grupamento das mesmas fora da região do envelope era inexistente (Guimarães *et al.*, 2002). No entanto, quando subtipamos um subconjunto das amostras na região da polimerase viral verificamos que algumas amostras classificadas como B'' do período de 1990-92 ainda se mantinham. Entretanto, temos

consciência de que a utilização de uma árvore de *neighbor-joining* para investigarmos a diversidade entre amostras do mesmo subtipo não é o método mais robusto para esta análise.

5.2) Análise temporal dos subtipos nas distintas categorias de exposição ao risco

Nos primeiros anos da epidemia de Aids, a razão entre os gêneros masculinos e femininos alcançou a ordem de 28:1 (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2010), seguiu-se um progressivo declínio desta razão com uma crescente representatividade de casos femininos (FONSECA *et al.*, 2002) que reverbera numa mudança importante no cenário epidemiológico, evidenciando a heterossexualização da epidemia no Brasil. Para tal, exploramos amostras de indivíduos heterossexuais masculinos para entender como se deu a dinâmica dos subtipos, já que não existem trabalhos explorando esse grupo em dois momentos distintos da epidemia no Rio de Janeiro. Como a epidemia inicial era, principalmente, guiada pelos homossexuais masculinos e usuário de drogas, estudamos o grupo dos bissexuais, visto que esses tiveram um papel importante na mudança do perfil epidemiológico da Aids na cidade do Rio de Janeiro por se comportarem como veículos entre os dois grupos homossexuais e heterossexuais e entender a sua dinâmica temporal é fundamental. E por fim, um terceiro grupo foi abordado neste trabalho, os usuários de drogas que tiveram um participação expressiva, sobretudo, no início na epidemia de Aids, onde em 1991 cerca de 15% dos casos de HIV notificados eram em UDIs, o que contrasta com os 7,4% dos casos em 2008 (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO 2010). Essa redução do número de casos pode ser associada ao programa de redução de danos adotado pelo Ministério da Saúde em 1995 que empregava medidas preventivas, como por exemplo, a distribuição de agulhas e seringas, aconselhamento do uso de preservativo (TELLES, ALMEIDA & BASTOS, 1998; BASTOS *et al.*, 2005). Sendo assim, no presente estudo analisamos amostras de UDIs apenas na primeira coorte, visto que, dentre as amostras estudadas na segunda coorte, não haviam indivíduos declarados usuários de drogas. Tal fato se justifica por se tratarem de um grupo que possui um difícil acompanhamento, devido a barreiras político-sociais: marginalização social, risco de prisão, reclusão e barreiras financeiras (WOOD *et al.*, 2008). Porém a dinâmica temporal dos subtipos e recombinantes deste grupo pode ser explorada, visto que dois trabalhos realizados no nosso laboratório contemplam amostras de usuários de drogas injetáveis que datam de dois momentos distintos 1994-97 e 2000-2002.

Algumas questões sobre a relação entre os subtipos de HIV e as categorias de exposição ao risco foram lançadas no cenário da pesquisa em HIV/Aids, onde alguns estudos

tentaram relacionar subtipo e categoria de exposição ao risco (MASTRO *et al.*, 1997) e ainda transmissão privilegiada de um dado subtipo em algum tipo de transmissão. Os primeiros trabalhos acerca dessa temática deram uma atenção exclusiva ao subtipo B que é prevalente em países desenvolvidos como EUA e alguns países da Europa onde a maioria das infecções foi atrelada aos homossexuais masculinos e usuário de drogas injetáveis no contexto inicial da epidemia nesses países. Ao passo que nos países da África e Ásia a grande maioria das infecções é heterossexual, com prevalência dos subtipos não-B. Dado o exposto, estudos sugeriram a existência de diferenças funcionais entre os distintos subtipos de HIV. Soto-Ramirez e cols em 1996A e 1996B reportaram que os subtipos E e C prevalente em heterossexuais na Tailândia e Índia, respectivamente tinham uma maior eficiência em infectar células de Langerhans que isolados caracterizados B no envelope viral. Neste mesmo contexto, Luppi e cols. em 1997 identificam mulheres infectadas com o subtipo B através do contato heterossexual, no ano seguinte Casseb e cols. corroboraram os achados de Luppi.

Poucos foram os estudos no Brasil que apontaram a distribuição dos subtipos entre as distintas categorias de exposição ao risco. Com base no estudo conduzido por Morgado e cols em 1998, com amostras de indivíduos HIV positivos do período de 1993-1996, foi observada uma distribuição muito semelhante dos subtipos entre as principais categorias de exposição (Heterossexuais, homossexuais/bissexuais, e usuário de drogas) com prevalência do subtipo B e menor extensão do subtipo F1. Quando comparamos os nossos achados com os dados apontados nesse estudo, observamos uma similar dispersão dos subtipos nas distintas categorias, o que nos levou a inferir que se trata de uma epidemia madura, com elevados níveis de soroprevalência entre os diferentes subgrupos populacionais, dificultando o estabelecimento de uma correlação linear entre os subtipos de HIV aqui circulantes e os parâmetros epidemiológicos e sociodemográficos.

