

Cristiano Teodoro da Silva

**Estudo *in vitro* da Relação entre a Ativação Celular e a
Variação Genética do HIV-1**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

**São Paulo
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cristiano Teodoro da Silva

**Estudo *in vitro* da Relação entre a Ativação Celular e a
Variação Genética do HIV-1**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Mário Janini

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

**São Paulo
2005**

Silva, Cristiano Teodoro

Estudo *in vitro* da Relação entre a Ativação Celular e a Variação Genética do HIV-1. /São Paulo, 2005.

Tese de Mestrado: Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo – EPM/UNIFESP.

Título em inglês: *In vitro* evaluation of the correlation between cellular activation and HIV-1 genetic variability.

1.HIV-1; 2.Ativação Celular; 3.Variação Genética;
4.Hipermutação.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina
Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias**

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Mário Janini

Chefe do Laboratório de Segurança Nível III (PIII) “Prof. Dr. Arary Cruz Tiriba”.

Prof. Adjunto Visitante da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias – EPM/UNIFESP.

Co-orientador:

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Chefe do Laboratório de Retrovirologia.

Professor livre docente da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias – EPM/UNIFESP.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Segurança Nível III (PIII) “Prof. Dr. Arary Cruz Tiriba” e Laboratório de Retrovirologia, ambos da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias – UNIFESP/EPM.

Este projeto contou com o apoio financeiro da FAPESP – Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo, com a concessão para o aluno de Bolsa – MS, processo nº 02/11425-8 e auxílio pesquisa processo nº 03/05183-4.

**São Paulo
2005**

*“Apenas compete aos soberanos, ou aos que por eles são autorizados”,
regular os costumes alheios “.*

René Descartes

*”...os costumes, cuja excelência torna o governo quase inútil
e cuja corrupção o torna quase impossível”.*

Aléxis De Tocqueville

Dedico esta tese àqueles que deixaram saudades,

*Meu pai Jair, que me ensinou o sentido de caráter, me preparou
para enfrentar todos os desafios e lutar por meus objetivos;
Meu irmão Luciano, que partiu cedo e deixou a pureza
de seu olhar em nossos corações.*

Dedico àqueles que estão presentes,

*Minha mãe Maria, a luz da minha vida, meu porto seguro;
Meu irmão Fabiano, que muito me orgulha.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Mário Janini, meu orientador, que esteve presente em todos os momentos deste trabalho, guiando meu caminho e orientando o amadurecimento de meu pensamento científico.

Ao Dr. Ricardo Sobhie Diaz, meu co-orientador, por ter concedido a oportunidade para que eu desenvolvesse este trabalho em seu laboratório, pelo exemplo como profissional e mestre, pelo incentivo e por ter acreditado em mim.

Ao Dr. Arnaldo Colombo, pela compreensão quanto aos prazos para conclusão deste trabalho.

As amigas do laboratório de retrovirologia Sandra e Patrícia, cuja ajuda em momentos críticos, foi fundamental para que eu pudesse concluir este trabalho.

A minha namorada, Lenise, pelo apoio nos momentos difíceis durante a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de retrovirologia: Dercy, Cecília, Beth, Carlão, Charlys, Giana, Carol, Dani, Gildo, Adriana, Graziela, Fábio, Hélcio, Carla, as Michelle's, Shirley, Wagner, que fizeram parte do meu dia a dia e compartilharam preocupações e alegrias.

Aos amigos do GIV-Grupo de Incentivo à Vida, pelo respeito, amizade e por me ensinar entre outras coisas que o indivíduo esta além das diferenças.

Aos amigos: Rafael, Douglas, Márcio, Rogério e Marcelo; As amigas: Caju, Claudia, Leila, Priscila, Renata, Simone e Danielle, que constroem a minha história ao longo dos anos.

A Deus, por dar saúde e determinação para que eu possa seguir em frente.

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
FIGURAS, TABELAS E QUADROS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 – INTRODUÇÃO	2
1.A – Histórico.	2
1.B – Epidemiologia.	4
1.C – Organização Genômica do HIV-1.	7
1.D – Mecanismo de Invasão Celular do HIV-1.	12
1.E – Diversidade Genética Global do HIV-1.	15
1.F – Ativação Celular e Ciclo Celular.	17
2 – OBJETIVOS	19
3 – MATERIAL E MÉTODOS	20
3.A – Metodologias Pré-projeto:	
1. Obtenção de isolados virais.	20
2. Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico.	20
3. Cultura de Células Mononucleares de Sangue Periférico.	20
4. Expansão e estoque viral.	21
5. Quantificação da produção viral em cultura celular.	21
6. Cálculo do CCID50 dos isolados virais	22
3.B – Metodologias Utilizadas Paralelamente ao Projeto:	
01. Marcação das PBMCs com anticorpo monoclonal (CD4) para estudo do ciclo celular.	22
02. Preparação das PBMCs para estudo do ciclo celular.	23
03. Estudo do ciclo celular por citometria de fluxo.	23

04. Estudo da ativação celular por citometria de fluxo.	23
3.C – Metodologias Aplicadas ao Projeto – Análise Molecular:	
01. Extração do DNA viral.	24
02. Geração de clones virais para sequenciamento.	24
03. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), com diluição limite final “end point”	25
04. Detecção dos produtos amplificados.	26
05. Reação de Sequenciamento para estudo da variabilidade genética do HIV-1.	26
06. Alinhamento das Seqüências.	27
07. Interferência Filogenética.	27
08. Estimativa das Distâncias par-a-par.	27
09. Confirmação da Seqüência Genômica da Região <i>pol</i> do Isolado de HIV-1 BZ167 no Inócuo Inicial da Infecção.	28
4 – RESULTADOS	29
4.A – Adequação dos métodos:	
4.A1 – Cultura celular não infectada	29
4.A2 – Análise da ativação e ciclo celulares por citometria de fluxo.	32
4.A3 – Cultura celular infectada – expansão de cepas virais.	33
4.A4 – Ensaio de cultura celular infectada: BZ167 x PBMC	38
4.B – Geração de clones a partir do DNA proviral – PCR <i>end point</i>	41
4.C – Sequenciamento do inócuo viral.	41
4.D – Sequenciamento dos clones gerados em cultura.	42
4.E – Identificação das substituições presentes nas seqüências.	42
4.F – Análise das substituições.	52
4.G – Alinhamentos gerados a partir das seqüências nucleotídicas.	53
4.H – análise dos alinhamentos.	53
5 – DISCUSSÃO	57
6 – COMENTÁRIOS E CONCLUSÃO	68
7 – BIBLIOGRAFIA	69

FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Quadro 01 – Distribuição global dos casos de HIV/Aids em 2003.....	6
Quadro 02 – Distribuição regional dos casos notificados de HIV/Aids - 2004.....	7
Quadro 03 – Representação esquemática do HIV-1 e de seu genoma.	10
Quadro 04 – Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1.	14
Quadro 05 – Mosaico de estruturas das Formas Recombinantes Circulantes do HIV-1 (CRFs).	16
Figura 01 – Resultados das análises de ciclo celular por citometria de fluxo.	32
Tabela A – Proteínas do HIV-1 e suas funções.	11
Tabela 01 – Condições de cultura.	40
Gráfico 01 – Curva de calibração quantitativa dos controles positivos.	37
Gráfico 02 – Relação entre os dias de cultura e as concentrações de p24 da cepa viral BZ167, na diluição 1:100.	38
Gráfico 03 – Relação entre Transição e Transversão.	52
Gráfico 04 – Análise das diferenças nucleotídicas – Condição 1.	54
Gráfico 05 – Análise das diferenças nucleotídicas – Condição 2.	54
Gráfico 06 – Análise das diferenças nucleotídicas – Condição 3.	55
Gráfico 07 – Análise das diferenças nucleotídicas – Todas as condições.	56

ABREVIATURAS

aids	Acquired Immune Deficiency Syndrome.
AZT	3'-azido-2', 3'-didesoxitimidina: azidotimidina, zidovudina ou retrovir.
ARV	Associated Retrovírus.
CA	Capsídeo.
CRFs	Formas Recombinantes Circulantes.
CCID ₅₀	Doses Infectantes de Cultura Celular (Cell Culture Infective Dose).
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos.
DST	Doença Sexualmente Transmissível.
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético.
EUA	Estados Unidos da América.
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).
<i>env</i>	Envelope.
FDA	Food and Drug Administration.
FITC	Isotiocianato de Fluoreceína (Fluorescein Isothiocyanate).
<i>gag</i>	Grupo Antigênico ou Antígeno Grupo Específico.
gp	Glicoproteína.
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (Human Immunodeficiency Virus).
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2 (Human Immunodeficiency Virus).
HTLV-III	Human T-Lymphotropic Virus Type III.
HAART	Terapia Anti-retroviral Altamente Ativa (Highly Active Antiretroviral Therapy).

IL-2	Interleucina 2.
IN	Integrase.
LAV	Lymphadenopathy-Associated Virus.
LTRs	Terminais longos de repetição (Long Terminal Repeats).
MA	Matriz.
MHC	Complexo Histocompatibilidade Principal (Major Histocompatibility Complex).
MOI	Multiplicity of Infection.
NB-III	Nível de Biossegurança 3.
NC	Nucleocapsídeo.
NIH	National Institute of Health.
<i>nef</i>	Fator de Regulação Negativa.
OMS	Organização Mundial de Saúde.
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells).
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction).
PHA	Fitohemaglutinina.
<i>pol</i>	Polimerase.
PR	Protease.
RT	Transcriptase reversa.
RNA	Ácido ribonucléico.
RNA _m	Ácido ribonucléico – mensageiro.
RPMI	Meio de Cultura Celular que leva as iniciais do instituto onde foi desenvolvido, descrito por MOORE e cols, 1969 (Roswell Park Memorial Institute).
RRE	Elementos de resposta a Rev.

SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
SFB	Soro Fetal Bovino.
SU	Superfície.
TAR	Elemento de resposta a transativação (do inglês: trans-activating response element).
<i>tat</i>	Trans-acting Transcription Transactivation.
TM	Transmembrana.
UDI	Usuários de Drogas Intravenosas.
UNAIDS	Comitê das Nações Unidas para a aids (Joint United Nations Programme).
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USA	United States of América.
<i>vif</i>	Fator de Infectividade Viral.
<i>vpr</i>	Proteína viral R.
<i>vpu</i>	Proteína viral U.

A pandemia de HIV/Aids tem sido um dos maiores desafios de saúde pública dos últimos 25 anos, dada a complexidade de seu agente etiológico e a rapidez com que produz novos casos. A variabilidade genética do HIV é um dos tópicos mais relevantes desta infecção e esta variabilidade genética resulta de limitações de fidelidade intrínsecas ao mecanismo de replicação viral, acentuados pela alta taxa de replicação na geração e eliminação de partículas virais durante o tempo da infecção. A transcrição reversa do genoma viral representa uma etapa crítica do ciclo biológico do HIV-1 e que pode sofrer a influência de vários fatores, como por exemplo a oferta de nucleotídeos ou o estado de ativação celular. Este déficit de oferta de nucleotídeos no momento da transcrição reversa pode gerar genomas altamente mutados nos quais, a informação viral se perde como no caso da hipermutação. Neste estudo propomos estudar *in vitro* os mecanismos que podem contribuir pela diversidade genética do HIV nos momentos iniciais da infecção em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis. Para tanto, ofertamos três diferentes condições de infecção e cultura para o HIV. Na primeira, infectamos PBMC's em repouso e mantivemos em cultura por 48h; na segunda as PBMCs foram infectadas e ativadas simultaneamente e mantida em cultura por 48h; na terceira condição, as PBMCs foram ativadas 72h antes da infecção, após, infectadas e mantidas em cultura por 48h. Utilizando a técnica do EndPoint PCR, DNA provirais oriundos de cada condição de cultura foram obtidos e 46 clones deste DNA produzidos. Em seguida, parte do gene *pol* contendo 1047 bp de todos os clones foi seqüenciado e analisado. Nossos resultados mostraram uma alta taxa de substituições de nucleotídeos ao longo das seqüências analisadas em todas as condições de cultura e a existência de regiões comuns entre estas seqüências, em todas as condições, em que ocorrem substituições, destacando as regiões entre 200 a 300 pb, 400 a 500 pb, 600 a 690 pb, 800 a 900 pb. Nestas regiões o processo mutacional é intenso, os eventos mutacionais que mais ocorrem são os de transição e as substituições nucleotídicas mais frequentes são as de G para A. Há clones hipermutados nas três condições e a taxa mutacional encontrada está em um intervalo de $1,0 \times 10^{-3}$ a $2,1 \times 10^{-2}$, valores muito acima do que os encontrados normalmente. Nossos resultados sugerem uma nova visão dos momentos iniciais da infecção pelo HIV-1. Estudos complementares poderão nos ajudar a entender de forma coesa os momentos iniciais da infecção pelo HIV-1 que, sem dúvida representa um evento crucial na evolução da doença.

HIV/Aids have been one of the major challenges for public health in the last 25 years. The genetic variability of the HIV-1 is one of the most relevant features in the study of HIV-1 infections. The genetic variability is the result of error accumulation during reverse transcription and the high turnover rate of the viral population. Reverse transcription represents a critical stage of the biological cycle of HIV-1, and can suffer the influence of some factors as for example the level of nucleotides or the state of cellular activation. This deficit in nucleotides at the moment of the transcription can generate highly mutated genomes in which, the viral information may be lost as in the case of the hypermutation. In this study we addressed in vitro, the mechanisms that can be responsible for the genetic diversity of the HIV-1 at the initial periods of the infection in mononuclear cells of peripheral blood (PBMC's) of healthy individuals. We offered three different conditions of infection. In the first, we infected resting PBMC's and we kept in culture for 48h; in the second PBMC's were infected and activated simultaneously and kept in culture for 48h; in the third condition, PBMC's were activated 72h before infection and kept in culture for 48h. Using molecular biology techniques, the deriving provirus DNA of each culture condition were isolated, and PCR clones of this DNA were obtained. All clones were sequenced and the *pol* gene was analyzed. Our results demonstrated an elevated number of nucleotide substitutions in the clones analyzed in all three culture conditions. A pattern in variation was observed in the sequences. We identify a common distribution of substitutions in all analyzed sequences in different culture conditions. Our results suggest a new vision of the initial periods of HIV-1 infection. Complementary studies will be necessary to allow a better understanding of the initial periods of HIV-1 infection which represents a crucial event related to disease progression.

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1-A - HISTÓRICO

No início dos anos 80 nos EUA (Estados Unidos da América), um surto de casos de sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, como sintomas, em decorrência de um comprometimento do sistema imunológico, entre adultos do sexo masculino, homossexuais, moradores de São Francisco e Nova York, chamou a atenção da comunidade médica. Uma nova patologia emergia, de origem desconhecida e com agente causador não identificado. Isto levou as autoridades médicas e sanitárias a especular que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível.

Em 1983 o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Luc Montagnier (França), isolou um vírus que possuía a enzima transcriptase reversa (enzima que caracteriza os retrovírus), a partir de um paciente com uma doença associada ao novo quadro de comprometimento imunológico, este vírus foi denominado de LAV- Lymphadenopathy-Associated Virus (BARRE-SINOUSSE et al., 1983) e parecia ser o primeiro indício do agente etiológico da nova doença.

Em 1984 os grupos dos doutores Robert Gallo e Jay Levy (EUA), publicaram também o isolamento de outros dois vírus contendo a enzima transcriptase reversa. Estes respectivamente foram denominados de HTLV-III- Human T-Lymphotropic Virus Type III (GALLO et al., 1984) e ARV- Associated Retrovírus (LEVY et al., 1984). Após a identificação da seqüência de nucleotídeos destes vírus, constatou-se que os vírus anteriormente denominados de LAV, HTLV-III e ARV eram variações genéticas do mesmo vírus e reconheceu-se então que o agente causador desta nova doença era um retrovírus (RATNER et al., 1985b).

Em 1986, a Comissão para a Taxonomia de Vírus recomendou a adoção da designação de Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV (da sigla em inglês: HIV-Human Immunodeficiency Virus) para o novo vírus e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA (da sigla em inglês: AIDS-Acquired Immune Deficiency Syndrome), para a doença que ele causa (COFFIN JM, 1996).

Pouco tempo mais tarde, um novo retrovírus foi isolado e identificado. Este retrovírus era muito semelhante geneticamente ao HIV-1 e também levava a aids, porém, de forma tênue e demorada. Assim esses dois retrovírus foram denominados de HIV-1 e HIV-2 (LEVY, 1993; WEISS, 1993). O HIV-1 é predominante na pandemia de aids, sendo encontrado em todo o globo, enquanto que o HIV-2 possui notificações de casos na África Central e Brasil (PIANIAZEK et al 1991), com maior prevalência na França e Portugal (revisado por GOMES et al., 2003).

Ao longo dos primeiros anos, a aids era reconhecida como “sentença de morte” para os indivíduos atingidos, não havia remédios e a progressão da doença era rápida levando inevitavelmente à morte, mas a medicina reagiu, em 1986 a primeira droga anti-HIV foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), órgão americano que regulamenta e autoriza a comercialização de medicamentos nos EUA e posteriormente em todo o mundo. A droga era o AZT, também conhecido como azidotimidina, zidovudina ou retrovir. Esta droga fora desenvolvida em 1964 com propriedades anticancerígenas e logo foi abandonada devido ao alto grau de toxicidade para os pacientes nas doses utilizadas. No início da década de 70 experimentos em laboratório mostraram que o AZT possuía também atividade antiviral e em 1985 foi descrita sua atividade anti-HIV (HORWITZ et al., 1964).

Novas drogas foram sendo desenvolvidas e em 1992 é apresentado o primeiro estudo envolvendo a utilização combinada de duas drogas e em 1996 é desenvolvida uma nova terapia, combinado a utilização concomitante de três ou mais drogas, esta terapia é chamada de Terapia Anti-retroviral Altamente Ativa-HAART (do inglês: Highly Active Antiretroviral Therapy), popularmente chamada de coquetel anti-HIV. Porém, o veloz aparecimento de cepas resistentes a diferentes combinações destes fármacos, freou a euforia inicial do desenvolvimento terapêutico e acelerou a busca de novos fármacos e novas estratégias terapêuticas (DE CLERC, 1998).

Atualmente, os fármacos anti-HIV disponíveis tem ação inibindo o sítio de ligação da enzima transcriptase reversa, promovendo a inibição alostérica da enzima transcriptase reversa, provendo a inibição “competitiva” da protease e ainda inibindo a fusão das proteínas de membrana do HIV-1 com receptores de membrana das células alvo (TANTILLO et al., 1994; WLODEMAR et al., 1998).

Hoje a pandemia de aids constitui um grave problema de saúde pública, mas aquela doença antes conhecida como terminal mudou de perfil e passou a ser encarada como uma doença crônica, com tratamento disponível, dando aos indivíduos infectados pelo HIV-1 esperança de vida.

O grande desafio atualmente é fazer com que o tratamento possa ser disponibilizado a todas as pessoas infectadas no mundo, não apenas em países ricos ou com programas que beneficiam o portador, como é o caso do Brasil.

1 B - EPIDEMIOLOGIA

Passados meros 25 anos desde os primeiros relatos, a pandemia de aids cresceu de forma devastadora, passando de uma série de pequenos surtos dispersos nos EUA e Europa, a uma calamidade de saúde pública mundial com grande impacto nas populações dos países em desenvolvimento. A migração populacional, a urbanização, o esgarçamento do tecido social, o preconceito, a discriminação, a situação social desfavorável das mulheres, a dificuldade de acesso a serviços de saúde além do declínio de algumas economias, constituem condições favorecedoras para a disseminação da pandemia de aids.

Segundo dados divulgados em dezembro de 2004, pelo boletim da UNAIDS (Joint United Nations Programme 2004) divisão da Organização Mundial de Saúde (OMS) responsável pelo monitoramento global da pandemia de HIV/Aids, até dezembro de 2003 (quadro 01), cerca de 40 milhões de pessoas em todo o mundo encontravam-se infectadas pelo HIV (entre 34 – 46 milhões, projeção para 2005). Durante o ano de 2003 no mundo, aproximadamente 3 milhões (entre 2.5 – 3.5 milhões, projeção para 2005) de pessoas morreram, sendo que, 500.00 (entre 420.000 – 580.00, projeção para 2005) eram crianças abaixo dos 15 anos de idade. Ainda em 2003, no mundo, foram registradas aproximadamente 5 milhões (entre 4.2 – 5.8 milhões, projeção para 2005) de novas infecções pelo HIV-1. Estima-se que 90% das pessoas com HIV/Aids vivem em países ditos “em desenvolvimento” da Ásia, África, América Latina e Caribe. Aproximadamente 70% dos casos ocorrem na África Sub-saariana, onde em algumas regiões, a soroprevalência do HIV-1 em adultos excede 30%. Nessa região, a razão homem-mulher infectada é de aproximadamente 1.2 homens

infectados para cada mulher infectada. Ao longo do ano de 2003, foram registradas aproximadamente 2.3 milhões de mortes na África Sub-saariana.

Os primeiros dois casos de aids no Brasil foram publicados em 1982 e eram referentes a indivíduos da Região Sudeste. Ao longo dos anos a aids avançou rapidamente em nosso país e, segundo o Boletim Epidemiológico da Coordenação Nacional de DST/Aids, programa do Ministério da Saúde, o número oficial de casos de aids no Brasil até 30 de junho de 2004 é de 362.364 pessoas (quadro 2), sendo 244.101 homens, 111.477 mulheres e 13.789 crianças até 12 anos de idade, embora, estimativas oficiais apontem para mais de 600.000 pessoas infectadas com o HIV-1 em todo o Brasil. Ainda, segundo o boletim, o número de óbitos em decorrência da aids no período de 1983 a dezembro de 2003 foi de 121.005 mortes, e o número de óbitos durante todo o ano de 2003 foi de 7.672 mortes.

Um dado chama a atenção, quando observado o quanto à população tem de conhecimento sobre as formas corretas de transmissão do HIV-1, observou-se que 62,3% da população entre 15-24 anos, possui entendimento correto sobre as formas de transmissão; 71,2% da população entre 25-39 anos e 67,1% da população entre 40-50 anos possui o mesmo entendimento. A via de transmissão mais comum é a sexual com 66.04% das notificações, sendo, 43.28% heterossexual e 22.76% homo/bissexual. UDI (Usuários de Drogas Intravenosas) aparecem como a segunda via de transmissão predominante na pandemia com 19.13% das notificações, porém, em 13.74% das notificações não foi possível identificar a via de transmissão. Transfusões de sangue e transmissão vertical (materno infantil) representam juntas menos de 1,0% dos casos de contaminação pelo HIV-1.

O número de casos de aids entre os homens, segundo o boletim, mostrou tendência de estabilização. Na categoria de exposição homo/bissexual a porcentagem dos casos de aids entre homens que fazem sexo com homens que era de 30% em 1998, caiu para 25% em 2004. Já entre os homens da categoria heterossexual o índice cresceu de 30% para 42% no mesmo período.

Por outro lado, entre as mulheres os índices só aumentaram desde o início da pandemia. Em 1998 havia 10.566 registros (durante o ano) entre as mulheres, no ano de 2003 este número chegou a 12.599 e até junho de 2004 mais de 5.538 (primeiro semestre) casos já haviam sido notificados.

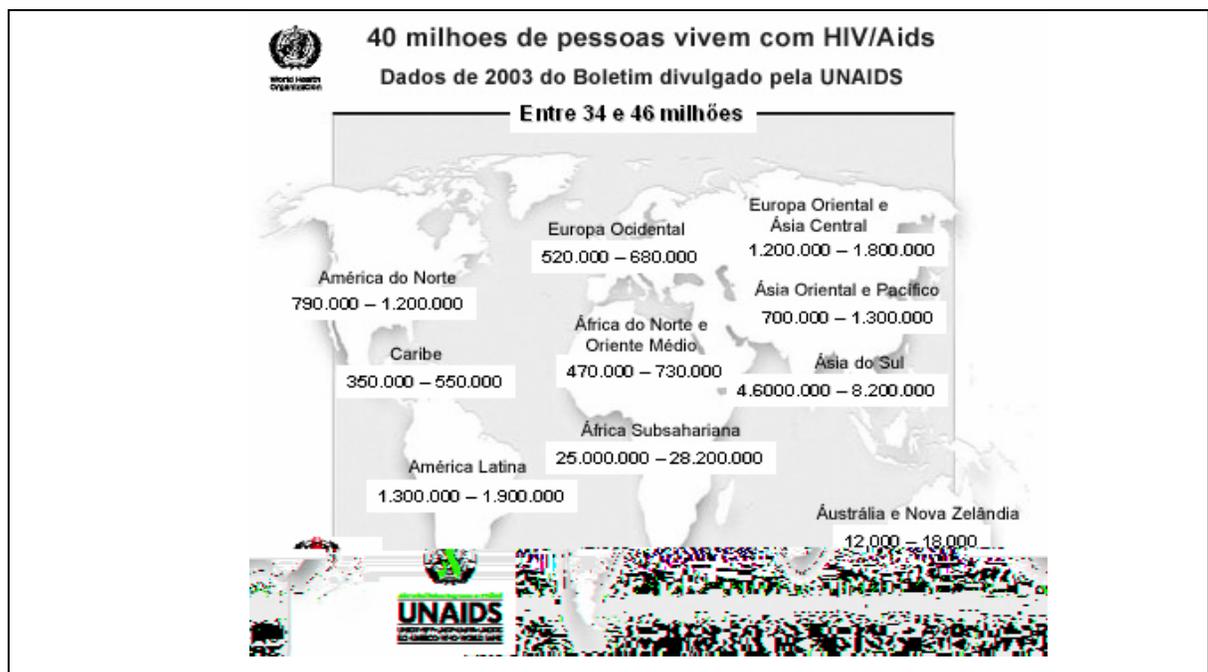
A relação homem/mulher infectados, que era de 16 homens para cada mulher no início dos anos 80, hoje é de 2 homens infectados para cada mulher infectada.

Entre os usuários de drogas injetáveis, o número de casos da aids vem mantendo a tendência de queda observada nos últimos anos. A porcentagem de casos nessa categoria de exposição, que era de 27% em 1994 (no sexo masculino), caiu para 13% em 2004. Entre as mulheres da mesma categoria, o índice caiu de 17% para 4,3% no mesmo período.

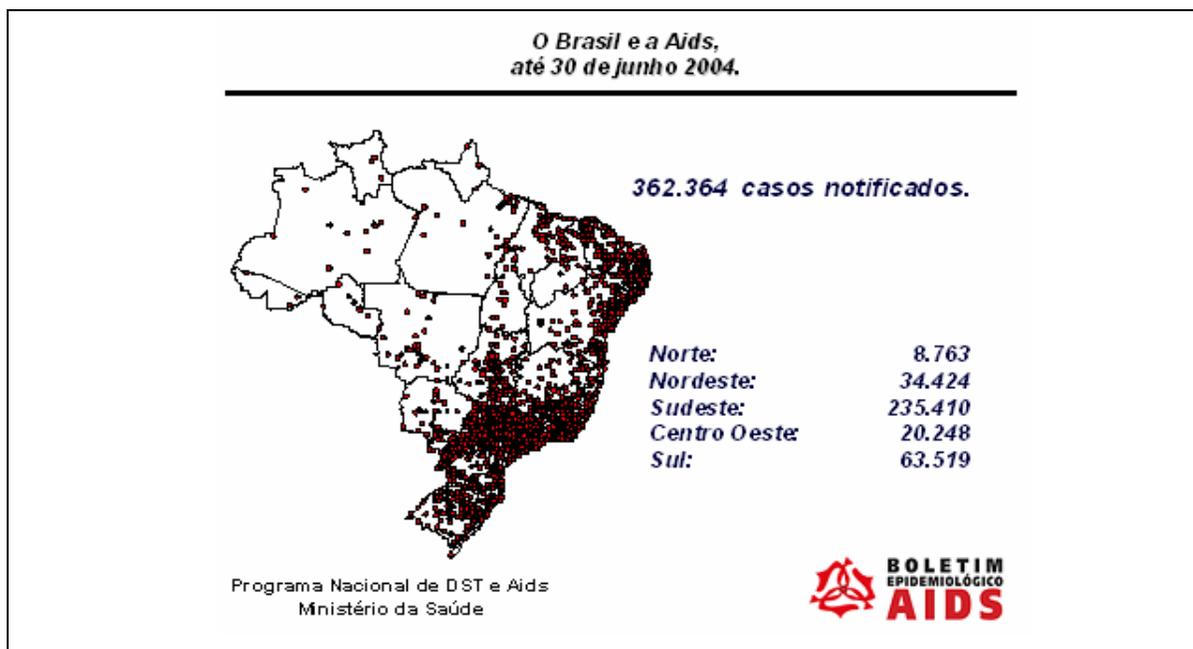
A taxa de mortalidade aponta para um quadro de estabilidade, nos últimos anos. No público masculino, o índice registrado em 2003 é o mesmo de 2001 – 8,8 mortes a cada grupo de 100 mil habitantes. Entre as mulheres, houve um discreto aumento: em 2001, foram 3,9 óbitos por 100 mil mulheres; em 2003, o total registrado foi de 4,0 mortes a cada 100 mil mulheres.

Vale ressaltar que a estabilização nos índices de mortalidade se deve em grande parte ao tratamento anti-retroviral dispensado aos portadores do HIV/Aids em nosso país, porém o índice de novos casos ainda é crescente no Brasil e em todo o mundo.

Quadro 01: Distribuição global dos casos de HIV/Aids em 2003.



Quadro 02: Distribuição regional dos casos notificados de HIV/Aids - 2004.



1 C - PARTÍCULA GENÔMICA DO HIV-1

A partícula viral possui forma esférica, tem cerca de 100nm de diâmetro, estando envolta por uma bicamada lipídica originária da célula em que se deu a replicação viral. Associada a membrana viral encontram-se duas glicoproteínas: A proteína transmembrana gp41, e estando ligada à região externa desta, a glicoproteína gp120. O complexo gp120-gp41 resulta de um precursor protéico do gene *env* e é responsável pela fusão da membrana viral à membrana da célula alvo (LEVY, 1993; EMERMAN et al., 1998; TURNER et al., 1999).

O HIV-1 é complexo na sua organização genômica, o material genético é constituído por duas fitas simples de RNA de polaridade positiva, estabilizado pela nucleoproteína p7. Está envolto pelo cápside que possui a forma de tronco cônico, formado por várias unidades da proteína p24. No capsídeo, além do RNA encontram-se as enzimas virais e as proteínas acessórias. No primeiro grupo estão a transcriptase reversa (RT, heterodímero de p51 e p66), a protease (PR, homodímero de

p15) e a integrase (IN, homotetrâmero de p11); No segundo grupo estão *nef* (p27), *rev* (p19), *tat* (p14), *vif* (p23), *vpr* (p18) e *vpu* (p16) – (ARTHUR et al., 1992; YU et al., 1992).

O genoma de 10K do HIV-1 apresenta duas regiões LTRs (Terminais longos de repetição, do inglês “Long Terminal Repeats”), localizadas nas extremidades do genoma proviral e três genes essenciais, comuns a todos retrovírus, que codificam polipeptídeos estruturais e não estruturais: *gag*, *pol* e *env* (LEVY, 1993; EMERMAN et al., 1998; HOFFMAN et al., 2002).

Genes essenciais que codificam as proteínas estruturais do HIV-1:

Gene *pol* (polimerase): Região gênica que se sobrepõe à região *gag*. Codifica três enzimas funcionais necessárias para a replicação viral: 1)- protease: responsável pela clivagem das poliproteínas precursoras do gene *gag* e *gag/pol*, tornando-as funcionais; 2)- transcriptase reversa: possui duas atividades catalíticas que incluem a atividade de DNA polimerase responsável pela polimerização do DNA a partir do RNA e a atividade de ribonuclease H (Rnase H), que degrada o componente RNA das moléculas híbridas RNA-DNA que foram formadas; 3)- integrase: responsável pela integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira (TURNER & SUMMERS, 1999; GOTTLINGER, 2001; HOFFMAN et al., 2002).

Gene *env* (envelope): codifica uma proteína precursora gp160, esta, ao ser clivada origina duas outras glicoproteínas a gp41 e a gp120. A gp120 é a proteína mais externa do HIV-1e responsável pela ligação viral com a molécula CD4 e co-receptores CXCR4 e CCR5, presentes na membrana das células alvo. Ao ligar-se, as glicoproteínas virais sofrem alterações conformacionais expondo a alça V3 da gp120 e o domínio de fusão da gp41, sendo esta região alvo de anticorpos neutralizantes e de fármacos anti-retrovirais inibidores de fusão (TURNER & SUMMERS, 1999; GOTTLINGER, 2001; HOFFMAN et al., 2002).

Gene *gag* (grupo antigênico): codifica uma proteína precursora, a p55 que, ao ser processada pela protease viral dá origem a quatro outras proteínas que irão constituir o cerne viral: 1)- p17: proteína da matriz; 2)- p24: principal proteína do capsídeo; 3)- p6: proteína rica em prolina; 4)- p7: proteína de ligação com o ácido nucleico. (GOTTLINGER, 2001; HOFFMAN et al., 2002).

Genes acessórios e regulatórios do HIV-1:

Gene *vpr*: Codifica uma proteína de 15 KDa que é traduzida a partir de um RNAm que sofreu um único evento de “splicing”. É encapsulada com o vírion, auxiliando no transporte do DNA para o núcleo da célula. Participa no processo de parada do ciclo celular, da expressão protéica, do aumento da produção de vírions e de apoptose celular (ARGAÑARAZ et al., 2003; BOUR & STREBEL, 2003; TUNGATURTHI et al., 2003).

Gene *nef*: É uma das primeiras proteínas a serem expressas nas células infectadas após o início do ciclo replicativo do HIV-1. Codifica a proteína citoplasmática Nef, que se liga à superfície interna das membranas celulares onde exerce sua função de internalização dos receptores CD4 e MHC. Esta ação diminui o reconhecimento e morte por linfócitos T CD8+, inibe a re-infecção das células por novos vírus e parece estar associada ao aumento da atividade do NF-kB (fator de estímulo da transcrição celular), facilitando assim, a expressão viral. Estudos demonstraram que vírus com o gene *nef* deletado ou inativo são menos virulentos (ARGAÑARAZ et al., 2003; BOUR & STREBEL, 2003; TUNGATURTHI et al., 2003).

Gene *vif*: Fator de infectividade viral codifica uma proteína de 23 Kda que é produzida tardiamente durante a replicação viral e é capaz de aumentar de 100 a 1.000 vezes a infectividade das partículas virais. Tem interação com a proteína celular APOBEC-3G protegendo o genoma viral da ação destrutiva desta proteína celular e impedindo que esta atue de forma a promover a hipermutação do genoma viral (BOUR & STREBEL, 2003; TUNGATURTHI et al., 2003).

Gene *vpu*: Codifica uma proteína de 16 KDa e que está envolvida nos processos de regulação da expressão de CD4 na superfície celular degradando esta molécula ainda no retículo endoplasmático, antes que estas sejam transportadas para a membrana citoplasmática. Sua ação parece aumentar a taxa de liberação de vírus da célula infectada, pois facilita a maturação e montagem dos novos vírus (BOUR & STREBEL, 2003; TUNGATURTHI et al., 2003).

Gene *tat*: É o principal transativador da expressão dos genes virais. Codifica a proteína Tat (trans-acting transcription transactivator) que é a principal reguladora transcricional do LTR. Seu alvo no RNA é o elemento de resposta à transativação (TAR). Esta atividade acontece durante a transcrição dos RNAs virais e é essencial para a replicação viral tanto *in vivo* como *in vitro*. Parece estar associada ao processo de latência do HIV-1(GOFF, 2003; PETELIN E TRONO, 2003).

Gene *rev*: Atua na fase pós transcricional e promove o transporte das moléculas de RNAm das proteínas estruturais e acessórias do núcleo celular para o citoplasma. Controla a razão entre RNAm processado e não processado através da ligação nos elementos de resposta a Rev (RRE), presentes em todos os transcritos virais que ainda não sofreram “splicing” (GOFF, 2003; PETELIN E TRONO, 2003).

Quadro 03: Representação esquemática do HIV-1 e de seu genoma.