Poucos são os trabalhos que tentaram estabelecer uma relação entre os grupos de risco e as assinaturas moleculares do subtipo B. Morgado e cols. estudando uma coorte de homens soropositivos datadas de 1990-1996 identificaram uma similar proporção das assinaturas B e B'' independentemente das categorias de exposição desses indivíduos infectados (MORGADO *et al.*, 1998). Estudos na cidade de São Paulo também não mostraram nenhuma associação estatística entre a dispersão da variante B'' e os grupos de risco (CASSEB *et al.*, 1998; BRITO *et al.*, 2006). Diferentemente destes achados, os nossos resultados que exploraram amostras de 1990-92 apontam uma importante associação estatisticamente significativa entre a variante B'' com o grupo dos bissexuais e menor expansão desta assinatura nas demais categorias de exposição, sugerindo que esta variante B'' emergiu na

população de homens que fazem sexo com homens e que foi introduzida desde o início da epidemia de Aids no nosso estado, estando dispersa em todas as categorias de exposição ao risco estudadas, ainda que numa frequência menor. Nós atribuímos a diferença dos nossos achados com os estudos prévios, ao fato das nossas amostras terem sido coletadas em 1990-92, refletindo uma casuística bastante precoce da epidemia, visto que grande parte desses indivíduos haviam evoluído para Aids. No trabalho de Morgado e cols. foi analisado um pequeno número de amostras de 1990, tendo na sua grande maioria amostras da segunda metade dos anos 90, sendo assim esses dados podem ter subestimado a verdadeira frequência da variante B” no grupo de homens que fazem sexo com homens no início dos anos 90. Quando nos reportamos aos estudos realizados em São Paulo, que é uma cidade importante no que tange ao número de casos notificados e apresenta um perfil epidemiológico distinto do Rio de Janeiro, onde os usuários de drogas apresentam um papel importante neste contexto, também não encontramos concordância com os nossos achados. Ressaltamos que as técnicas utilizadas nos trabalhos de Casseb e cols. e Brito e cols. empregaram ensaios sorológicos diferindo do no presente estudo em que ensaios moleculares foram utilizados.

Os estudos focando nesta região genômica tornaram-se mais escassos e estão voltados principalmente para a predição dos correceptores celulares que o vírus utiliza para penetrar na célula hospedeira que identificam as assinaturas no topo do v3. Quando comparamos os nossos dados da segunda casuística com a primeira ou estudos anteriores, verificamos uma na redução das assinaturas da variante B” se compararmos com a frequência descrita, em torno de 40%, na população infectada pelo subtipo B no início dos anos 90 no Brasil. Não encontramos nenhum trabalho na literatura, envolvendo a evolução das assinaturas moleculares do subtipo B entre as categorias de exposição ao risco, fato este que torna o nosso trabalho inédito neste contexto. Nossos dados não mostraram uma mudança no perfil das assinaturas do subtipo B ao longo do tempo entre os grupos de HET e UDI, não obstante uma mudança significativa na frequência das assinaturas da variante B” foi observada no grupo dos BIS, o que nos levou a investigar se o triptofano na segunda posição do tripeptídeo estaria sendo substituída ao longo do tempo por outros aminoácidos menos frequente como (F, L, G), gerando a assinatura GXG, onde alguns estudos acreditam ter uma relação mais estreita com a variante B” (BELLO *et al.*, 2007) ou se a frequência da assinatura B” estaria sendo substituída pelo B pandêmico. O aumento expressivo da assinatura GPG entre os bissexuais no segundo momento do estudo nos leva a hipótese de que a assinatura do B pandêmico (GPG), provavelmente, confere ao vírus um grau adaptativo melhor que as outras assinaturas.

Os resultados relativos a categoria de UDIs no presente estudo corroboram os dados de estudos realizados por GUIMARÃES e colaboradores em 2001 e TEIXEIRA e colaboradores em 2004 que observaram uma maior frequência do subtipo B (75%-80%) em UDIs, porém ambos os trabalhos observam uma frequência aumentada do subtipo F1 (25%-23%) em relação à população geral. O estudo conduzido em São Paulo realizado por ROSSINI e colaboradores em 2001 observou um aumento do subtipo F1 em UDIs com suporte estatístico corroborando os estudos envolvendo a população de usuários de drogas na cidade do Rio de Janeiro. Por conseguinte, os UDIs possuem papel importante na manutenção do subtipo F1 e das formas recombinantes B/F1 na população brasileira como anteriormente sugerido (GUIMARÃES *et al.*, 2001; ROSSINI *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2004).