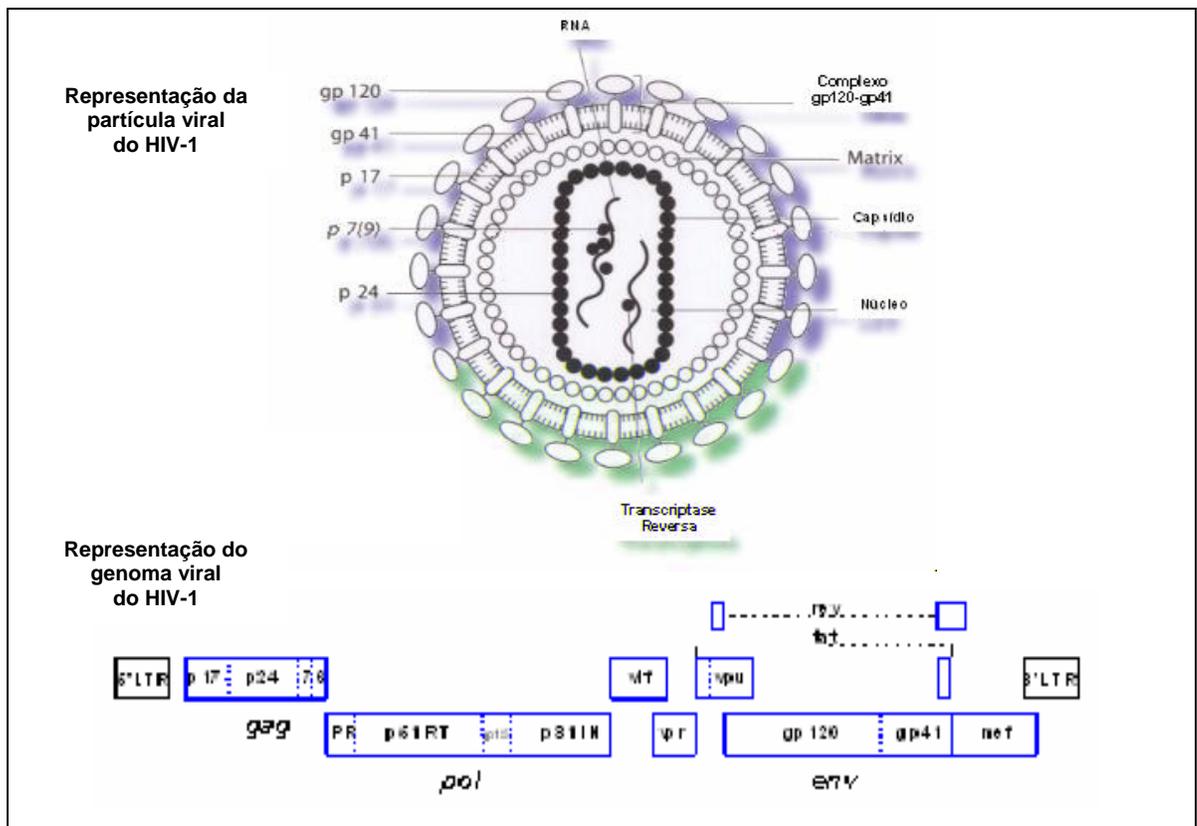


Tabela A: Proteínas do HIV-1 e suas funções.

Nomenclatura por massa	Outras designações	Produto Gênico / Função
gp120	SU, env: envelope	Ligação aos receptores e co-receptores celulares
gp41	TM, env: envelope	Fusão das membranas e internalização do vírus
p51	RT, <i>pol</i> , p55: polymerase	Juntamente com a p66 forma a Transcriptase Reversa (RT) ou DNA polymerase.
p66	RT, <i>pol</i> , p63: polymerase	Juntamente com a p51 forma a Transcriptase Reversa (RT) ou DNA polymerase.
p11	IN, p12: polymerase	Integrase (IN): integração do DNA viral ao da célula.
p15	PR, p12: polymerase	Protease (PR): Processamento pós-expressão das proteínas virais.
pP7	NC, gag: antígeno grupo-específico	Ligação ao RNA e sua estabilização; Proteínas do cerne e da matriz.
p17	MA, gag	Constituição da matriz.
p24	CA, gag, p25	Constituição do capsídeo.
p27	nef: Fator de Regulação Negativa	Aumenta a replicação viral in vivo e in vitro; Regula CD4 negativamente
p16	vpu: Proteína viral U	Exclusiva do HIV-1; Auxilia a liberação do vírus e inibe a ligação precoce gp120-CD5
p18	vpr: Proteína viral R	Transporte de DNA para o núcleo. Auxilia a replicação viral; Parada do ciclo celular.
p23	vif	Aumenta a Infectividade viral.
p19	rev	Regulação da expressão do RNAm viral. Permite a exportação de transcritos não processados no núcleo.
p14	tat	Transativador: regulador positivo da transcrição.

TM: Transmembrana; SU: Superfície; NC: Nucleocapsídeo; MA: Matriz; CA: Capsídeo.

1 D - MECÂNISMO DE INVASÃO CELULAR E CICLO REPLICATIVO DO HIV-1

O HIV-1 invade a célula hospedeira através da interação entre o complexo glicoproteico do envelope viral (gp120 e gp41) com a molécula do antígeno de diferenciação celular (CD4) da membrana celular, com receptores de quimiocinas que funcionam como co-receptores para o HIV-1 (CCR5, CCR2 e CXCR4) e com glicosaminoglicanos na superfície celular. O CD4 é uma proteína tipo imunoglobulina (Ig) expressa na superfície de linfócitos T (preferencialmente), macrófagos de sangue periférico e tecidos, células da microglia (Sistema Nervoso Central), células dendríticas (exp. células de langerhans). Esta interação consiste em uma ligação de alta afinidade entre os domínios C2, C3 e C4 da gp120 que estabelecem interações com a molécula de CD4. (STAMATOS et al., 1993; CHENG-MAYER et al., 1998; RIZZUTO et al., 1998). A interação entre as moléculas gp120 e CD4, causam alterações conformacionais na gp120 que levam a formação de um sítio para interação entre esta molécula e os co-receptores. Estes co-receptores exercem influência no direcionamento da infecção celular, o HIV-1 com tropismo por células T (T-trópico, formador de sincício), utiliza-se do co-receptor CXCR4, enquanto que, o HIV-1 com tropismo por macrófagos (M-trópico, não formador de sincício), utiliza-se do co-receptor CCR5. A alça V3 da proteína gp120 é a provável responsável pelo reconhecimento destas ligações e conseqüente tropismo celular, porém, não parece ser a única determinante deste complexo mecanismo, uma vez que, apresenta alta variação na seqüência de seus aminoácidos (BERGER, 1997; CHAN et al., 1998; CHOE, 1998). Um resíduo peptídico N-terminal hidrofóbico, rico em glicina, presente na gp41 parece iniciar a fusão. Uma vez concluída a ligação gp120/CD4/co-receptor, a proteína gp41 dissocia-se da gp120 (um trímero de um dímero), que sofre modificações conformacionais resultando no seu alongamento e exposição de seu peptídeo de fusão que é então inserido na membrana celular, concluindo a fusão vírus/célula, permitindo assim que, o capsídeo viral seja liberado no interior celular (BERGER, 1997; CHOE, 1998; PEÇANHA et al., 2002).

Após a fusão ocorre a liberação do “core” viral para o citoplasma celular iniciando a transcrição do RNA viral em DNA complementar sob dependência da enzima transcriptase reversa. A transcriptase reversa (RT) promove a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla, catalisando as reações de polimerização de DNA dependente de RNA e dependente de DNA, além de degradar a

porção de RNA do híbrido RNA-DNA formado durante o processo (atividade da ribonuclease H). Esta etapa da replicação viral é considerada um momento crítico para a diversidade genética do HIV-1. Devido ao alto potencial mutagênico no momento da transcrição, uma vez acontecendo o erro da enzima transcriptase reversa, este é incorporado ao genoma viral. Um DNA diferente (mutado ou hipermutado) do molde original poderá ser formado. (FRANKEL et al., 1998; PEÇANHA et al., 2002).

Este DNA complementar é rapidamente levado até o núcleo celular em um processo mediado pela proteína Vpr, ação desta proteína permite o transporte do complexo nucleoproteico mesmo na ausência de quebra mitótica do envelope nuclear. Uma vez no núcleo o DNA viral pode permanecer em forma circular, isoladamente ou pode haver integração no genoma celular (provírus), dependente da enzima integrase, que integra de forma estável o cDNA do genoma viral no DNA cromossômico através de várias etapas como endonuclease, transferência de fita, desintegração e ligação, estabelecendo um provírus e completando desta forma a fase pré-integrativa (COHEN, 1996; PEÇANHA et al., 2002).

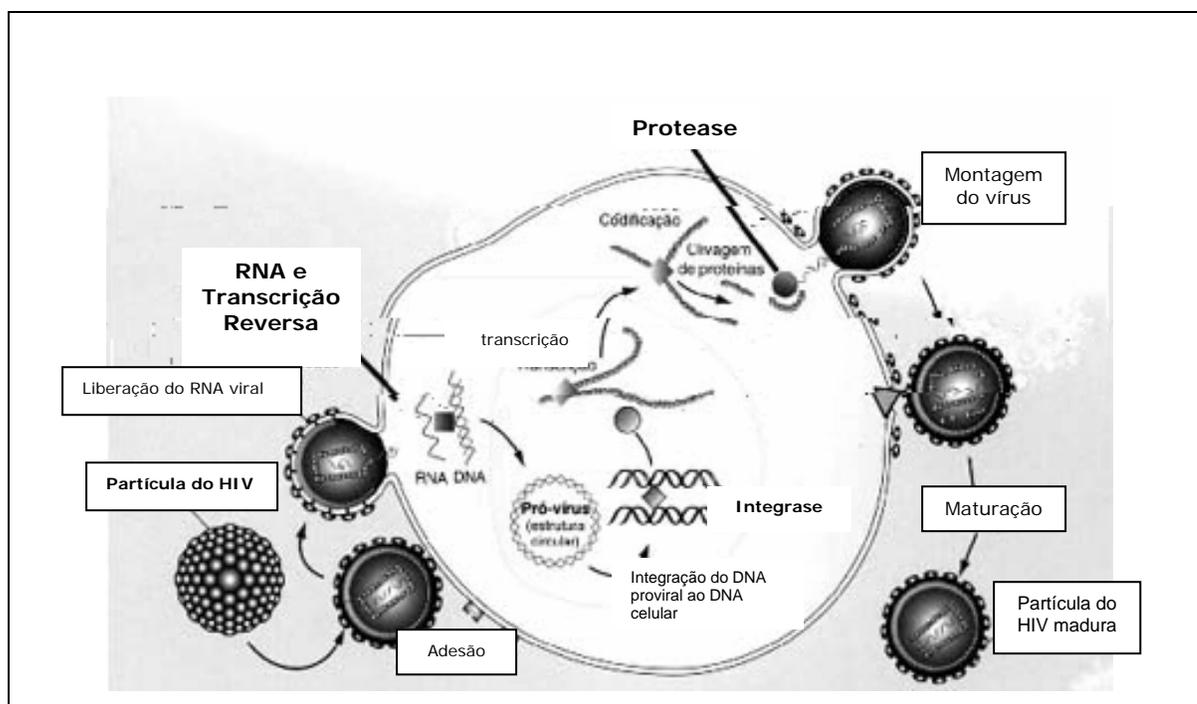
O mecanismo de transcrição celular passa a considerar o pró-vírus como um gene próprio, estando a expressão dos genes provirais dependentes do estado de ativação celular. Na maioria das retrovirose a expressão dos provírus integrados é mediada apenas por proteínas celulares, enquanto que, nas retrovirose humanas, como no caso do HIV-1, esta expressão é mediada também por proteínas virais. Os RNAs virais transcritos são expressos a partir de um promotor localizado na região 5' do LTR e a proteína acessória Tat aumenta consideravelmente a velocidade de transcrição. O conjunto de RNAs transcritos, de tamanho genômico ou divididos, são então transportados para o citoplasma, onde serão então traduzidos (HOPE, 1997; FRANKEL et al., 1998; PEÇANHA et al., 2002).

O processo de tradução e formação de novas partículas virais é regulado pela enzima Rev. Este processo produz as proteínas Vif, Vpr, Nef, além das poliproteínas gag e gag-pol que serão processadas posteriormente em matriz, capsídeo, nucleocapsídeo, p6, protease, integrase e transcriptase reversa. As proteínas gp41 e gp120 no entanto, são formadas a partir da poliproteína gp160, que é coexpressa com os receptores CD4 no retículo endoplasmático. Nesse momento a proteína Vpu degrada os receptores CD4 recém sintetizados permitindo assim que as proteínas do Env sejam transportadas até a membrana celular. Um fator relevante no ciclo replicativo do HIV-1 é

a atividade das poliproteínas formadas antes mesmo de sofrerem processamento proteolítico. A porção p17 da gag promove a agregação da gag e da gag-pol no citoplasma e a p7 (nucleocapsídeo) liga-se e carrega o RNA, iniciando desta forma a montagem do vírus (GONDA et al., 1985; VERONESE et al., 1988; PEÇANHA et al., 2002).

O processamento, ou montagem dos vírions se dá inicialmente próximos à membrana celular. As partículas imaturas compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais passam por uma modificação morfológica (maturação) durante ou após o “brotamento”. O evento da maturação ocorre com a clivagem das poliproteínas gag e gag-pol pela protease viral produzindo enzimas e proteínas estruturais do capsídeo. O processamento proteolítico das poliproteínas ocorre apenas em um estágio avançado do ciclo replicativo e requer altas quantidades de substrato provavelmente devido provavelmente a baixa atividade enzimática da protease não processada, o que é alcançado apenas durante o “brotamento”. Após uma hidrólise inicial, a protease liberada pode então exercer sua atividade máxima, processando de forma rápida as poliproteínas, completando assim o ciclo replicativo do HIV-1. Uma vez maduros e livres os novos vírions são potencialmente capazes de infectar novos linfócitos adjacentes (VAISHNAN et al., 1991; MEEK, 1992; PEÇANHA et al., 2002).

Quadro 04: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1.



1 E - DIVERSIDADE GENÉTICA GLOBAL DO HIV-1

Desde que os primeiros isolados do HIV-1 foram estudados molecularmente, através da análise de suas seqüências nucleotídicas, verificou-se uma alta diversidade genética nas amostras isoladas em diferentes regiões geográficas e, de uma mesma região (CLAVEL et al., 1986; SAAG et al., 1988). Análises de isolados virais obtidos de um mesmo indivíduo ao longo de um período durante a infecção e, mesmo aqueles obtidos em um determinado ponto da infecção, também demonstram uma importante variação entre as amostras (FISHER et al., 1986; DIAZ et al., 1997).

Essa diversidade genética é uma característica marcante do HIV-1 e os fatores que contribuem para a geração desta diversidade estão relacionados à alta taxa de replicação viral no organismo infectado que é da ordem de 10^{10} novos virions por dia (HO et al., 1995), e a fatores inerentes ao mecanismo de replicação do HIV-1, como a taxa de incorporação de erro da enzima transcriptase reversa (RT) durante a síntese de DNA dupla fita, que é de cerca de $1,7 \times 10^{-4} / 10^{-5}$ erros por base incorporada por ciclo de replicação, o que leva ao surgimento de mutações. Então, considerando que o genoma do HIV-1 é composto por 10^4 bases nucleotídicas e que, a cada ciclo replicativo deste genoma pode ocorrer pelo menos uma mutação, a transcrição reversa é considerado o principal evento gerador desta alta taxa de diversidade viral (HO et al., 1995; FRANKEL et al., 1998).

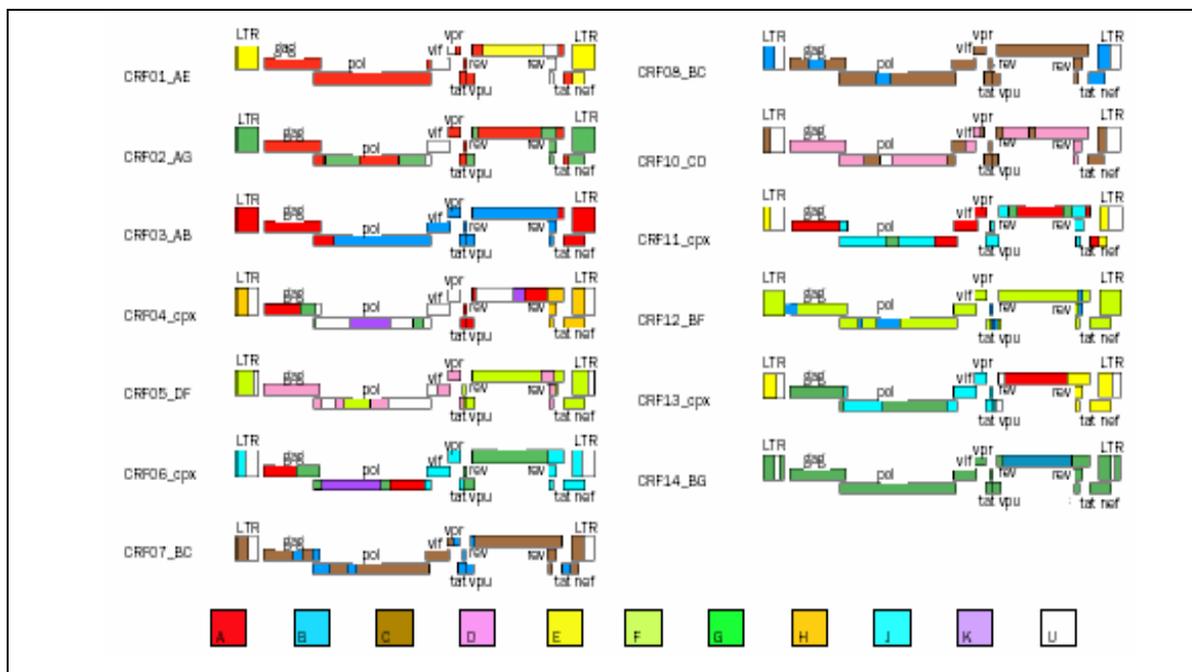
Assim, com altas taxas de mutação e geração de novas partículas virais, uma população viral presente em um organismo deve conter poucos genomas idênticos, e esta população, composta de genomas similares mas não idênticos, caracteriza a população viral. A caracterização molecular de isolados virais (vírus RNA) representativos desta população, infectando um mesmo indivíduo, demonstra que estes se apresentam como uma distribuição de mutantes altamente relacionados, e o termo “quasispécie” foi usado para identificar este tipo de população viral (EIGEN, 1971; DOMINGO et al., 1998).

Taxonomicamente, essa diversidade genética é espelhada no fato de que o HIV-1 está classificado em três grupos distintos: M (main), O (outlayer) e N (new). O principal responsável pela epidemia em todo o mundo é o HIV-1 do grupo M, que está dividido em *subtipos*: A, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K.

Ainda dentro do grupo M encontramos Formas Recombinantes Circulantes denominados de CRFs: CRF01_AE, CRF02_AG, CRF03_AB, CRF04_cpx, CRF05_DF, CRF06_cpx, CRF07_BC, CRF08_BC, CRF09_cpx, CRF10_CD, CRF11_cpx, CRF12_BF e CRF13_cpx (De LEYS et al., 1990, Thomson MM et al, 2002). Atualmente já estão identificados 18 Formas Recombinantes Circulantes. No Brasil o subtipo B é predominante na pandemia de aids, com relatos de infecções em menores proporções causadas pelos subtipos F e C, além de casos de dupla infecção pelos subtipos B/F e B/C e também de formas recombinantes (SABINO et al., 1994, JANINI et al., 1996, JANINI et al., 1998, BONGERTZ, et al., 2000).

A diversidade genética do HIV-1 é talvez a característica mais importante deste vírus porque é através da contínua geração de mutantes que ocorre o escape às pressões imunes e as drogas anti-retrovirais. Desta forma esta diversidade frustra o desenho de vacinas e perpetua o avanço da pandemia.

Quadro 05: Mosaico de estruturas das Formas Recombinantes Circulantes (CRF-s).



Thomson et al., 2002.

1 F - ATIVAÇÃO CELULAR E CICLO CELULAR

A demonstração de que a ativação celular de linfócitos T CD4 pode influenciar a transcrição genômica do HIV-1 foi realizada por ZACK et al, 1995., a infecção viral de linfócitos T CD4 em repouso resultou em uma instável e incompleta transcrição reversa do HIV-1. Porém, quando estas células foram ativadas e infectadas a transcrição reversa do HIV-1 foi eficiente. Assim, parece que a replicação viral esta diretamente relacionada com a ativação dos linfócitos T, podendo haver implicações das fases do ciclo celular na taxa de transcrição reversa (O'BRIEN, et al 1994). A relação da ativação celular com a transcrição reversa do HIV-1 foi demonstrada por JANINI et al, 2001., mantendo as células em cultura, estimuladas com a adição de interleucina-2(IL-2) e fitohemaglutinina (PHA) em diferentes condições. Estudos anteriores mostram que determinados estados do ciclo celular favorecem a infecção e replicação viral enquanto outros dificultam a sua propagação. Isto pode estar relacionado com a alta oferta de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) que não é constante, oscilando em determinados momentos do ciclo celular, havendo portanto momentos mais favoráveis ou não à infecção viral. (ZACK et al, 1990; KORIN et al 1998).

O ciclo celular ocorre em quatro fases com características distintas dependentes umas das outras, o insucesso da fase anterior compromete a fase seguinte podendo levar a parada do ciclo. Na fase G1 ocorre a síntese de RNA e de proteínas. Na fase S ocorre a duplicação do DNA. A fase G2 é responsável pela checagem na duplicação do DNA e continuação da síntese protéica da fase anterior. Na fase M ocorre o pareamento dos cinetocores, com conseqüente divisão celular (COOPER, 2000; LEWIN, 2000; ALBERTTS, 2000). Segundo trabalhos anteriores, a fase G1b do ciclo celular, parece ser um momento mais favorável para que a transcrição reversa ocorra de forma completa e eficiente, pois a oferta de dNTPs nesta etapa apresenta-se elevada. Por outro lado, as etapas iniciais do ciclo celular como a fase G1a, podem oferecer um ambiente hostil ao HIV-1 pela pequena oferta de dNTPs. A hipermutação onde as taxas mutacionais vão além da viabilidade das seqüências pode levar a formação de partículas virais incompletas incapazes de sair da célula hospedeira, partículas virais incompletas incapazes de infectar linfócitos adjacentes e a total perda da informação genética do HIV-1 resultando em extinção viral. (JANINI et al., 2001; KORIN et al 1999; ZACK et al, 1995).

Desenhamos uma metodologia capaz de relacionar a ativação celular com a variação genética do HIV-1. Utilizando uma metodologia criteriosa, lançando mão de técnicas de análise molecular como ferramentas investigativas. Propomos um desenho de estudo onde 3 condições celulares diferentes foram analisadas: 1)-células em repouso, não ativadas (células fora de ciclo) foram infectadas com HIV-1; 2)-células ativadas com fitohemaglutinina no momento da infecção (células pré-ciclo) foram infectadas com HIV-1; 3)-células ativadas com fitohemaglutinina por 72h antes da infecção (células em ciclo) foram infectadas com HIV-1. Estas células, após a infecção foram mantidas em cultura por 48h e em seguida foi isolado o DNA proviral e este analisado molecularmente. Com isso pretendíamos verificar que impacto estas condições podem exercer na diversidade genética do HIV-1.

Embora Janini et al., tenham definido as condições em que a diversidade viral emerge, a população celular utilizada (linfócitos T CD4+ isolados de pacientes HIV+) não reflete as reais condições em que os eventos ocorrem. Neste estudo tentamos relacionar a ativação celular e a geração de diversidade genética viral utilizando técnicas de cultura celular de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), de indivíduos saudáveis, sendo infectadas pelo HIV-1 (in vitro) e com posterior análise de seqüenciamento de DNA proviral gerado a partir destas culturas.

Nas condições de culturas celulares, propostas acima, foi possível observar a ocorrência de uma importante variação genética viral. Os trabalhos realizados em cultivo celular a partir de células isoladas de pacientes HIV+, ativadas e mantidas por 72h em cultura relatam uma população viral homogênea, com diversidade viral baixa. Nenhum destes trabalhos estudou os primeiros momentos da infecção viral como proposto em nosso estudo.

Assim, a razão deste projeto foi estudar esses eventos na intenção de compreender mais claramente a influência dos estados celulares sobre a diversidade genética do HIV-1.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2 A - OBJETIVOS PRINCIPAIS

- 2 A1 - Estudar em cultura de células se existe relação entre a ativação celular e a diversidade genética do HIV-1.
- 2 A2 - Estudar o impacto genético no HIV-1 de uma população celular mista em momentos distintos do ciclo celular (células ativada e não ativada), na tentativa de compreender os eventos que ocorrem durante a infecção.

2 B - OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 2 B1 - Verificar em cultura de células outros possíveis fatores envolvidos na geração de mutações no HIV-1, que não sejam a taxa de erro da enzima transcriptase reversa viral.

MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3 A - Metodologias Pré-Projeto:

1- Obtenção de isolados virais.

Foram obtidos isolados virais referência, HIV do Tipo 1, subtipo B (BZ167) e HIV do Tipo 1, subtipo B (191US054), fornecidos pelo National Institute of Health (NIH), Maryland, Estados Unidos. Esses isolados correspondem a preparações virais quantificados onde, os vírus presentes possuem seqüência nucleotídica vital do genoma conhecida. Desta forma é possível à realização do estudo das mutações após o experimento em cultura de célula porque se parte de uma base de genoma conhecido (Louwagie J, et al., 1995). Utilizamos em nossos experimentos o isolado viral BZ167.

2- Obtenção de células mononucleares de sangue periférico.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas a partir de bolsas de sangue (concentrado de hemácias e leucócitos) de indivíduos doadores, cedidas pelo Banco de Sangue do Hospital São Paulo (Escola Paulista de Medicina -UNIFESP). Foram utilizadas apenas as bolsas de sangue que apresentaram todos os testes de triagem realizados pelo Banco de Sangue, negativos. Os testes sorológicos de triagem são: Anti-HBC, HBS-Ag, Anti-HCV, Anti-HIV 1 e 2, Anti-HTLV 1 e 2, VDRL e Doença de Chagas.

3- Cultura de células mononucleares de sangue periférico.

A partir do sangue total as células mononucleares (PBMCs) foram isoladas através da técnica de separação celular por gradiente de densidade (Ficoll-hepaque D=1077, Organon Teknika). O sangue total é diluído na proporção de 1:1 em solução de PBS 1x (NaCl 0,80g%; KCl 0,02g%;

Na₂HPO₄.H₂O 0,22g%; KH₂PO₄ 0,02g%) e depositado em tubos Falcon de fundo cônico (15 ou 50 ml) sobre a camada de ficoll-hepate na proporção de 3:1. Em seguida, centrifugado a 18 °C a 2000 rpm's por 25 minutos (Centrífuga modelo Eppendorf 5403, Nova Iorque, NY, Eua). Após a centrifugação aspira-se o anel celular (PBMCs) formado pela separação por densidade, transferindo as células para tubos Falcon de fundo cônico (15 ou 50 ml), completar com solução PBS 1x e centrifugar a 1200 rpm's por 10 minutos. Esta etapa deve ser realizada 2 vezes para retirada de resíduos de ficoll-hepate que podem ser tóxico para as células. Por fim, as células são contadas e mantidas em frascos para cultura celular contendo 10 ml de meio RPMI 1640 (Gibco-BRL™, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado a 60°C por um hora, 2mM de L-glutamina (Gibco-BRL™), 100 U/ml penicilina e 100 ug/ml estreptomicina (Gibco-BRL™). Após a adição de interleucina-2 e fitohemaglutinina, as células serão mantidas em cultura em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 72h, para posterior infecção viral.

4- Expansão e estoque viral.

O isolado viral fornecido pelo NIH foi utilizado na infecção de PBMCs. A infecção se deu mantendo as células em cultura com os vírus por 2 horas em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL™, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado, 2mM de L-glutamina (Gibco-BRL™), 100 U/ml penicilina e 100 ug/ml estreptomicina (Gibco-BRL™). Após esse período executamos três lavagens com meio RPMI 1640 para retirada de vírus livres. Por fim, mantivemos as células infectadas em cultura para produção viral.

5- Quantificação da produção viral em cultura celular.

A quantificação da produção viral foi medida com base na quantidade de antígeno p24 (core do HIV-1) presente no sobrenadante da cultura celular, por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o Kit Viranostika-HIV-1 antigen – Microelisa System (Organon Teknika), seguindo as instruções do fabricante. Foi calculado o CCID₅₀ de cada isolado viral após a expansão. O resultado obtido foi utilizado para o cálculo do MOI (Multiplicity of infection) de cada isolado.

6- *Cálculo do CCID₅₀ dos isolados virais:*

A determinação do título viral por diluição limite requer a inoculação de múltiplas culturas em diferentes diluições do vírus para obter a estimativa da quantidade de vírus capaz de infectar 50% da cultura. Esta quantidade de vírus é conhecida como 50% da dose infecciosa de uma cultura, ou CCID₅₀. O título viral determinado desta maneira pode ser expresso em CCID₅₀/ml ou convertido em pfu/mL. Seguimos o método descrito em *Reed and Muench* 1938. O estoque viral de interesse deve ser previamente expandido em cultura de células (PBMC). O CCID₅₀ de uma população viral deve ser determinado em cada ponto de coleta do estoque viral, ou seja, se for coletado o sobrenadante da cultura após 3 e 7 dias de infecção, o CCID₅₀ deve ser calculado independentemente para os vírus do terceiro e sétimo dias.

3 B – Metodologias utilizadas paralelamente ao projeto:

Neste item destacamos as metodologias complementares, para análise de ativação celular e determinação do ciclo celular através da citometria de fluxo. A aplicação destas metodologias será discutida em Resultados.

01- *Marcação das PBMCs com anticorpo monoclonal(CD4) para estudo do ciclo celular.*

As PBMCs (10⁶ cel/ml) isoladas, foram colocadas em tubos de polipropileno de 4,0ml (BD Biosciences, San Diego, Califórnia, EUA), em seguida foi adicionado 5.0µl de anticorpo monoclonal CD4 (clone RPA-T4) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate, FITC, BD Biosciences). Incubamos por 15 minutos em abrigo da luz.

02- *Preparação das PBMCs para estudo do ciclo celular .*

Para estudar o ciclo celular utilizamos a técnica de marcação de DNA com iodeto de propídio. Uma alíquota das PBMCs (10⁶ cel/ml) marcadas com CD4-FITC foi centrifugada por 8min a

900xg a 18°C em solução tamponada de fosfato, após, desprezar o sobrenadante. Em seguida, adicionamos 1ml de etanol a 70% e incubamos por 1h. Após, lavou-se duas vezes com solução tamponada de fosfato PBS 1x. A seguir, foi adicionado 5.0µl de RNase A, livre de DNase a 250 µg/ml (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, Indianápolis, EUA) preparado em solução tamponada de fosfato com 10mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, Gibco). As células foram incubadas por 15min a 37°C. Após, foi adicionado 5.0µl de solução corante de iodeto de propídio (PI-Sigma Chemical CO., Daint Louis, Montana, EUA) a 100 µg/ml em solução tamponada de fosfato, suplementado com 0,1% de Nonidet P-40 (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, EUA) e 0,1% de azida de sódio (Sigma), seguida de incubação por 15min a 4°C. Por fim, resuspendemos em 400µl de solução tampão PBS 1x. As amostras estavam prontas para análise por citometria de fluxo.

03- Estudo do ciclo celular por Citometria de Fluxo.

As PBMCs marcadas com iodeto de propídio foram analisadas em citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). O citômetro é acoplado ao microcomputador Machintosh Power PC modelo 7300/200 (Apple Computer INC., Cupertino, Califórnia, EUA), que permite o controle da aquisição dos parâmetros para cada evento, com armazenamento de dados em disco rígido. Na aquisição das amostras para o estudo do ciclo celular é utilizado o programa CellQuest (BD Biosciences), de acordo com as padronizações preconizadas pelo fabricante. Para o estudo do ciclo celular da população de células T CD4+, foram adquiridos 20.000 eventos (cada evento corresponde a uma célula da população selecionada) em cada análise. E para a análise das aquisições foi utilizado o programa ModFit LT (Verity Software House, Topsham, Memphis, EUA). Seguindo as padronizações preconizadas pelo fabricante. De acordo com a quantidade de DNA intracelular marcado com PI, é possível determinar a frequência de células nas fases G₀-G₁, S e G₂ do ciclo celular.

04- Estudo da Ativação Celular por Citometria de Fluxo.

Após as 72h de cultura, as alíquotas celulares foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 RPMs, o sobrenadante foi desprezado. A seguir, acrescentou-se 5µl de CD38-FITC e 5µl de mlgG1-FITC. As células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz.

Após, acrescentou-se 2 mL de tampão PBS 1x e centrifugamos por 5 minutos a 700 RPMs. x

A essa solução adiciona-se 5µl do DNA extraído completando um volume final de 50µl. A reação é incubada em um termociclador (Perkin-Elmer, ABI, Foster City, CA, EUA) e aquecida por 10 minutos a 94°C. Após o aquecimento seguirão 35 ciclos consistindo de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Ao término dos 35 ciclos é implementada uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos. A primeira etapa da reação é então concluída.

2)- Para a segunda etapa, transferimos 5µl do produto amplificado na primeira reação para microtubos com uma solução idêntica a acima descrita mas, adicionando desta vez 0.4µM de cada um dos iniciadores (primers) *internos* Kozal-1 e Kozal-2:

“Primers”	Posição (HXB2)	Seqüência
Kozal – 1	2147 – 2166	5´- cag agc caa cag ccc cac ca - 3´
Kozal – 2	5745 – 5776	5´- ttt ccc cac taa ctt ctg tat gtc ctt gac a - 3´

As condições físicas para esta reação serão as mesmas descritas na primeira etapa.

03- Geração dos clones virais para sequenciamento.

O DNA viral obtido das células infectadas foi submetido à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando a técnica de diluição limitante final, também conhecida como “end point PCR”, para que ocorra a amplificação das seqüências virais das moléculas de DNA alvo e possamos obter clones de produto de PCR, ou seja, cada seqüência obtida representaria o produto de amplificação a partir de uma única molécula de DNA proviral. Para tanto, 5,0µl do DNA foi adicionado em 1,0ml de “master mix” (a mistura contém: H₂O MilliQ, tampão Mg 1X, MgCl₂ a 1.5nM, primers a 0,2 µM, dNTP´s a 0.2 mM e enzima Taq DNA polimerase) a 0.5 U, previamente preparado. A PCR em seguida é misturada e distribuída em 20 tubos de 0,5µl (50µl em cada tubo), e estes foram submetidos a uma reação de PCR em duas etapas (*nested PCR*). Por fim, aplicamos as amostras em gel de agarose e realizamos uma corrida eletroforética. De acordo com a distribuição de Poisson, para que a reação seja válida sua positividade não deve ultrapassar 25%, ou seja, no máximo 5 amostras positivas em 20 reações. Se em uma reação houver 4 amostras positivas todas são consideradas clones de produto de PCR. Caso haja 7 amostras positivas é possível que em um ou mais tubos a

amplificação tenha sido iniciada a partir de mais de uma molécula de DNA, e desta forma os produtos de PCR desta reação são descartados.

04- Detecção dos Produtos Amplificados.

Após a PCR, as amostras de DNA amplificadas são separadas em gel de agarose 1,5% peso/volume em Tris-borato/EDTA (TBE) 0,5x (0,89M Tris; 0,89M Ácido Bórico e 0,02M de EDTA ph 8,0), contendo brometo de etídio (0,5µg/ml). A corrida acontece em tampão TBE 0,5x, por 40min. A 100 Volts. O marcador padrão, utilizado para a comparação do tamanho molecular dos fragmentos amplificados é o de 100 pares de base (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, EUA). O gel é visualizado e fotografado sob iluminação ultravioleta (UV 320nm), utilizando câmera digital DC 40 (Kodak, Rochester, NY, EUA). Os produtos do *nested* PCR são purificados utilizando-se o Kit QI Aquick PCR (Qiagen, EUA), seguindo as especificações do fabricante.

05- Reação de Sequenciamento para estudo da Variabilidade genética do HIV-1

Os produtos purificados na reação de PCR *nested* da região da transcriptase reversa do gene *pol*, foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de Sanger, utilizando o Kit ABI PRISM DyeTerminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit-with Ampli Taq DNA Polymerase (ABI, EUA) seguindo as especificações do fabricante.