5.3) Estudo filogenético das formas recombinantes

O segundo alvo do estudo foi a protease/transcriptase reversa da região *pol* que com a introdução da técnica de genotipagem para fins de acompanhamento, decisões terapêuticas tem gerado um crescente número de sequências nos bancos de dados, outro importante motivo para a inclusão da análise desta região, é que a mesma é tida como altamente recombinogênica, onde estudos mais recentes correlacionam homologia das sequências de uma dada região genômica aos eventos de recombinação, ou seja, quanto mais conservada a região gênica, maior será o número de eventos dessa recombinação nela detectada. (IGLESIAS-SANCHEZ, LOPEZ-GALINDEZ, 2002; MARGIOKINIS *et al.*, 2003).

A notória diversidade dos recombinantes BF1 já identificadas em outros estudos empregando amostras brasileiras (SABINO *et al.*, 1994; THOMSON *et al.*, 2004; BRÍGIDO *et al.*, 2005, SANABANI *et al.*, 2006; SA FILHO *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2008; SANABANI *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010) foi evidenciada em nossas análises. Estes eventos de recombinação BF1 foram observados também em países do cone sul tais como: Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia (CARR *et al.*, 2001; GOMES CAMILO *et al.*, 2002; QUARLERI *et al.*, 2004; GOMES CAMILO *et al.*, 2006; RUCHANSKY *et al.*, 2009), onde os CRF_12, 17BF1 tem um impacto epidemiológico conhecido e sua frequência em países como Argentina e Uruguai é superior a 40%. A extrema diversidade de formas recombinantes encontradas é reflexo da alta frequência de infecções simultâneas ou subseqüentes por distintos subtipos co-circulando em uma mesma área geográfica, quando se trata dos recombinantes BF1, salientamos a co-circulação dos subtipos B, F1 e das formas mosaicos BF. Os efeitos da recombinação além ampliar a diversidade genética pode equilibrar

os efeitos prejudiciais das altas taxas de replicação podendo recriar genomas que apresentam mutações deletérias (CHAO *et al.*, 1990), além de contribuir para a seleção de variantes com melhor *fitness* viral (BURK *et al.*, 1997).

Muitos estudos apontam uma frequência desigual dos recombinantes BF em muitas partes do território nacional: 4% no Rio de Janeiro (SÁ FERREIRA *et al.*, 2007); 7.3-8.4% em São Paulo (SA FILHO *et al.*, 2005; BARRETO *et al.*, 2006); 3.1% no Distrito Federal (VERAS *et al.*, 2007), 28.9% em Santos (SA FILHO *et al.*, 2008). No cenário do Rio de Janeiro a baixa prevalência de URFs e CRFs pode estar diretamente ligada a baixa frequência do subtipo F1 circulante, conduzindo para uma menor probabilidade de eventos de recombinação inter-subtipos. Em contraste com a epidemiologia molecular de outros países do cone Sul, como por exemplo, a Argentina onde 56.9% dos diagnósticos recentes (2003-2005) foram recombinantes BF1 (22.7% URF_BF1, 15.55% CRF_12BF1 e 15.55% CRF_12BF1 relacionados) (DILERNIA *et al.*, 2007). Na Argentina o subtipo F1 puro é raro, estando mais presente na sua forma recombinante BF1. Assim, sugere-se que a alta prevalência dos recombinantes BF1 nesta região geográfica pode ser resultado de eventos fundadores (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

No Brasil, a emergência de formas recombinantes CRF28, 29, 39, 40, 46BF1 (SA FILHO *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2008; SANABANI *et al.*, 2010) indicam a necessidade de se monitorar a epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil. Neste contexto, avaliamos as nossas amostras frente aos CRFs descritos na América Latina somente uma amostra apresentou um agrupamento consistente com o - CRF40_BF descrito pelo nosso grupo, sugerindo que este mosaico já circulava desde o início da epidemia de Aids no Rio de Janeiro. A não relação entre os recombinantes identificados no nosso estudo corroboram o mais recente trabalho envolvendo diversas amostras recombinantes BF1 do Rio de Janeiro revelando uma não associação entre os mosaicos BF1 (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

5.4) Estudo das redes de transmissão do subtipo B entre os grupos de risco

Poucos são os trabalhos que versam sobre as redes de transmissão do HIV entre as categorias de exposição ao risco no Brasil. O trabalho de Eyer e cols. reportando amostras de heterossexuais caracterizadas como subtipo B em três municípios do interior do estado do Rio de Janeiro demonstrou uma independência entre as redes de transmissão destes, sugerindo que cada uma das cidades do interior teve uma introdução independente e posterior disseminação das variantes do subtipo B, sugerindo que estas se tratam de múltiplas micro-epidemias. Da

análise realizada com as amostras do período de 1990, verificamos um intercâmbio destas entres os diferentes grupos de risco na filogenia, salientando a existência de microredes de transmissão compostos por apenas duas ou três sequências, no entanto a presença de um grupo de treze amostras contemplando 17% do número total de indivíduos declarados bissexuais na casuística de 1990-92 foi observada, sugerindo que uma proporção significativa dos bissexuais fez parte de uma única rede de transmissão. Contudo, a partir do emprego de testes estatísticos sobre a filogenia confirmamos a tendência a uma distribuição não aleatória destas segundo a categoria de exposição ao risco.