Os produtos gerados nesta reação foram seqüenciados e analisados por um seqüenciador automático modelo ABI 3100 (ABI-Perkin-Elmer, EUA). O sequenciamento é determinado bi-direcionalmente, usando-se um conjunto de primers internos, F-1, F-2, DP-10 e Dp-11:

“Primers”	Posição (HXB2)	Seqüência
F - 1	2519 - 2539	5´- gtt gac tca gat tgg ttg cac - 3´
F - 2	3301 - 3321	5´- gta tgt cat tga cag tcc agc - 3´
DP - 10	2198 - 2223	5´- taa ctc cct ctc aga agc agg agc cg- 3´
Kozal - 1	2147 - 2166	5´- cag agc caa cag ccc cac ca - 3´

06- Alinhamento das seqüências:

As seqüências geradas foram analisadas e comparadas com a seqüência referencia do genoma do HIV-1 BZ167, disponível no Gen Bank nº L22087, L11725. As seqüências foram alinhadas manualmente usando o programa Se-al (RAMBAUT et al., 1999).

07- Inferência Filogenética:

A construção da árvore genealógica foi feita através de um método de agrupamento (“neighbor joining”) usando uma matriz de distância baseada nas diferenças nucleotídicas entre as seqüências.

08- Estimativa das distâncias par-a-par:

As distâncias genéticas normalizadas pelo número de sítios ao longo das seqüências foram computadas par-a-par para o alinhamento composto por n seqüências de DNA de mesmo comprimento. Para tanto usamos o modelo de Jukes e Cantor que assume probabilidades idênticas para todas as substituições de nucleotídeos. Essas estimativas e a construção dos gráficos foram feitas usando o programa MatLab®.

*09- Confirmação da seqüência genômica da região **pol** do isolado do HIV-1 BZ167, no inóculo inicial da infecção e caracterização da presença de inóculo homogêneo pré-infecção:*

Embora o isolado brasileiro de HIV-1 BZ167, adquirido através do banco de reagentes do NIH (*National Institute of Health - USA*), possua sua seqüência genômica completamente descrita (número de acesso no *Gen Bank* AY173956), a confirmação da constituição nucleotídica da região *pol* deste isolado na pré-infecção tornou-se essencial para garantir os dados gerados neste trabalho. Para tanto, realizou-se o sequenciamento do fragmento de 1.6 Kb de *pol*, a qual inclui as regiões da protease e transcriptase reversa.

Para este procedimento utilizou-se o sistema ViroSeq™ 2.0 (Applied Biosystems, Foster City – CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Este sistema inclui kit de extração de

RNA, Kit de amplificação RT-PCR, kit de sequenciamento e software de edição. Para o sequenciamento do fragmento de 1.6 Kb, o sistema utiliza sete reações separadas com terminadores marcados fluorescentemente 0 1 Tzg dye 1.72]Tyor vers de ementeBDC BT

RESULTADOS

Retiramos uma bolsa de sangue junto ao Banco de Sangue do Hospital São Paulo para obtenção das células mononucleares de sangue periférico PBMCs. A técnica empregada foi a de separação celular por gradiente de densidade Ficoll-hepaque D=1077 (Organon Teknika), descrita acima.

Após a separação celular, contamos as células e recuperamos um total de $2,2 \times 10^7$ cel/ml. As células foram divididas em alíquotas de 10^6 cel/ml e uma alíquota de 10^7 cel/ml. Em seguida, colocadas em garrafas de 25 ml e placas de cultura por 72 horas, em estufa a 37°C com 5% CO_2 .

O protocolo foi adequado satisfatoriamente, o que nos permitiu iniciar os primeiros experimentos de cultura celular.

Terceiro experimento conduzido no laboratório NB-III:

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o protocolo de separação celular e preparar as células para a primeira análise de ciclo celular por citometria de fluxo.

Retiramos uma bolsa de sangue junto ao Banco de Sangue do Hospital São Paulo para obtenção das células mononucleares de sangue periférico PBMCs. A técnica empregada foi a de separação celular por gradiente de densidade Ficoll-hepaque D=1077 (Organon Teknika), descrita acima.

Após a separação celular, contamos as células e recuperamos um total de $1,8 \times 10^7$ cel/ml. As células foram divididas em alíquotas de 10^6 cel/ml e colocadas em placas de cultura celular nas seguintes condições:

Condição 1:	Células (10^6 cel/ml) + Meio RPMI 1640
Condição 2:	Células (10^6 cel/ml) + Meio RPMI 1640, acrescido de 10% de SFB + Fitohemaglutinina

As células foram colocadas em cultura por 48 horas. A análise de ciclo celular não foi realizada neste experimento. Porém, foram observados em microscópio a presença de linfócitos em crescimento (blastos).

Quarto experimento conduzido no laboratório NB-III:

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o protocolo de separação celular e preparar as células para a segunda análise de ciclo celular por citometria de fluxo.

Retiramos uma bolsa de sangue junto ao Banco de Sangue do Hospital São Paulo para obtenção das células mononucleares de sangue periférico PBMCs. A técnica empregada foi a de separação celular por gradiente de densidade Ficoll-hepaeque D=1077 (Organon Teknika), descrita acima.

Após a separação celular, contamos as células e recuperamos um total de $7,3 \times 10^7$ cel/ml. As células foram divididas em alíquotas de 10^6 cel/ml e colocadas em placas de cultura celular nas seguintes condições:

Condição 1: Célula + RPMI – incubadas por 72h

Condição 2: Célula + RPMI acrescido de 10% SFB – incubadas por 72h.

Condição 3: Célula + RPMI acrescido de 10% SFB + Fitohemaglutinina – incubadas por 72h.

Condição 4: Célula + RPMI acrescido de 10% SFB + Fitohemaglutinina + Interleucina 2 – incubadas por 72h.

Condição 5: Célula + RPMI acrescido de 10% SBF, adicionamos fitohemaglutinina e incubamos por 30 minutos. Após, lavamos as células e resuspendemos em meio RPMI + 10% SFB e incubamos as células por 72h.

Condição 6: Célula + RPMI acrescido de 10% SFB, adicionamos fitohemaglutinina e incubamos por 30 minutos. Após, lavamos as células e resuspendemos em meio RPMI + 10% SFB e adicionamos Interleucina 2 e incubamos as células por 72h.

Após o período de cultura, uma alíquota de 10^6 cel/ml foi retirada de cada condição, as células então foram marcadas com anticorpo monoclonal CD4 FITC e analisadas por citometria de fluxo.

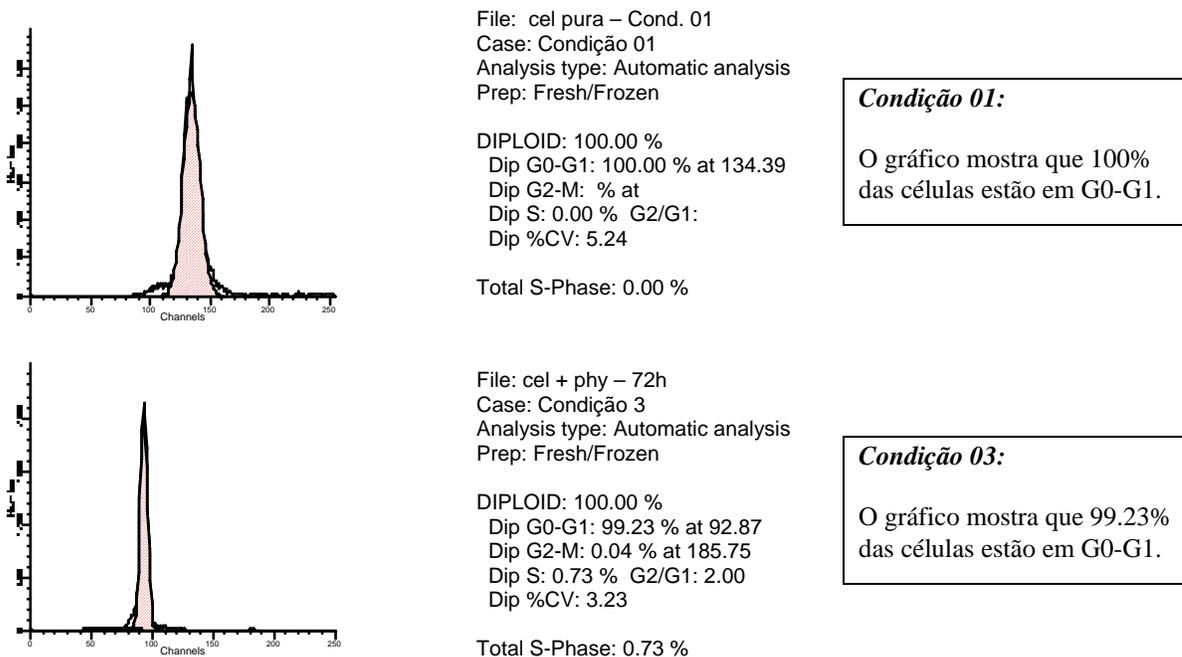
4A 2) – Análise da ativação e ciclo celular por citometria de fluxo:

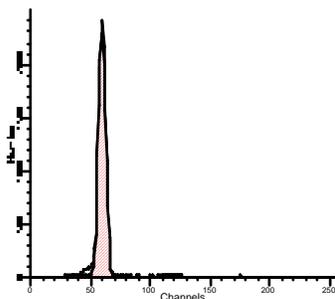
Retiramos uma alíquota de células (10^6 células/ml) de cada uma das seis condições descritas anteriormente, marcamos com anticorpo monoclonal CD4 FITC e iodeto de propídio para estudo do ciclo celular (ver item 3.B de Materiais e Métodos).

Os resultados das análises das diferentes condições de cultura mostraram não haver diferença significativa quanto às fases do ciclo celular de condição para condição.

Nesta etapa, devido a problemas metodológicos, não foi possível realizar as análises de ativação celular por citometria de fluxo. Porém observamos em microscópio a presença de linfócitos em crescimento (blastos).

Figura 02: Resultados das análises do ciclo celular por citometria de fluxo:





File: Cel + phy + IL-2 – 72h
Case: Condição 06
Analysis type: Automatic analysis
Prep: Fresh/Frozen

DIPLOID: 100.00 %
Dip G0-G1: 98.75 % at 104.78
Dip G2-M: 0.00 % at 209.57
Dip S: 1.25 % G2/G1: 2.00
Dip %CV: 4.25

Total S-Phase: 1.25 %

Condição 06:

O gráfico mostra que 98.75% das células estão em G0-G1.

Os picos nos gráficos acima indicam a fase do ciclo celular em que se encontram as células. Praticamente toda a população estudada encontra-se na mesma fase do ciclo celular.

Estes resultados serão comentados a seguir no item 4B.

4A 3) – Cultura celular infectada – Expansão das cepas virais:

Cepa HIV-1 91US054, subtipo B.

Este experimento teve como objetivo gerar sobrenadantes com partículas virais que foram utilizadas na infecção celular para obtenção de DNA proviral de acordo com o proposto no projeto.

Desenho da cultura:

- A) – Obtenção dos PBMCs, estes foram ativados por 72h;
- B) – Após as 72h adicionamos os vírus para infecção celular;
- C) – Primeira coleta: 04 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes);
- D) – Segunda coleta: 08 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes);
- E) – Terceira coleta: 12 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes);
- F) – Quarta coleta: 16 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes).

Quantificação de HIV-1 p24 da cultura viral, cepa HIV-1 91US054, subtipo B:

a)- CN: controle negativo:

A absorbância deve ser: $>0,040$ e $\leq 0,130$

b)- CP: controle positivo:

A absorbância deve ser $\geq 0,700$ na concentração de 80 pg/ml de p24.

c)- Cut-off do ensaio:

Calculado somando a média das absorbâncias do CN + 0,070 (orientação do fabricante).

d)- Os controles positivos são preparados seguindo diluições seriadas que correspondem as seguintes concentrações de HIV-1p24:

CP 1: 80 pg/ml; CP 2: 40 pg/ml; CP 3: 20 pg/ml; CP 4: 10 pg/ml; CP 5: 05 pg/ml.

e)- Para a quantificação de HIV-1p24, as amostras foram diluídas da seguinte forma:

Diluição 1:100 = Amostras 1 a 4; Diluição 1:1.000 = Amostras 5 a 8.

Resultado da quantificação (em absorbância):

CN 1: 0,068	Amostra 1: 0,090	Amostra 5: 0,078	CP 1: 1,295
CN 2: 0,056	Amostra 2: 0,085	Amostra 6: 0,075	CP 2: 0,712
CN 3: 0,056	Amostra 3: 0,076	Amostra 7: 0,080	CP 3: 0,341
	Amostra 4: 0,079	Amostra 8: 0,077	CP 4: 0,155
			CP 5: 0,112

Cut-off do ensaio:

$$0,062 + 0,070 = 0,132$$

OBS: O ensaio atendeu aos parâmetros de validação dos controles, porém os resultados das absorbâncias das amostras não foram satisfatórios. Esta cepa viral não foi utilizada.

Esta cepa viral mostrou baixo desempenho em cultura e sua utilização em nossos experimentos foi descartada.

Cepa HIV-1 BZ 167, subtipo B:

Este experimento tem como objetivo gerar sobrenadantes com partículas virais que serão utilizadas na infecção celular para obtenção de DNA proviral de acordo com o proposto no projeto.

Desenho da cultura:

- G) – Obtenção dos PBMCs, estes foram ativados por 72h;
- H) – Após as 72h adicionamos os vírus para infecção celular;
- I) – Primeira coleta: 05 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes);
- J) – Segunda coleta: 09 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes);
- K) – Terceira coleta: 12 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes);
- L) – Quarta coleta: 16 dias após a infecção (realimentação com PBMC ativado 3 dias antes).

Quantificação de HIV-1 p24 da cultura viral, cepa HIV-1 BZ 167, subtipo B:

a)- CN: controle negativo:

A absorvância de ser: $>0,040$ e $\leq 0,130$

b)- CP: controle positivo:

A absorvância de ser $\geq 0,700$ na concentração de 80 pg/ml de p24.

c)- Cut-off do ensaio:

Calculado somando a média das absorvâncias do CN + 0,070 (orientação do fabricante).

d)- Os controles positivos são preparados seguindo diluições seriadas que correspondem as seguintes concentrações de HIV-1p24:

CP 1: 80 pg/ml; CP 2: 40 pg/ml; CP 3: 20 pg/ml; CP 4: 10 pg/ml; CP 5: 05 pg/ml.

e)- Para a quantificação de HIV-1p24, as amostras foram diluídas da seguinte forma:

Diluição 1:100 = Amostras 1 a 4; Diluição 1:1.000 = Amostras 5 a 8.

Resultado da quantificação (em absorbância):

CN 1: 0,071	Amostra 1: 0,402	Amostra 5: 0,109	CP 1: 1,335
CN 2: 0,071	Amostra 2: 1,921	Amostra 6: 0,270	CP 2: 0,741
CN 3: 0,067	Amostra 3: 0,948	Amostra 7: 0,175	CP 3: 0,372
	Amostra 4: 0,354	Amostra 8: 0,102	CP 4: 0,188
			CP 5: 0,125

Cut-off do ensaio:

$$0,069 + 0,070 = \mathbf{0,139}$$

OBS: O ensaio atendeu aos parâmetros de validação dos controles.

As absorbâncias das amostras foram consideradas válidas, assim, procedemos à conversão dos valores de absorbância para valores em concentração de pg/ml.

Antes das conversões, subtraímos o valor do cut-off do valor de cada amostra, incluindo os controles, para correção dos mesmos.

Subtração do Cut-off do valor obtido em cada amostra:

Amostra 1: $0,402 - 0,139 = \mathbf{0,263}$	Amostra 5: $0,109 - 0,139 = \mathbf{-0,030}$
Amostra 2: $1,921 - 0,139 = \mathbf{1,782}$	Amostra 6: $0,270 - 0,139 = \mathbf{0,131}$
Amostra 3: $0,948 - 0,139 = \mathbf{0,809}$	Amostra 7: $0,175 - 0,139 = \mathbf{0,036}$
Amostra 4: $0,354 - 0,139 = \mathbf{0,215}$	Amostra 8: $0,102 - 0,139 = \mathbf{-0,037}$

Conversão de absorbância para concentração em pg/ml de HIV-1p24 – BZ167:

Para converter o valor de absorbância em pg/ml, utilizamos a seguinte fórmula matemática (regra de 3 simples):

Absorbância do Controle Positivo ----- Concentração de p24 do Controle Positivo

Absorbância da Amostra ----- X – concentração de p24

Exemplo:

Abs. CP – 1.196 ----- Conc. P24 CP – 80pg/ml

Abs. Amostra 0,263 ----- X pg/ml

X= $\frac{0,263 \times 80}{1.196}$ X=17,60 pg/ml

1.196

Amostra 1: 0,263 = **17,60 pg/ml**

Amostra 5: -0,030 = inválida

Amostra 2: 1,782 = **119,20 pg/ml**

Amostra 6: 0,131 = **8,76 pg/ml**

Amostra 3: 0,809 = **54,11 pg/ml**

Amostra 7: 0,036 = **2,40 pg/ml**

Amostra 4: 0,215 = **14,28 pg/ml**

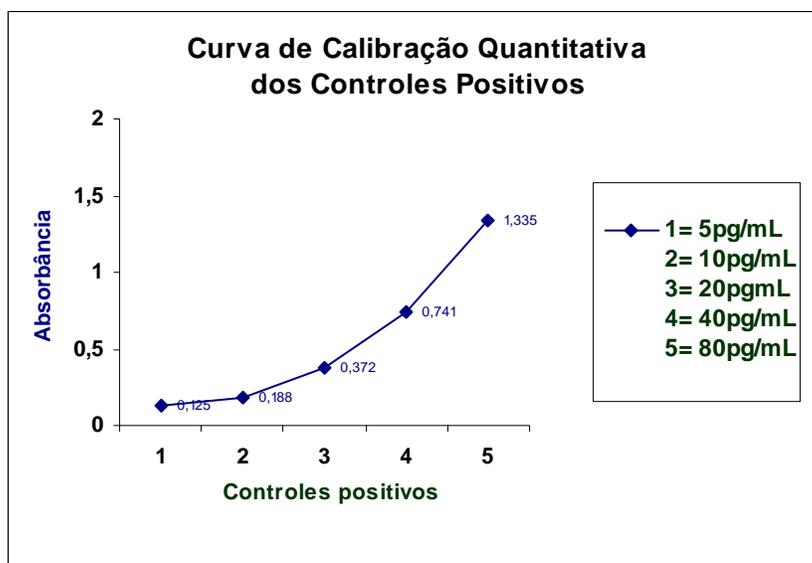
Amostra 8: -0,037 = inválida

OBS: As amostras com valores corrigidos negativos, foram consideradas inválidas.