Em conclusão, nosso estudo permite traçar a tendência temporal da epidemia de Aids no Rio de Janeiro [1990-92 e 2006-2010], mostrando a co-circulação dos subtipos B, F1 e dos recombinantes BF1 e dispersão destes de acordo com a categoria de exposição ao risco

VI. Conclusão

- Este estudo nos permitiu confirmar a cocirculação dos subtipos B e suas distintas assinaturas moleculares no topo da alça v3, F1 e recombinantes BF1 de HIV-1 como descrito em estudos anteriores no Rio de Janeiro;
- Uma associação importante entre a variante B'' e o grupo de bissexuais, sugerindo que esta variante tenha sido introduzida na população dos bissexuais desde o princípio da epidemia de Aids no nosso estado e um decréscimo desta variante ao longo do tempo;
- Verificamos um agrupamento importante de sequências de Bissexuais no período de 1990-92 sugerindo a presença de rede de transmissão no contexto inicial da epidemia de Aids no Rio de Janeiro;
- Um agrupamento não aleatório das amostras identificadas como B'', sugerindo que esta variantes apresentam outras assinaturas em comum além do topo do V3;
- Nos dois momentos do estudo não identificamos diferenças significativas na frequência de recombinação;
- A maioria das amostras recombinantes na região da polimerase foram identificadas como URFs, apenas uma amostra caracterizada CRF40_BF1.

VII) Referências Bibliográficas

AIDS EPIDEMIC UPDATE. UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World Health Organization. [on line]. 2006. [capturado em 01 de novembro de 2006]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.

AIDS EPIDEMIC UPDATE. UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World Health Organization. [on line]. 2007. [capturado em 10 de dezembro de 2010]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.

AIDS EPIDEMIC UPDATE. UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World Health Organization. [on line]. 2010. [capturado em 10 de dezembro de 2010]. Disponível em: <http://www.unaids.org>.

Andreasson PA, Dias F, Naucler A, Andersson S, Biberfeld G. A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau. **AIDS**. 1993 Jul;7(7):989-93.

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

Argyris EG, Pomerantz RJ. HIV-1 Vif versus APOBEC3G: newly appreciated warriors in the ancient battle between virus and host. **Trends Microbiol**. 2004 Apr;12(4):145-8.

Aulicino PC, Holmes EC, Rocco C, Mangano A, Sen L. Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. **J Virol**. 2007 Jan;81(1):427-9.

Barber AM, Hizi A, Maizel JV Jr, Hughes SH. HIV-1 reverse transcriptase: structure predictions for the polymerase domain. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 1990 Sep;6(9):1061-72.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**. 1983 May 20;220(4599):868-71.

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

Bastos FI. The prevention and care of HIV-infected drug users in contemporary Brazil. **Subst Use Misuse**. 2006;41(6-7):833-4.

Bello G, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Teixeira SL, Morgado MG. Increasing genetic distance to HIV-1 subtype B and F1 consensus sequences in the Brazilian epidemic: a challenge for vaccine strategies based on central immunogens? **Infect Genet Evol**. 2007 Sep;7(5):594-9.

- Bello G, Guimarães ML, Morgado MG. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. **AIDS**. 2006 Mar 21;20(5):763-8.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO-AIDS DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO. Ministério da saúde. [on line]. Brasil; 2008. [capturado em 13 de janeiro de 2011].
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Ministério da saúde. [on line]. Brasil; 2007. [capturado em 13 de março de 2008]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.
- Bongertz V, Bou-Habib DC, Brígido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez JC, Ferreira PC, Galvão-Castro B, Greco D, Guimarães ML, Linhares de Carvalho MI, Morgado MG, Oliveira CA, Osmanov S, Ramos CA, Rossini M, Sabino E, Tanuri A, Ueda M. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2000 Feb 1;23(2):184-93.
- Bour S, Strebel K. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. **Microbes Infect**. 2003 Sep;5(11):1029-39.
- Brígido LF, Nunes CC, Oliveira CM, Knoll RK, Ferreira JL, Freitas CA, Alves MA, Dias C, Rodrigues R. HIV type 1 subtype C and CR1 recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2007 Dec;23(12):1579-86
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brígido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A; Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**. 2003;17:1063-1069.
- Burke DS. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. **Emerg Infect Dis**. 1997 Jul-Sep;3(3):253-9.
- Buttò S, Argentini C, Mazzella AM, Iannotti MP, Leone P, Leone P, Nicolosi A, Rezza G. Dual infection with different strains of the same HIV-1 subtype. **AIDS**. 1997 Apr;11(5):694-6.
- Campodonico M, Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Leonaers A, Fay FF, Taborda M, Van der Groen G, Fay OH. HIV type 1 subtypes in Argentina and genetic heterogeneity of the V3 region. **AIDS Res. Hum. Retrovirus**. 1996 Jan 1;12(1):79-81.
- Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, Bourgarel-Rey V, Peyrot V, Esquieu D, Barbier P, de Mareuil J, Braguer D, Kaleebu P, Yirell DL, Loret EP. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. **J Biol Chem**. 2004 Nov 12;279
- 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.

Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. **AIDS**. 2001 Oct 19;15(15):F41-7.

Casseb J, Komninakis S, Abdalla L, Brigido LF, Rodrigues R, Araújo F, Veiga AP, de Almeida A, Flannery B, Hendry RM, Duarte AJ. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? **Int J Infect Dis**. 2002;6:164-9.

Casseb J, Montanheiro P, Komninakis S, Brito A, Duarte AJ. Human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B variant showed an increasing avidity of the anti-V3 antibodies over time compared to the subtype B US/European strain in São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2004 Feb;99(1):69-71.

Chao L. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. **Nature**. 1990 Nov 29;348(6300):454-5.

Chequer-Fernandez, Saada Lima. Polimorfismo do HIV-1: Implicações na resistência à terapia antiretroviral em pacientes infectados por diferentes subtipos virais prevalentes na cidade do Rio de Janeiro. **Tese de mestrado em Biologia Celular e Molecular**, IOC-Fiocruz 2004

Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. **Cell**. 1996 Jun 28;85(7):1135-48.

Clapham PR, Weiss RA. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**. 1997 Jul 17;388(6639):230-1.

Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. **Nature**. 1986 Dec 18-31;324(6098):691-5.

Coakley E, Petropoulos CJ, Whitcomb JM. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. **Curr. Opin. Infect Dis**. 2005 Feb;18(1):9-15.

Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al. Human immunodeficiency viruses. **Science**. 1986 May 9;232(4751):697.

Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al. What to call the AIDS virus? **Nature**. 1986 May 1-7;321(6065):10.

Coffin JM, Varmus HE, Bishop JM, Essex M, Hardy WD Jr, Martin GS, Rosenberg NE, Scolnick EM, Weinberg RA, Vogt PK. Proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes. **J Virol**. 1981 Dec; 40(3):953-7.

Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of HIV-1 vpr product and function. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 1990;3(1):11-8.

Couto-Fernandez JC, Morgado MG, dos Santos JI, Galvão-Castro B. Molecular and biological diversity of HIV-1 in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1992 Apr-Jun;87(2):249-55.

Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, Galvão-Castro B. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 1999 Nov 1;22(3):288-93.

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. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2005 Feb;100(1):73-8. Epub 2005 Apr 12.

de Brito A, Komninakis SC, Novoa P, de Oliveira RM, Fonseca LA, Duarte AJ, Casseb J. Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). **Clin Infect Dis.** 2006 Dec 1;43(11):1476-81.

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

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

Diaz RS, Sabino EC, Mayer A, Mosley JW, Busch MP. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. The Transfusion Safety Study Group. **J Virol.** 1995 Jun;69(6):3273-81.

Diaz RS, Leal E, Sanabani S, Sucupira MC, Tanuri A, Sabino EC, Janini LM. Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. **Virology.** 2008;381:184-93.

Dilernia DA, Gomez AM, Lourtau L, Marone R, Losso MH, Salomón H, Gómez-Carrillo M. HIV type 1 genetic diversity surveillance among newly diagnosed individuals from 2003 to 2005 in Buenos Aires, Argentina. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2007 Oct;23(10):1201-7.

Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1993 May 1;90(9):4171-5.

Dumitrescu O, Kalish ML, Kliks SC, Bandea CI, Levy JA. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates from children in Romania: identification of a new envelope subtype. **J. Infect. Dis.** 1994 Feb;169(2):281-8.

Eyer-Silva WA, Freire MA, Gayão ML, Basílio-de-Oliveira CA, Morgado MG. Epidemiologic features of HIV infection in three municipalities of inner Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2007 Sep-Oct;49(5):303-7.

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

Galvão-Castro B, Ivo-Dos-Santos J, Couto-Fernandez JC, Bongertz V, Chequer-Bou-Habib D, Sion FS, Barth OM, Pereira H, Pereira MS. Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987 Oct-Dec;82(4):453-6.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):436-41.

Gold KD, Thomas L, Garrett TJ. Aggressive Kaposi's sarcoma in a heterosexual drug addict. *N Engl J Med*. 1982 Aug 19;307(8):498.

Gomez C, Hope TJ. The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol*. 2005 May;7(5):621-6.

Gómez CE, Iglesias E, Perdomo W, Rolo F, Blanco M, Lobaina L, Martín A, Duarte CA. Isolates from four different HIV type 1 clades circulating in Cuba identified by DNA sequence of the C2-V3 region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Jan 1;17(1):55-8.

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

Goto T, Nakai M, Ikuta K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron*. 1998 Apr-Jun;29(2-3):123-38.

Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981 Dec 10;305(24):1425-31.

Guimarães ML, Bastos FI, Telles PR, Galvão-Castro B, Diaz RS, Bongertz V, Morgado MG. Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J Clin Virol*. 2001 May;21(2):143-51.

Guimarães ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvão-Castro B, Morgado MG; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002 Nov 20;18(17):1261-9.

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

Guimarães ML, Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva Wde A, Teixeira SL, Chequer-Fernandez SL, Morgado MG. Analysis of HIV-1 BF pr/rt recombinant strains from Rio de Janeiro/Brazil reveals multiple unrelated mosaic structures. *Infect Genet Evol*. 2010 Oct;10(7):1094-100.

- Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. **J Virol.** 1994 Mar;68(3):1581-5.
- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science.** 2000 Jan 28;287(5453):607-14.
- He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. **J Virol.** 1995 Nov;69(11):6705-11.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS.** 2006 Oct 24;20(16):W13-23.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **AIDS.** 2011 Feb 10.
- Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1994 Jul 19;91(15):7311-5.
- Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, Carrillo MG, Russi JC, Vinales J, Alava A, Acosta ME, Gianella A, Andrade R, Sanchez JL, Carrion G, Sanchez JL, Russell K, Robb M, Bix D, McCutchan F, Carr JK. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2002 Dec 10;18(18):1339-50
- Hottiger M, Podust VN, Thimmig RL, McHenry C, Hübscher U. Strand displacement activity of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer and its individual subunits. **J Biol Chem.** 1994 Jan 14;269(2):986-91.
- Hottiger M, Hübscher U. Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. **Biol Chem Hoppe Seyler.** 1996 Feb;377(2):97-120.
- Howell RM, Fitzgibbon JE, Noe M, Ren ZJ, Gocke DJ, Schwartz TA, Dubin DT. In vivo sequence variation of the human immunodeficiency virus type 1 env gene: evidence for recombination among variants found in a single individual. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 1991 Nov;7(11):869-76.
- Hu WS, Temin HM. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1990 Feb;87(4):1556-60.
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. **Science.** 1991 Jul 5;253(5015):71-4.

- Iglesias-Sánchez MJ, López-Galíndez C. Analysis, quantification, and evolutionary consequences of HIV-1 in vitro recombination. **Virology**. 2002 Dec 20;304(2):392-402.
- Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. **Nature**. 1988 Jan 21;331(6153):280-3.
- Kanki PJ, Travers KU, MBoup S, Hsieh CC, Marlink RG, Gueye-NDiaye A, Siby T, Thior I, Hernandez-Avila M, Sankalé JL, et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. **Lancet**. 1994 Apr 16;343(8903):943-6.
- Katz RA, Skalka AM. Generation of diversity in retroviruses. **Annu Rev Genet**. 1990;24:409-45.
- Kim JB, Sharp PA. Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. **J Biol Chem**. 2001 Apr 13;276(15)
- Korber BT, Learn G, Mullins JI, Hahn BH, Wolinsky S. Protecting HIV databases. **Nature**. 1995 Nov 16;378(6554):242-4.
- LaRosa GJ, Davide JP, Weinhold K, Waterbury JA, Profy AT, Lewis JA, Langlois AJ, Dreesman GR, Boswell RN, Shadduck P. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. **Science** 1990;249:932-935.
- Leal E, Silva WP, Sucupira MC, Janini LM, Diaz RS. Molecular and structural characterization of HIV-1 subtype B Brazilian isolates with GWGR tetramer at the tip of the V3-loop. **Virology**. 2008 Nov 25;381(2):222-9. Epub 2008 Sep 23.
- Leavitt SA, SchOn A, Klein JC, Manjappara U, Chaiken IM, Freire E. Interactions of HIV-1 proteins gp120 and Nef with cellular partners define a novel allosteric paradigm. **Curr Protein Pept Sci**. 2004 Feb;5(1):1-8.
- Li Y, Tee KK, Liao H, Hase S, Uenishi R, Li XJ, Tsuchiura T, Yang R, Govindasamy S, Yong YK, Tan HY, Pybus OG, Kamarulzaman A, Takebe Y. Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33_01B. **J Acquir Immune Defic Syndr**. 2010 Jun;54(2):129-36.
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **J Virol**. 1999 Jan;73(1):152-60.
- Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses** 1994;10:561-567.
- Luciw PA. Human Immunodeficiency virus and their replication. **Fields virology**, 1996 third edition.