O ensaio atendeu aos parâmetros de validação dos controles, os resultados das absorbâncias das amostras foi satisfatório. Por apresentar melhor desempenho o vírus BZ167 (sobrenadante de cultura) foi escolhido para os experimentos de infecção de PBMCs.

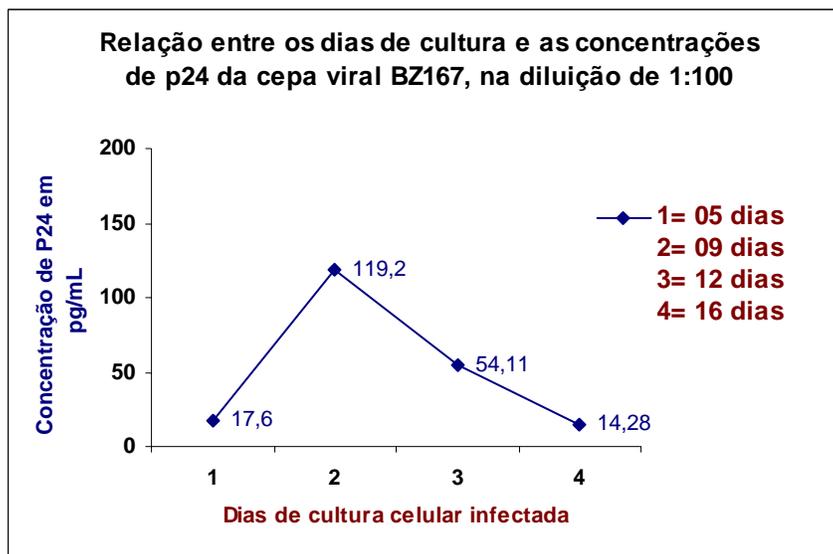
Gráficos dos resultados de cultura viral da cepa BZ167:

Gráfico 01: Curva de calibração quantitativa dos controles positivos.



O gráfico da curva de calibração dos controles positivos mostra os valores de p24 em absorbância de cada controle positivo em diferentes concentrações. Os valores em absorbância foram convertidos para pg/ml (descrito acima).

Gráfico 02: Relação entre os dias de cultura e as concentrações de p24 da cepa viral BZ167.



O gráfico mostra as concentrações de p24 em pg/ml nos sobrenadantes da cultura, em diferentes pontos de coleta. Observamos que a maior concentração corresponde ao segundo ponto de coleta no nono dia de cultura.

4A 4) – Ensaio de Cultura Celular Infectada: BZ167 x PBMCs:

Após a realização dos experimentos prévios para seleção da cepa viral a ser utilizada e das condições de cultura, realizamos o experimento para geração de DNA proviral. As PBMCs utilizadas neste ensaio foram obtidas de bolsas de sangue retiradas junto ao Banco de Sangue do Hospital São Paulo. Utilizamos o sobrenadante viral gerado após 09 dias de cultura com concentração de proteína p24 igual a 119,2 pg/ml da cepa BZ167.

Nos resultados das análises do ciclo celular não observamos diferença significativa das fases do ciclo entre as seis condições. Isso pode ser explicado em virtude de estarmos utilizando uma população mista e que, os diferentes tipos celulares que compõe esta população poderiam estar em momentos distintos do ciclo celular e nossa metodologia pode não ter sido eficiente na tentativa de estabelecer o momento exato em que os linfócitos T CD4+ (alvo do estudo de ciclo celular)

encontravam-se em relação ao ciclo, portanto, não foi possível sincronizar as culturas por limitações técnicas.

E ainda, por não ter sido possível realizar o ensaio para avaliar a ativação celular, decidimos abandonar a abordagem da caracterização dos estados do ciclo celular e nos embasarmos no trabalho de Janini et al 2001, descrevendo que as células plenamente ativadas (depois de estimuladas com fitohemaglutinina por 72h) constituem um panorama favorável para a replicação viral comparado com células não ativadas. Consideramos empiricamente que as células em repouso encontram-se fora de ciclo, que as células ativadas no momento da infecção encontram-se em um momento pré-ciclo e que as células ativadas 72h antes da infecção encontram-se plenamente ativadas e em ciclo, assim, desenhamos nosso experimento com apenas três condições distintas de infecção das PBMCs para geração de genomas pró-virais e posterior análise molecular.

As condições de infecção e cultura são as seguintes:

CONDIÇÃO 1: Uma alíquota de $1,0 \times 10^6$ cel/ml, sem ativação com uso de fitohemaglutinina, ou seja, em repouso (fora de ciclo), foi infectada com o vírus BZ167. As células permaneceram em contato com o vírus por duas horas, em seguida foram lavadas duas vezes com tampão TBE e colocadas em meio RPMI+10%SFB+IL-2 e mantidas em cultura por 48h. Após as 48h, o DNA proviral foi extraído para a realização do PCR-*end point* com objetivo de produzir clones que foram posteriormente seqüenciados e analisados quanto aos processos mutacionais presentes ou não nessas seqüências. A viabilidade das PBMCs no momento da infecção era de 93%.

CONDIÇÃO 2: Uma alíquota de $1,0 \times 10^6$ cel/ml, foi ativada com fitohemaglutinina concomitantemente a infecção com o vírus BZ167 (células pré-ciclo). As células permaneceram em contato com o vírus por duas horas, em seguida foram lavadas duas vezes com tampão TBE e colocadas em meio RPMI+10%SFB+IL-2 e mantidas em cultura por 48h. Após as 48h, o DNA proviral foi extraído para a realização do PCR-*end point* com objetivo de produzir clones que foram posteriormente seqüenciados e analisados quanto aos processos mutacionais presentes ou não nessas seqüências. A viabilidade das PBMCs no momento da infecção era de 93%.

CONDIÇÃO 3: Uma alíquota de $1,0 \times 10^6$ cel/ml, foi ativada com fitohemaglutinina e mantida em cultura por 72h,. Após este período as células, plenamente ativadas (em ciclo), foram infectadas com o vírus BZ167. As células permaneceram em contato com o vírus por duas horas, em seguida foram lavadas duas vezes com tampão TBE e colocadas em meio RPMI+10%SFB+IL-2 e mantidas em cultura por 48h. Após as 48h, o DNA proviral foi extraído para a realização do PCR-*end point* com objetivo de produzir clones que foram posteriormente seqüenciados e analisados quando aos processos mutacionais presentes ou não nessas seqüências. A viabilidade das PBMCs no momento em que foram colocadas em cultura por 72h na presença de fitohemaglutinina era de 93%, e após as 72h, no momento antes da infecção era de 89%.

As condições do ensaio estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 1: Condições de cultura.

Condição 1	PBMC + RPMI (retirar alíquota p/ análise de ativação celular) – infecção viral – incubar por 2h, lavar e resuspender em meio RPMI 10% SFB + IL-2, incubar por 48h.
Condição 2	PBMC + RPMI 10% SFB + phy (retirar alíquotas p/ análise de ativação celular) – infecção viral – incubar por 2h, lavar e resuspender em meio RPMI 10% SFB + IL-2, incubar por 48h.
Condição 3	PBMC + RPMI 10% SFB + phy, incubar por 72h. Após, retirar alíquota p/ análise ativação celular – infecção viral – incubar por 2h, lavar e resuspender em meio RPMI 10% SFB + IL-2, incubar por 48h.

Resultados II:

4B)- Geração de clones a partir do DNA proviral - PCR end point:

O DNA proviral obtido das células infectadas em cultura foi submetido à técnica de PCR de diluição limitante “end point” para obtenção dos clones representativos de cada uma das três condições de cultura, para que, então estes clones fossem sequenciados e analisados.

Condição 1: Para esta condição, foram necessárias onze reações de PCR end point para obtenção dos clones. Destas onze, em seis PCRs obtivemos clones, num total de 19 clones (ver critério para validação de PCR end point no item 3C-02 de Materiais e Métodos).

Condição 2: Para esta condição, foram necessárias treze reações de PCR end point para obtenção dos clones. Destas treze, em oito PCRs obtivemos clones, num total de 18 clones.

Condição 3: Para esta condição, foram necessárias onze reações de PCR end point para obtenção dos clones. Destas onze, em seis obtivemos clones, num total de 20 clones.

A próxima etapa foi realizar o sequenciamento dos clones.

4C)- Sequenciamento do inóculo viral:

Antes de sequenciarmos os clones, nós realizamos o sequenciamento do vírus BZ167 para garantirmos que nosso inóculo viral era homogêneo e assim descartar a possibilidade de que, na ocorrência de variação genética, esta não seria por diferenças entre o inóculo viral e o produto da cultura. Comparamos nossa seqüência com a disponível em bancos de dados.

O resultado da confirmação da seqüência genômica da região *pol* do isolado de HIV-1 BZ167 no inóculo inicial da infecção, mostrou que as bancos de daf1

Gen Bank (AY173956). A triplicata deste experimento não demonstrou qualquer variação genética neste inóculo.

4D)- Sequenciamento dos clones gerados em cultura:

Os 57 clones (três condições) obtidos na reação de PCR end point do gene *pol*, região da transcriptase reversa, foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de Sanger. Os produtos gerados nesta reação foram alinhados e editados manualmente.

As seqüências da região *pol* de cada um dos 57 clones (todas as condições), foram alinhadas e comparadas com a seqüência referencia da região *pol* do isolado de HIV-1 BZ167 descrita no GeneBank (AY173956).

CONDIÇÃO 1: Após o alinhamento, foram descartados 05 dos 19 clones analisados, por apresentarem em suas seqüências regiões de ambigüidade entre nucleotídeos, o que sugere ser um DNA proviral misto, não proveniente de uma única seqüência alvo, portanto não considerados clone.

CONDIÇÃO 2: Foram descartados 03 dos 18 clones, por apresentarem em suas seqüências regiões de ambigüidade entre nucleotídeos, o que sugere ser um DNA proviral misto, não proveniente de uma única seqüência alvo, portanto não considerado clone.

CONDIÇÃO 3: Foram descartados 03 dos 20 clones, por apresentarem em suas seqüências regiões de ambigüidade entre nucleotídeos, o que sugere ser um DNA proviral misto, não proveniente de uma única seqüência alvo, portanto não considerado clone.

4E)- Identificação das substituições presentes nas seqüências:

Após o sequenciamento, alinhamento e edição das seqüências, analisamos cada clone de cada condição em comparação com a seqüência do BZ167 a fim de identificar os pontos onde ocorreram substituições de nucleotídeos para que em seguida possa ser caracterizada o tipo de

substituição e se há ou não presença de hipermutação. Esta análise foi realizada manualmente comparando clone a clone com o BZ167. Segue abaixo os resultados e a seguir a identificação das posições onde ocorreram as substituições em cada clone.

CONDIÇÃO 01: 14 clones analisados:

Encontramos 78 substituições sendo que, 98,72% foram de transição e 1,28% de transversão:

75,74%	= G para A	59 substituições	
12,82%	= A para G	10 substituições	
07,70%	= C para T	05 substituições	
02,56%	= T para C	02 substituições	
01,28%	= T para G	01 substituição	

A taxa mutacional observada ente os clones variou de $1,0 \times 10^{-3}$ a $2,1 \times 10^{-2}$:

clone 01:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 02:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 05:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	
clone 06:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	
clone 07:	$7,6 \times 10^{-3}$	08 substituições	Clone Hipermutado.
clone 08:	$5,7 \times 10^{-3}$	06 substituições	
clone 09:	$2,1 \times 10^{-2}$	22 substituições	Clone Hipermutado.
clone 10:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	Clone Hipermutado.
clone 11:	$1,1 \times 10^{-3}$	01 substituição	
clone 13:	$7,6 \times 10^{-3}$	08 substituições	
clone 15:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	
clone 16:	$4,8 \times 10^{-3}$	05 substituições	
clone 18:	$4,8 \times 10^{-3}$	05 substituições	Clone Hipermutado.
clone 19:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	

CONDIÇÃO 02: 15 clones analisados:

Encontramos 80 substituições sendo que, 95,0% foram de transição e 5,0% de transversão:

61,25%	= G para A	49 substituições	
16,25%	= T para C	13 substituições	
12,50%	= A para G	10 substituições	
05,00%	= C para T	04 substituições	
03,75%	= T para A	03 substituições	
01,25%	= C para A	01 substituições	

A taxa mutacional observada entre os clones variou de $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$:

clone 01:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições.	
clone 02:	$6,7 \times 10^{-3}$	07 substituições	
clone 05:	$6,7 \times 10^{-3}$	07 substituições	
clone 06:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 07:	$4,8 \times 10^{-3}$	05 substituições	
clone 08:	$8,6 \times 10^{-3}$	09 substituições	Clone Hipermutado.
clone 09:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 10:	$5,7 \times 10^{-3}$	06 substituições	Clone Hipermutado.
clone 11:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituição	
clone 12:	$1,0 \times 10^{-2}$	11 substituições	
clone 13:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 15:	$7,6 \times 10^{-3}$	08 substituições	Clone Hipermutado.
clone 16:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 17:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	
clone 18:	$1,0 \times 10^{-3}$	01 substituições	

CONDIÇÃO 03: 17 clones analisados:

Encontramos 99 substituições sendo que, 96,97% de transição e 3,03% de transversão:

69,705%	= G para A	69 substituições	
11,12%	= A para G	11 substituições	
11,12%	= C para T	11 substituições	
05,05%	= T para C	05 substituições	
02,02%	= A para C	02 substituições	
01,01%	= T para A	01 substituição	

A taxa mutacional observada entre os clones variou de $2,8 \times 10^{-3}$ a $1,1 \times 10^{-2}$:

clone 01:	$9,5 \times 10^{-3}$	10 substituições	Clone Hipermutado.
clone 02:	$4,8 \times 10^{-3}$	05 substituições	Clone Hipermutado.
clone 03:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 04:	$5,7 \times 10^{-3}$	06 substituições	
clone 05:	$6,7 \times 10^{-3}$	07 substituições	
clone 06:	$4,8 \times 10^{-3}$	05 substituições	
clone 07:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	
clone 08:	$2,8 \times 10^{-3}$	03 substituições	
clone 09:	$5,7 \times 10^{-3}$	06 substituição	
clone 10:	$6,7 \times 10^{-3}$	07 substituições	
clone 11:	$1,1 \times 10^{-2}$	12 substituições	Clone Hipermutado.
clone 12:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 14:	$4,8 \times 10^{-3}$	05 substituições	
clone 16:	$6,7 \times 10^{-3}$	07 substituições	
clone 17:	$3,8 \times 10^{-3}$	04 substituições	
clone 18:	$5,7 \times 10^{-3}$	06 substituições	Clone Hipermutado.
clone 20:	$4,8 \times 10^{-3}$	05 substituições	

Identificação das posições onde ocorreram substituições em cada clone:

CONDIÇÃO 1: 14 clones analisados:

Clone 01:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
763	G	A	A G A - A A A
915	G	A	A G C - A A C
983 / 984	GG	AA	G G G C - G A A C
1.062	A	G	A A A - A G A

Clone 02:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
763	G	A	A G A - A A A
915	G	A	A G C - A A C
983 / 984	GG	AA	G G G C - G A A C
1.062	A	G	A A A - A G A

Clone 05:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
896	G	A	A G C - A A C
964 / 965	GG	AA	G G G C - G A A C
1.043	A	G	A A A - A G A

Clone 06:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
912	G	A	A G C - A A C
980 / 981	GG	AA	G G G C - G A A C
1.059	A	G	A A A - A G A

Clone 07: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
342	G	A	A G A - A A A
509	G	A	G G A - G A G
604	G	A	T G G - T A G
625	G	A	A G A - A A A
746	G	A	A G A - A A A
898	G	A	A G C - A A C
966 / 967	G	AA	G G G C - G A A C
1.048	G	A	A G G - A A G

Clone 08:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
344	C	T	T C T - T T T
743	G	A	A G A - A A A
895	G	A	A G C - A A C
963 / 964	GG	AA	G G G C - G A A C
1.042	A	G	A A A - A G A
1.045	G	A	A G G - A A G

Clone 10: Hipermutado

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
553	G	A	T G A - T A A
915	G	A	A G C - A A C
1.065	G	A	A G G - A A G

Clone 09: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
159	G	A	AGG-AAG
241	G	A	AGG-AAG
245	G	A	GGA-GAA
297	C	T	TCT-TTT
342	G	A	CGG-CAG
355	G	A	TGG-TAG
364	C	T	TCT-TTT
445	G	A	GGA-GAA
453	A	G	CAA-CGA
525	G	A	AGG-AAG
529	G	A	AGG-AAG
544	A	G	AAT-AGT
608	G	A	TGG-TAG
621	G	A	TGG-TAG
659	G	A	TGG-TAG
673	G	A	AGG-AAG
915	G	A	AGC-AAC
948	G	A	TGG-TAG
1.031 / 1.032	GG	A	TGGG-TAAG
1.065	G	A	AGG-AAG
1.086	G	A	TGG-TAG
1.130	T	G	GT-GG

Clone 11:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
921	G	A	AGA-AAA

Clone 15:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
741	G	A	AGA-AAA
903	G	A	AGA-AAA
1.040	A	G	AAA-AGA

Clone 13:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
297	C	T	TCT-TTT
364	C	T	TCT-TTT
369	G	A	TGA-TAA
453	A	G	CAC-CGC
529	G	A	AGG-AAG
741	T	C	ATT-ACT
915	G	A	AGC-AAC
1.065	G	A	AGG-AAG

Clone 16:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
549	C	T	TCC-TTG
740	G	A	AGA-AAG
893	G	A	AGC-AAC
961 / 962	GG	AA	GGGC-GAAC
1.040	A	G	AAA-AGA

Clone 18: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
595	G	A	TGG-TAG
616	G	A	AGA-AAA
737	G	A	AGA-AAA
889	G	A	AGC-AAC
957 / 958	GG	AA	GGGC-GAAC