- Magiorkinis G, Paraskevis D, Vandamme AM, Magiorkinis E, Sypsa V, Hatzakis A. In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: determination of hot spots and correlation with sequence similarity. **J Gen Virol.** 2003 Oct;84(Pt 10):2715-22.
- Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reversetranscriptase. **J Virol.** 1995 Aug;69(8):5087-94.
- Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science.** 1994 Sep 9;265(5178):1587-90.
- Marquina S, Leitner T, Rabinovich RD, Benetucci J, Libonatti O, Albert J. Coexistence of subtypes B, F, and as B/F env recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires Argentina. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 1996 Nov 20;12(17):1651-4.
- Mastro TD, de Vincenzi I. Probabilities of sexual HIV-1 transmission. **AIDS.** 1996;10 Suppl A:S75-82.
- Mboudjeka I, Bikandou B, Zekeng L, Takehisa J, Harada Y, Yamaguchi-Kabata Y, Taniguchi Y, Ido E, Kaptue L, M'pelle P, Parra HJ, Ikeda M, Hayami M, Miura T. Genetic diversity of HIV-1 group M from Cameroon and Republic of Congo. **Arch Virol.** 1999;144(12):2291-311
- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JI, Hendry RM, et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 1994 May;10(5):569-76.
- Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I Jr, Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvão-Castro B, Bongertz V. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** 1998 Aug 15;18(5):488-94.
- Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002 Mar;97(2):143-50.
- Morris A, Marsden M, Halcrow K, Hughes ES, Brettle RP, Bell JE, Simmonds P. Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations. **J Virol.** 1999 Oct;73(10):8720-31.
- Moya A, Holmes EC, González-Candelas F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. **Nat Rev Microbiol.** 2004 Apr;2(4):279-88. Review.

- Myers mG, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, Pavlakis GN. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1993 **Human Retrovirus and AIDS** 1993.
- Navarro F, Landau NR. Recent insights into HIV-1 Vif. **Curr Opin Immunol.** 2004 Aug;16(4):477-82.
- Niyasom C, Horthongkham N, Sreephiang A, Kantakamalakul W, LouisirootchanaikulS, Chuenchitra T, Sutthent R. HIV-1 subtype B Tat gene activities and disease progression in HIV-1 CRF01_AE infection. Southeast Asian. **J Trop Med Public Health.** 2009 Jul;40(4):748-58.
- Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardländer B, Esparza J; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. **J. Acquir Immune Defic Syndr.** 2002 Feb 1;29(2):184-90.
- Palker TJ, Clark ME, Langlois AJ, Matthews TJ, Weinhold KJ, Randall RR, Bolognesi DP, Haynes BF, Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA** 1988;85(6):1932-6.
- Palker TJ, Matthews TJ, Langlois A, Tanner ME, Martin ME, Scarce RM, Kim JE, Berzofsky JA, Bolognesi DP, Haynes BF, Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. **Journal of immunology** 1989;142(10):3612-9.
- Papathanasopoulos MA, Hunt GM, Tiemessen CT. Evolution and diversity of HIV-1 in Africa--a review. **Virus Genes.** 2003;26(2):151-63.
- Paraskevis D, Magiorkinis E, Theodoridou M, Mostrou G, Papaevangelou V, Kiosses VG, Hatzakis A, Matsaniotis N. Molecular epidemiology of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Greece: evidence of non-B subtypes. **J Hum Virol.** 1999 Nov-Dec;2(6):339-43.
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL, Simon F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med.** 2009 Aug;15(8):871-2. Epub 2009 Aug 2.
- Pomerantz, R. J. And D. L. Horn. Twenty years of therapy for Hiv-1 Infection. **Nat Med.** 2003;9(7): 867-73.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science.** 1984 May 4;224(4648):497-500.
- Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves CB, Badaro R, Suleiman J, Ferreira O. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. **AIDS.** 1993 Sep;7(9):1191-7.

Quarleri JF, Rubio A, Carobene M, Turk G, Vignoles M, Harrigan RP, Montaner JS, Salomón H, Gómez-Carrillo M. HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2004 Oct;20(10):1100-7.

Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science**. 1988 Nov 25;242(4882):1171-3.

Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. **Nature**. 1995 Mar 9;374(6518):124-6.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**. 2000 Apr 7;288(5463):55-6.

Rose KM, Marin M, Kozak SL, Kabat D. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. **Trends Mol Med**. 2004 Jun;10(6):291-7.

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

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

Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V, Cavalcante S, Galvão-Castro B, Mullins JI, Mayer A. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J Virol**. 1994 Oct;68(10):6340-6.

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

Sa Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, Janini LM. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in São Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum.Retrovirus** 2005;21:145-151.

Salemi M, de Oliveira T, Soares MA, Pybus O, Dumans AT, Vandamme AM, Tanuri A, Cassol S, Fitch WM. Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. **J Mol Evol**. 2005 May;60(5):598-605.

Salminen MO, Carr JK, Robertson DL, Hegerich P, Gotte D, Koch C, Sanders-Buell E, Gao F, Sharp PM, Hahn BH, Burke DS, McCutchan FE. Evolution and probable transmission of intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in a Zambian couple. **J Virol**. 1997 Apr;71(4):2647-55.

Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. **Infect Genet Evol.** 2006 Sep;6(5):368-77.

Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. **J Virol.** 2010 Apr 16;7:74.

Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, Silveira J, Sabino EC, Tanuri A, Soares MA. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS.** 2006 Oct 24;20(16):2011-9.

Santoro-Lopes G, Harrison LH, Tavares MD, Xexéo A, Dos Santos AC, Schechter M. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: is B different from B-Br? **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2000 Jul 1;16(10):953-8.

Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. **Nat Med.** 1996 Mar;2(3):338-42.

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

Shehu-Xhilaga M, Hill M, Marshall JA, Kappes J, Crowe SM, Mak J. The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. **J Virol.** 2002 May;76(9):4331-40.

Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. **Nature.** 1991 Jan 10;349(6305):167-9

Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR, et al. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. **N Engl J Med.** 1981 Dec 10;305(24):1439-44.

Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F, Brun-Vézinet F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nat Med.** 1998 Sep;4(9):1032-7.

Spina CA, Kwok TJ, Chowder MY, Guatelli JC, Richman DD. The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. **J Exp Med.** 1994 Jan 1;179(1):115-23

Soares EA, Martínez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **AIDS**. 2005 Oct;19 Suppl 4:S81-6.

Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, Wasi C, Vithayasai P, Vithayasai V, Apichartpiyakul C, Auewarakul P, Peña Cruz V, Chui DS, Osathanondh R, Mayer K, Lee TH, Essex M. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. **Science**. 1996 Mar 1;271(5253):1291-3.

Subbarao S & Schochetman G. Genetic variability of HIV-1. **AIDS**,10(supl A): S13-23.

Swingler S, Brichacek B, Jacque JM, Ulich C, Zhou J, Stevenson M. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. **Nature**. 2003 Jul 10;424(6945):213-9.

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

Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, Miura T, Kaptu L, Hayami M. Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. **J Virol**. 1999 Aug;73(8):6810-20.

Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**.1999 Jan 1;20(1):60-6.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**. 2007 Aug;24(8):1596-9. Epub 2007 May 7

Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*. 2008 Apr 10;358(15):1590-602. Review. Erratum in: **N Engl J Med**. 2008 Oct 30;359(18):1965-6. *N Engl J Med*. 2008 Oct 30;359(18):1972.

Telles PR, Bastos FI, Guydish J, Inciardi JA, Surratt HL, Pearl M, Hearst N. Risk behavior and HIV seroprevalence among injecting drug users in Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS**. 1997 Sep;11 Suppl 1:S35-42.

Teixeira SL, Bastos FI, Telles PR, Hacker MA, Brigido LF, de F Oliveira CA, Bongertz V, Morgado MG. HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity. **J Clin Virol**. 2004 Nov;31(3):221-6.

Thomson MM, Sierra M, Tanuri A, May S, Casado G, Manjón N, Nájera R. 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**. 2004 Oct;20(10):1126-33.

Traore L, Marlink R & Thior I. (1996). Hiv-2 as a model for long-term nonprogression. In : XI International conference on AIDS. Vancouver, BC : Veazey, R.S. ; Mansfield, K.G. ;

- THAM, I.C. ; Carville, a.c. ; Shvetz, D.E. ; Forand, A.E, & Lackner, a.a. 2000. Dynamics of CCR5 expression by CD4+ t cells in lymphoid tissue during simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology*. 74 : 11001-11007.
- Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2000 Jan 20;16(2):139-51.
- Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**. 1999 Jan 8;285(1):1-32.
- Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature**. 2006 Nov 9;444(7116):164.
- Vartanian JP, Meyerhans A, Sala M, Wain-Hobson S. G-->A hypermutation of the human immunodeficiency virus type 1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1994 Apr 12;91(8):3092-6.
- Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Lepira F, Delaporte E, Peeters M. Identification and molecular characterization of subtype A4 in central Africa. **AIDS Res. Hum. Retrovirus**. 2006 Feb;22(2):182-7.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Nature**. 1995 Jan 12;373(6510):117-22.
- Wood E, Kerr T, Tyndall MW, Montaner JS. A review of barriers and facilitators of HIV treatment among injection drug users. **AIDS**. 2008 Jul 11;22(11):1247-56. Review.
- Wooley DP, Bircher LA, Smith RA. Retroviral recombination is nonrandom and sequence dependent. **Virology**. 1998 Mar 30;243(1):229-34.
- Wu Y, Marsh JW. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. **Science**. 2001 Aug 24;293(5534):1503-6
- Yu H, Jetzt AE, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. The nature of human immunodeficiency virus type 1 strand transfers. **J Biol Chem**. 1998 Oct 23;273(43):28384-91.
- Yuan X, Matsuda Z, Matsuda M, Essex M, Lee TH. Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 1990 Nov;6(11).