Clone 19:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
575	C	T	ACA-ATA
719	T	C	ATT-ACT
903	G	A	AGA-AAA

CONDIÇÃO 2: 15 clones analisados:

Clone 01:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
889	G	A	A G C - A A C
957 / 958	GG	AA	G G G C - G A A C
1.036	A	G	A A A - A G A

Clone 02:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
730	A	G	T A C - T G C
751	T	C	A T T - A C T
907	C	T	T C T - T T T
925	G	A	A G C - A A C
971	G	A	T G A - T A A
997	G	A	A G C - A A C
1.075	G	A	A G G - A A G

Clone 05:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
335	C	T	T C T - T T T
478	T	A	T T T - T A T
535	C	T	C C C - C T C
706	T	C	A T G - A C A
715	T	C	T T T - T C T
886	G	A	A G C - A A C
1.036	G	A	A G G - A A G

Clone 06:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
342	C	T	T C T - T T T
741	G	A	A G A - A A A
893	G	A	A G C - A A C
1.043	G	A	A G C - A A G

Clone 07:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
507	T	A	T T T - T A T
564	C	T	A C A - A T A
744	T	C	T T T - T C T
915	G	A	A G C - A A C
1.065	G	A	A G C - A A C

Clone 08: Hipermutado

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
219	G	A	G G G - G A G
739	G	A	A G A - A A A
754	A	G	T A C - T G C
891	G	A	A G C - A A C
924	G	A	T G G - T A G
959 / 960	GG	AA	G G G C - G A A C
1.008	G	A	T G G - T A G
1.038	A	G	A A A - A G A
1.041	G	A	A G G - A A G

Clone 09:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
740	G	A	A G A - A A A
892	G	A	A G C - A A C
960 / 961	GG	AA	G G G C - G A A C
1.039	A	G	A A A - A G A

Clone 10: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
480	G	A	GGA - GAA
717	G	A	AGA - AAA
869	G	A	AGC - AAC
919	G	A	GGA - GAA
937 / 938	GG	AA	GGC - GAA C
1.116	A	G	AAA - AGA

Clone 11:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
702	G	A	AGA - AAA
854	G	A	AGC - AAC
922 / 923	GG	AA	GGC - GAA C
1.001	A	G	AAA - AGA

Clone 12:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
184	T	A	TTG - TAG
486	C	T	CCT - CTT
494	C	T	TCC - TTC
499	C	T	ACA - ATA
516	C	T	GCC - GTC
698	G	A	AGA - AAA
723	C	T	ACC - ATC
779	C	T	TCC - TTC
850	G	A	AGC - AAC
985	C	A	ACA - AAA
1.000	G	A	AGC - AAG

Clone 13:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
768	G	A	AGA - AAA
850	G	A	AGC - AAC
918 / 919	GG	AA	GGC - GAA C
997	A	G	AAA - AGA

Clone 15: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
236	C	T	TCT - TTT
303	C	T	TCT - TTT
548	G	A	GGA - GAA
702	G	A	AGA - AAA
854	G	A	AGC - AAC
864	G	A	AGA - AAA
909	G	A	TGA - TAA
945	G	A	GGA - GAA

Clone 16:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
737	G	A	AGA - AAA
889	G	A	AGC - AAC
957 / 958	GG	AA	GGC - GAA C
1.036	A	G	AAA - AGA

Clone 17:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
891	G	A	AGC - AAC
959 / 960	GG	AA	GGC - GAA C
1.038	A	G	AAA - AGA

Clone 18:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
873	G	A	AGA - AAA

CONDIÇÃO 3: 17 clones analisados:

Clone 01: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
324 / 325	GG	AA	T G G A - T A A G
333	C	T	T C T - T T T
495	G	A	G G A - G A A
729	G	A	T G A - T A A
732	G	A	A G A - A A A
880	G	A	A G A - A A A
884	G	A	A G C - A A C
952 / 953	GG	AA	G G G C - G A A C
1.031	A	G	A A A - A G A
1.034	G	A	A G G - A A G

Clone 02: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
469	G	A	A G C - A A C
478	G	A	A G A - A A A
597	G	A	T G G - T A G
901	G	A	A G A - A A A
982	G	A	G G A - G A A

Clone 03:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
741	G	A	A G A - A A A
893	G	A	A G C - A A C
961 / 962	GG	AA	G G G C - G A A C
1.040	A	G	A A A - A G A

Clone 04:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
365	C	T	T C T - T T T
742	T	C	A T T - A C T
902	G	A	A G A - A A A
916	G	A	A G C - A A C
1.012	G	A	T G A - T A A
1.066	G	A	A G G - A A G

Clone 05:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
113	A	G	A A C - A G C
122	C	T	T C G - T T G
182	T	C	A T A - A C A
352	G	A	A G A - A A A
450	G	A	A G T - A A T
908	G	A	A G C - A A C
1.058	G	A	A G G - A A G

Clone 06:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
292	C	T	T C T - T T T
359	C	T	T C T - T T T
758	G	A	A G A - A A A
910	G	A	A G C - A A C
920	G	A	A G A - A A A

Clone 07:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
461	G	A	T G A - T A A
912	G	A	A G A - A A A
971	G	A	G G C - G A C

Clone 08:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
757	G	A	A G A - A A A
909	G	A	A G C - A A C
1.059	G	A	A G G - A A G

Clone 09:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
82	A	G	A A C - A G C
91	C	T	T C G - T T G
151	T	C	A T A - A C A
443	G	A	A G A - A A A
877	G	A	A G C - A A C
1.027	G	A	A G G - A A G

Clone 10:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
187	G	A	T G A - T A A
344	C	T	T C T - T T T
497	T	A	T T T - T A T
743	G	A	A G A - A A A
895	G	A	A G C - A A C
963 / 964	GG	AA	G G G C - G A A C
1.042	A	G	A A A - A G A

Clone 11: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
180	G	A	G G G - G A G
348	A	G	G A A - G G A
490	G	A	A G A - A A A
497	G	A	T G T - T A T
609	G	A	T G G - T A G
630	G	A	A G A - A A A
657	A	G	A A T - A G T
708	A	G	T A C - T G C
864	C	T	T C C - T T C
891	G	A	A G C - A A C
903	G	A	A G C - A A C
913	G	A	A G A - A A A

Clone 12:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
753	G	A	A G A - A A A
905	G	A	A G C - A A C
973 / 974	GG	AA	G G G C - G A A C
1.052	A	G	A A A - A G A

Clone 14:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
287	T	C	C T A - C C A
351	A	C	G A T - G C T
890	G	A	A G C - A A C
958 / 959	GG	AA	G G G C - G A A C
1.037	A	G	A A A - A G A

Clone 16:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
690	A	G	T A C - T G C
710	T	C	A T T - A C T
866	C	T	T C T - T T T
884	G	A	A G C - A A C
930	G	A	T G T - T A T
956	G	A	A G C - A A C
1.034	G	A	A G G - A A G

Clone 17:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
739	G	A	A G A - A A A
891	G	A	A G C - A A C
959 / 960	GG	AA	G G G C - G A A C
1.037	A	G	A A A - A G A

Clone 18: Hipermutado.

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
597	G	A	T G A - T A A
619	G	A	A G A - A A A
739	G	A	A G A - A A A
891	G	A	A G C - A A C
959 / 960	GG	AA	G G G C - G A A C
1.041	G	A	A G G - A A G

Clone 20:

POSIÇÃO	BZ167	CLONE	SUBSTITUIÇÃO
262	C	T	T C T - T T T
329	C	T	T C T - T T T
726	G	A	A G A - A A A
890	G	A	A G A - A A A
1.052	G	A	G G G - G A G

4F) - Análise das Substituições:

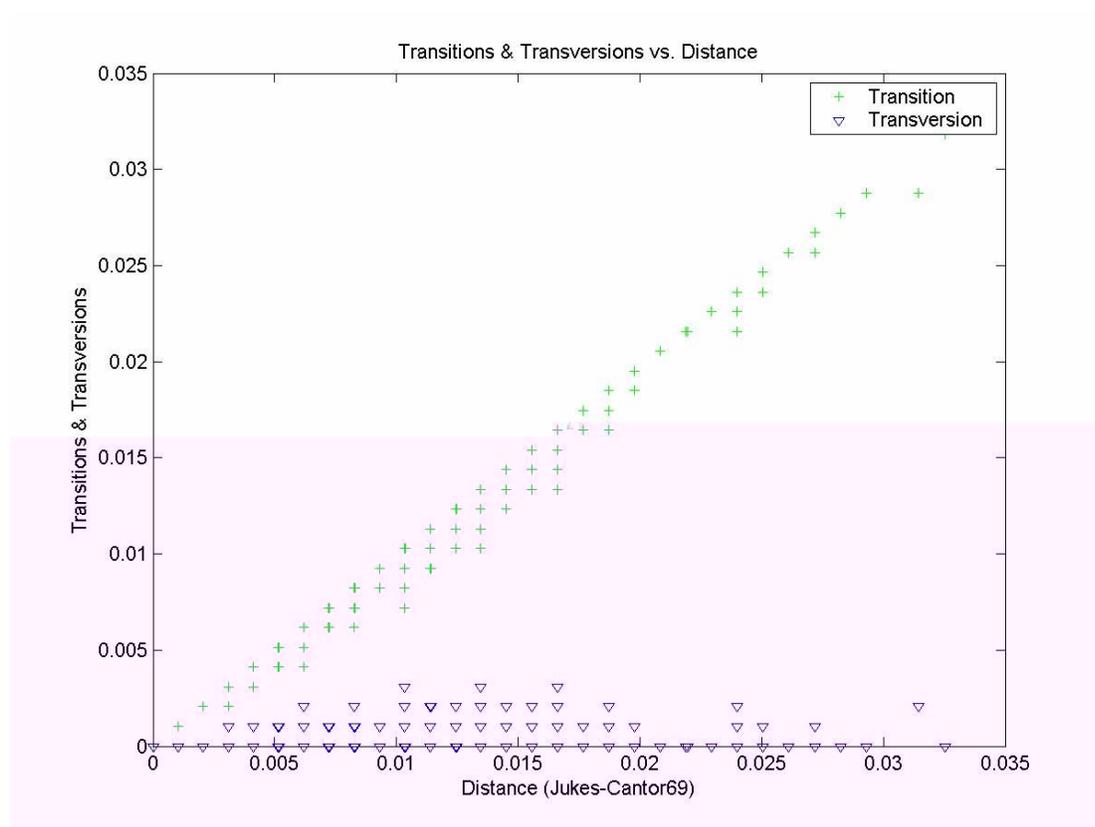
Após identificar os pontos de substituições de nucleotídeos ao longo das seqüências analisadas, realizamos uma análise estatística para identificar qual evento de substituição é mais frequente e que relações são possíveis.

Evento de *Transição*: Substituições entre as bases púricas: A-G, ou G-A

Evento de *Transição*: Substituições entre as bases pirimidínicas: T-C ou C-T

Evento de *Transversão*: Substituições entre as bases púricas e pirimidínicas: G-T, ou T-G, C-A ou A-C, C-G ou G-C, T-A ou A-T.

Gráfico 03: Relação entre Transição e Transversão:



O gráfico mostra que as substituições nucleotídicas de transição são mais frequentes comparando as de transversão, na análise par-a-par das seqüências nucleotídicas, e são mais frequentes à medida que a distância genética aumenta (modelo de Jukes Cantor).

4G) - Alinhamentos gerados a partir das seqüências nucleotídicas:

As seqüências nucleotídicas dos clones foram divididas em três grupos representativos de cada condição da cultura. Em seguida, cada grupo de seqüências foi alinhado e comparado com a seqüência referencia do BZ167.

Os resultados destes alinhamentos poderão ser vistos nos anexos 1, 2 e3. Nos alinhamentos podem-se observar os pontos onde há diferença de nucleotídeos entre os clones em relação ao BZ167.

4H) - Análise dos alinhamentos:

Após os alinhamentos e análise par-a-par, foram gerados gráficos de análise estatística para a visualização dos pontos de diferenças genéticas ao longo das seqüências.

Quatro gráficos foram construídos, neles temos a comparação entre os clones na condição 1 (gráfico 04), condição 2 (gráfico 05) e condição 3 (gráfico 06), e um gráfico com todos os clones reunidos nas três condições (gráfico 07).

Os gráficos são mostrados a seguir:

Gráfico 04: Análise das diferenças nucleotídicas – Condição 1, células não ativadas (fora de ciclo):

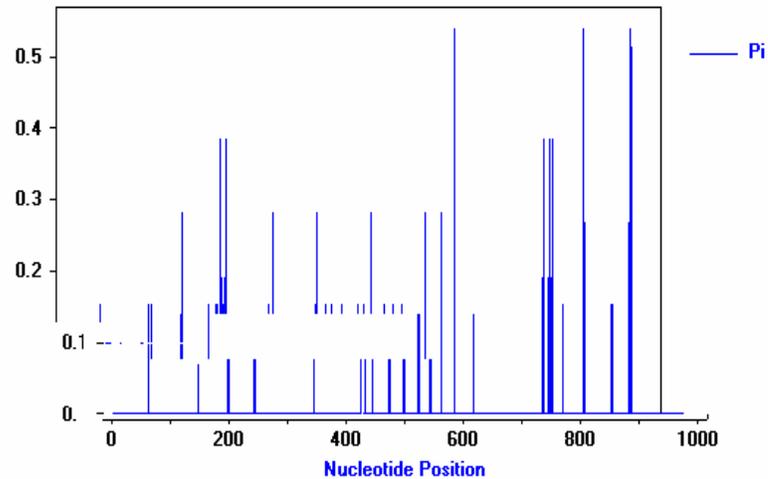
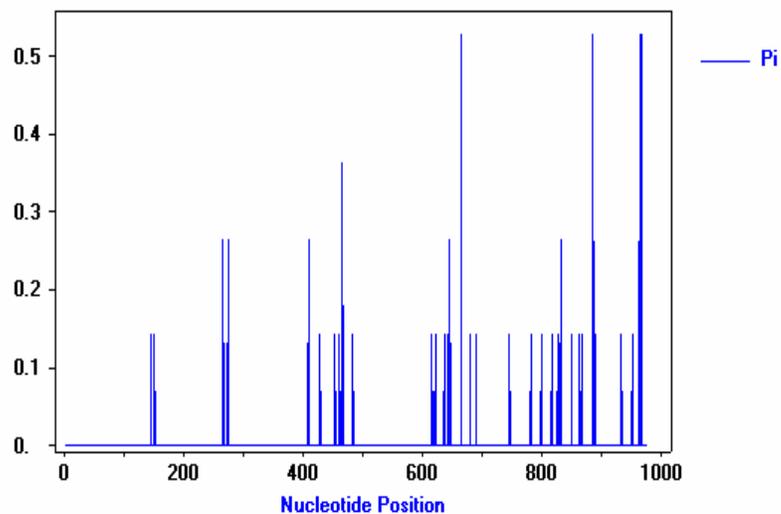
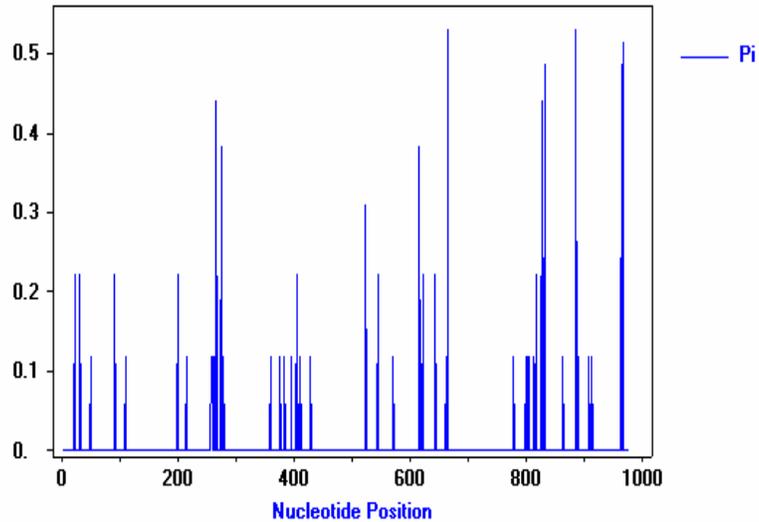


Gráfico 05: Análise das diferenças nucleotídicas – Condição 2, células ativadas no momento da infecção (pré-ciclo):



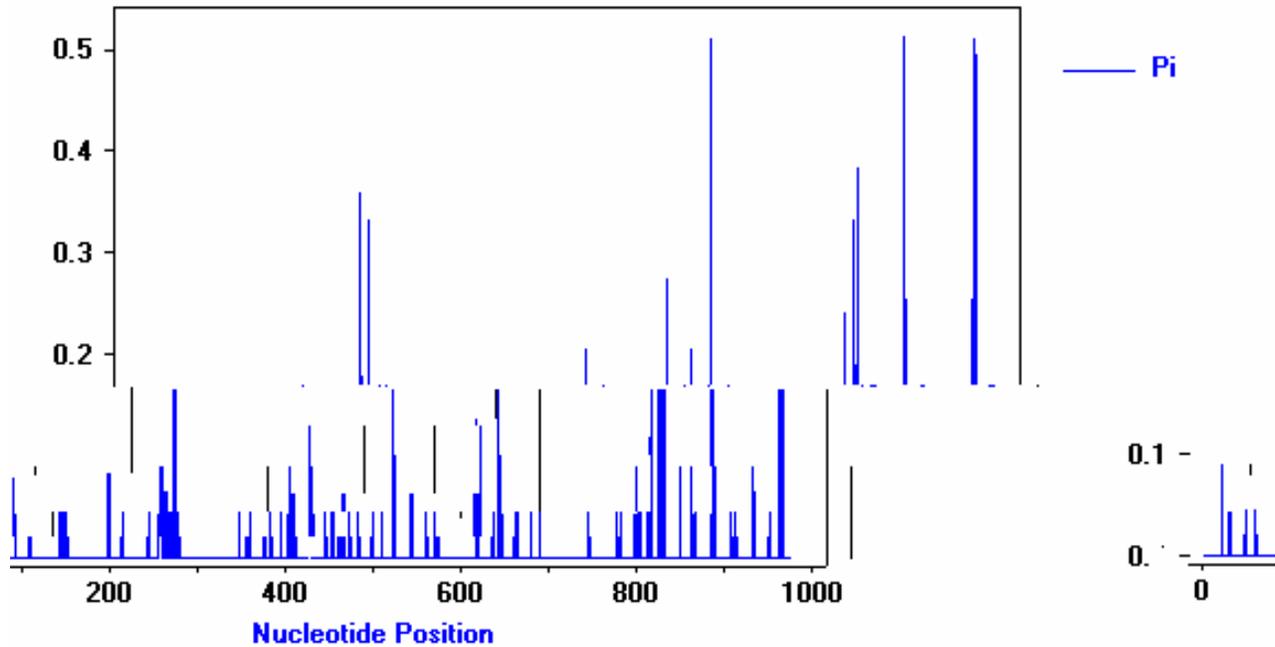
Os gráficos mostram os pontos ao longo das seqüências onde ocorreram diferenças nucleotídicas. Os picos mais elevados mostram que, naquele ponto as substituições foram mais freqüentes entre os clones, apontando para um padrão de substituições ao longo das seqüências.

Gráfico 06: Análise das diferenças nucleotídicas – Condição 3 células ativadas 72h antes da infecção (em ciclo):



O gráfico mostra os pontos ao longo das seqüências onde ocorreram diferenças nucleotídicas. Os picos mais elevados mostram que, naquele ponto as substituições foram mais freqüentes entre os clones, apontando para um padrão de substituições ao longo das seqüências.

Gráfico 07: Análise das diferenças nucleotídicas – Todas as condições:



Quando analisadas juntas, podemos notar, haver os pontos comuns nas seqüências, onde ocorreram diferenças nucleotídicas. Se compararmos com os gráficos anteriores, veremos que, os pontos de trocas são sempre os mesmos ao longo das seqüências apontando para um padrão mutacional.

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

A diversidade genética do HIV-1 é apontada como um fator limitante para o desenho de uma vacina e também responsável pela geração de resistência a drogas anti-HIV daí, a relevância em se conhecer melhor os mecanismos envolvidos nesse complexo processo. Esta diversidade genética resulta de limitações de fidelidade intrínsecas ao mecanismo de replicação viral acentuados pela alta taxa de replicação na geração e eliminação de partículas virais durante o tempo da infecção.

A transcrição reversa do genoma viral representa uma etapa crítica do ciclo biológico do HIV-1 e pode sofrer a influência de vários fatores como, por exemplo, à oferta de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) ou o estado de ativação celular. Este déficit de oferta de dNTPs no momento da transcrição reversa pode gerar genomas altamente mutados nos quais, a informação viral se perde, como no caso da hipermutação, resultando em partículas virais defectivas que são incapazes de deixar a célula hospedeira e infectar novas células, o que é bastante desastroso para o vírus, podendo culminar com a extinção viral.

Propusemos estudar por modelo *in vitro*, os mecanismos que podem fazer parte dos eventos geradores da diversidade genética do HIV-1 nos momentos iniciais da infecção viral. Para tanto, utilizamos PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis e as infectamos com HIV-1 BZ167. Segundo KOK et al., 1993; o tempo necessário para que ocorra a transcrição reversa leva em média 12h e o tempo total para que o HIV-1 complete o ciclo replicativo e forme uma nova partícula leva em média 48h. Para permitir, em cultura, o desenrolar dos momentos iniciais do encontro vírus/células e observar os primeiros eventos do processo de replicação viral que possam estar envolvidos na geração da diversidade genética do HIV-1, mantivemos nossas células, após a infecção, em cultura por 48h, tempo estimado para que o HIV-1 realize apenas um ciclo replicativo por célula (KARLSSON et al., 1998). Desta forma observamos o efeito mutacional sobre o vírus em apenas um ciclo de replicação, ou seja, em apenas um evento de transcrição reversa onde as taxas de mutação são conhecidas (entre 10^{-5} a 10^{-4} bases por ciclo replicativo). Assim sendo, assegura-se que as substituições observadas são descendentes de um ciclo celular e não correspondem ao acúmulo de mutações de várias gerações virais. Ao contrário de outros estudos descritos na literatura

(KARLSSON et al., 1999; RITOLA et al., 2004), onde estes eventos são observados após obtenção de PBMCs de indivíduos infectados pelo HIV-1 e os eventos relacionados com a geração de diversidade genética são estudados após 72h de cultura celular. Assim, desenhamos três diferentes condições de infecção e cultura para as PBMCs e o HIV-1. Na primeira condição, infectamos PBMCs em repouso: células não ativadas (células fora de ciclo celular) e as mantemos em cultura por 48h; Na segunda condição as PBMCs foram ativadas simultaneamente a infecção: células em ativação (células pré-ciclo) e mantida em cultura por 48h; Na terceira condição, as PBMCs foram ativadas 72h antes da infecção: células plenamente ativadas (células em ciclo), infectadas e mantidas em cultura por 48h.

O DNA proviral foi gerado em cultura celular nas três condições descritas, em seguida, isolado e, através da técnica de “end point” PCR, produzimos um total de 46 clones, a partir do inóculo inicial. Considerando as três condições isoladamente, na condição 01 obtivemos 14 clones; na condição 02 obtivemos 15 clones e na condição 03 obtivemos 17 clones. Em seguida, todos os c 17 cl075 . Em eT0 Td

Na **condição 02**, observamos, nos 15 clones analisados, ao todo 80 substituições, sendo que o intervalo destas substituições foi de 01 a até 11 substituições por clone. Quanto à taxa mutacional, esta variou em um intervalo de $1,0 \times 10^{-3}$ a até $1,0 \times 10^{-2}$ entre os clones desta condição.

Na **condição 03**, observamos, nos 17 clones analisados, ao todo 99 substituições, sendo que o intervalo destas substituições foi de 03 a até 12 substituições por clone. Quanto à taxa mutacional, esta variou em um intervalo de $2,8 \times 10^{-3}$ a até $1,1 \times 10^{-2}$ entre os clones desta condição. Vale lembrar que estes dados correspondem às substituições nucleotídicas encontradas no gene *pol*, em um fragmento de 1.047 pb.

Na natureza o processo mutacional durante a replicação do DNA das células eucarióticas e procarióticas acontece com taxas entre 10^{-8} a 10^{-11} (BECKMAN et al., 1993; DOMINGO et al., 1996). Já nos retrovírus, que tem como etapa importante de sua replicação a transcrição reversa, o processo mutacional ocorre em taxas muito mais elevadas entre 10^{-4} a 10^{-5} substituições de bases nucleotídicas por genoma a cada ciclo replicativo. Isto quer dizer que, a cada 10.000 ou 100.000 nucleotídeos ocorre um erro e este erro é incorporado ao genoma na forma de um nucleotídeo diferente do original, e esta incorporação de erro é responsável, em grande parte, pela geração da diversidade genética, que pode ser favorável ou desfavorável, dependendo do contexto em que ocorra (HOLLAND et al., 1992; DOMINGO et al., 1996). Isso pode ser explicado pela taxa de mutação que varia de forma inversamente proporcional ao tamanho do genoma e também por evidências bioquímicas e estruturais relacionadas ao fato da RNA replicase e a transcriptase reversa não possuírem uma edição competente da atividade exonuclease 3'---5'. Estes e outros fatores prejudicam a operação de correção da incorporação errônea de bases nucleotídicas no momento da transcrição reversa, além disso, a variação das concentrações relativas do “pool” de substrato nucleotídicos (dNTPs), pode influenciar na elevação da taxa mutacional (HOFFMANN et al., 1991; DOMINGO et al., 1996). Quando se utiliza técnicas de biologia molecular, como a do “end point” PCR, empregada neste trabalho para gerar seqüências nucleotídicas, ainda há que se considerar a taxa de erro da enzima Taq DNA polimerase que é utilizada durante a reação de PCR. A Taq polimerase, in vitro, não tem capacidade de revisar a seqüência sintetizada e possui uma taxa de erro de incorporação nucleotídica que varia entre $1,1 \times 10^{-4}$ a até $1,0 \times 10^{-6}$ bases por ciclo replicativo (CARIELLO et al., 1991; WESTFALL et al., 1999). No caso do HIV-1, a taxa de incorporação de erro no momento da transcrição reversa é de $3,4 \times 10^{-5}$ bases nucleotídicas em um genoma de

aproximadamente 9.200 pb, ou seja, a cada 10.000 bases sintetizadas ocorre um erro (HOLLAND et al., 1992; MANSKI et al., 1995).

O que nossos resultados mostraram foi uma exacerbação do processo mutacional nos primeiros momentos da replicação viral nas três condições estudadas. Encontramos uma taxa mutacional de erro na incorporação de nucleotídeos nas seqüências analisadas muito acima do esperado, com intervalos de $1,0 \times 10^{-3}$ a $2,1 \times 10^{-2}$ entre os clones da condição 01; $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ entre os clones da condição 02 e $2,8 \times 10^{-3}$ a $1,1 \times 10^{-2}$ entre os clones da condição 03. Isso representa que, em alguns clones, a cada 200 bases sintetizadas ocorreu um erro, e uma base diferente a da seqüência do inócuo original foi incorporada à nova seqüência. Considerando o intervalo das taxas de erro da enzima Taq polimerase (Taq platinum) e da transcrição reversa peculiar ao HIV-1, que fica entre 10^{-6} a 10^{-5} erros por base sintetizada, a elevada taxa mutacional encontrada por nós não está relacionada com o erro da Taq polimerase e está muito além dos valores comumente encontrados durante a transcrição reversa do HIV-1 ou descritos em outros estudos do gênero.

Esta taxa mutacional elevada, produziu diversas substituições nucleotídicas nas seqüências genômicas dos clones analisados. As substituições nucleotídicas mais freqüentes encontradas são as do tipo Transição e Transversão, com predomínio da primeira sobre a segunda. O evento de Transição consiste na substituição entre bases de mesma característica, ou seja, bases púricas (A-G) trocam entre si (exp. G para A) e as bases pirimídicas (T-C) trocam entre si (exp. C para T). Já o evento de Transversão consiste na troca entre bases de características diferentes, púricas trocam com pirimídicas (exp. A para T) e vice-versa. No HIV-1 as substituições mais freqüentes são também as de Transição havendo um predomínio das substituições de G—A (MORYAMA et al., 1991).

Este padrão natural de substituições nucleotídicas também foi observado em nossos resultados, neste contexto, as substituições mais freqüentes encontradas foram às substituições de transição do tipo G para A, que em alguns casos configuraram eventos de hipermutação, seguidas por substituições do tipo A para G.

Na **condição 01**, 98,72% das substituições foram eventos de transição, sendo que, 59% foram substituições de G para A; 12,82% de A para G; 7,10% de C para T; 2,56% de T para C. Ao passo que, apenas 1,28% das substituições foram eventos de transversão, representadas pela substituição de T para G.

Na **condição 02**, 95% das substituições foram eventos de transição, sendo que, 61,25% foram substituições de G para A; 16,25% de T para C; 12,5% de A para G; 5,0% de C para T. Enquanto que, 5,0% das substituições foram eventos de transversão, sendo que destes, 3,75% foram substituições de T para A e 1,25% de C para A.

Por fim, na **condição 03**, 96,97% das substituições foram eventos de transição, sendo que, 69,70% foram substituições de G para A; 11,12% de A para G; 11,12% de C para T; 5,5% de C para T. Enquanto que, 3,03% das substituições foram eventos de transversão, sendo que destes, 1,01% foram substituições de T para A e 2,02% de A para C.

Identificamos três padrões distintos de mutações entre os clones. No primeiro, observamos um padrão onde as mutações acontecem ao acaso, mas sem produzir genomas hipermutados. No segundo, observamos um padrão em que é possível caracterizar o evento de hipermutação. No terceiro, observamos um padrão onde praticamente não há presença de mutação.

Quando as mutações ocorrem ao acaso, a taxa mutacional no clone é mais elevada e as substituições ocorrem aleatoriamente sem predomínio de um tipo específico de substituição nucleotídica sobre outro, como, por exemplo, no clone 05 da condição 02 (ver quadro em resultados). Neste caso, as mutações podem ser benéficas para o vírus, favorecendo a diversidade genética que lhe dará plasticidade para escapar das pressões imune e terapêutica, ou não, esta taxa elevada também pode ocasionar o surgimento de mutações prejudiciais que até podem interferir na viabilidade do vírus.

Por outro lado, quando a taxa mutacional é alta e se estabelece a hipermutação, isso pode ser catastrófico para o vírus. A hipermutação ocorre quando há uma substituição de G para A, em Gs seguidos de A (**GA—AA**), e quando há uma substituição de G para A em Gs seguidos de G (**GG—AG**). Estas substituições devem ser majoritárias ao longo da seqüência e estar evidentes no clone, como, por exemplo, no clone 18 da condição um; no clone 10 da condição dois e no clone 02 da condição três (ver resultados: pg. 46; 48 e 49).

Porém quando a taxa mutacional é baixa as substituições nucleotídicas ao longo da seqüência são quase inexistentes, portanto a geração de diversidade genética não é expressiva, o que deixa a seqüência nucleotídica oriunda da cultura, idêntica ou quase idêntica à do inóculo primário, como por exemplo no clone 11 da condição 01 (ver resultados pg. 46).

Outro evento prejudicial ao vírus é a presença de códon de terminação (“stop códon”) na sequência viral. Isso causa a perda da informação genética no momento da replicação viral tornado à partícula viral inviável. Esta ocorrência foi observada em dois clones dos 49 analisados: clone 09 da condição 01 e clone 15 da condição 02, ambos hipermutados.

Estes resultados estão intimamente ligados às condições celulares e a população celular escolhida para o estudo. Utilizamos PBMCs de indivíduos saudáveis, sem que fossem isolados destes os linfócitos T CD4+, principal alvo da infecção pelo HIV-1. Também não excluimos outras populações celulares, como a de monócitos, por exemplo. Portanto, o que vemos é o resultado da infecção viral em uma população heterogênea quanto ao tipo celular. Cada tipo celular que compõe esta população heterogênea poderia estar em um momento distinto do ciclo celular, como consequência, cada célula poderia possuir um status de ativação celular próprio, diferente uma das outras. Nós não identificamos, tampouco isolamos as células levando em consideração a ativação celular das mesmas. Sendo assim, no que diz respeito à ativação celular, possuíamos uma população heterogênea em cada uma das três condições.

Em Karlsson et al., 1998; as condições de estudos foram propostas utilizando Linfócitos T CD4+ isolados de indivíduos HIV+ ou pacientes HIV+ em tratamento anti-retroviral. Em Janini et al., 2001; linfócitos de pacientes HIV+ foram isolados e posteriormente excluíram-se as células que se encontram em ativação e excluíram-se outros tipos celulares, através de colunas com anticorpos específicos para separação celular. Assim, ao final do processo foi possível ter uma população celular composta apenas de Linfócitos T CD4+ e no mesmo momento de ativação. Porém, abordagens como estas não reproduzem com exatidão os eventos que ocorrem in vivo.

Por optarmos por uma população celular heterogênea, é possível que o status de ativação celular tenha sido o mesmo nas três condições. Na condição 01, propomos células em repouso, porém é possível que nesta condição houvesse uma quantidade de células ativadas, ainda que em menor quantidade. Na condição 02, propomos colocar as células em ativação, aqui também é possível que tenhamos um determinado número de células ativadas e em repouso. Na condição 03, propomos células plenamente ativadas, mas, também é possível que nesta condição houvesse células em repouso e em ativação. Há que se considerar estas observações por se tratar de uma população celular mista. Usamos como estímulo para ativação de nossas células, fitohemaglutinina, que possui

como alvo predominantemente os linfócitos, porém nossa população celular era heterogênea, fazendo parte desta, células como os monócitos, que são estimulados por LPS (mais comumente) e não por fitohemaglutinina. Esta pode ser a explicação para termos encontrado genomas mutados em todas as condições celulares, o que seria um dado mais próximo do que ocorre in vivo.

Estes momentos distintos de ativação celular, refletem diretamente sobre a concentração do “pool” de substrato de nucleotídeos (dNTPs) que tem relação com a geração de diversidade genética do HIV-1 (Janini et al., 2001). Quando as células encontram-se em repouso, ou seja, fora de ciclo celular (fase G0), a concentração do “pool” de dNTPs esta abaixo do KM de concentração da transcriptase reversa, o que pode favorecer a formação de genomas mutados, como consequência haveria um aumento da diversidade genética do vírus neste momento, que pode ser benéfica ou prejudicial para o vírus, dependendo do contexto em esta ocorre. Quando as células estão em ativação, ou seja, as células estão entrando em ciclo e se preparando para a síntese de DNA (Fase G1), o “pool” de dNTPs está em expansão, mas de forma desequilibrada, o que favorece a hipermutação, este sim, um evento catastrófico para o vírus. Mas, quando as células estão plenamente ativadas, ou seja, as células estão em ciclo e em síntese de DNA (Fase S), o “pool” de dNTPs encontra-se balanceado, sendo este momento, o mais apropriado para que ocorra a transcrição reversa, pois, devido a esta oferta equilibrada de dNTPs as chances de erro da transcriptase reversa diminuem, favorecendo assim a geração de genomas sem mutações deletérias para o vírus.

Outro ponto importante se relaciona ao fato de que todos os trabalhos realizados neste sentido, investigaram o processo mutacional após 72h de cultura, tempo suficiente para que se estabelecesse uma população viral homogênea, o que impossibilitaria a observação das primeiras etapas do processo mutacional que geram a diversidade genética. Nós estudamos os eventos mutacionais ocorridos em cultura celular após 48h, tempo que representa apenas um ciclo replicativo do HIV-1 (KARLSSON et al., 1998), o que tornaria impossível ao vírus o estabelecimento de uma população homogênea. Isso nos permitiu observar os acontecimentos precoces envolvidos no processo mutacional gerador da diversidade genética viral. Esta estratégia foi adotada na tentativa de nos aproximarmos ao máximo do que ocorre durante a infecção e nos primeiros momentos da replicação viral in vivo.

Todos estes fatores implicam diretamente sobre a diversidade genética do HIV-1 que em condições diferentes sofre processos mutacionais diferentes. Quando as condições são favoráveis, às células estão plenamente ativadas e a oferta de dNTPs é equilibrada o HIV-1 vai gerar vírus muito parecidos, com os mesmos genomas do inóculo inicial (proposto na condição 03). Quando as condições estão se equilibrando, as células estão se ativando e as dNTPs em expansão, a taxa de erro eleva-se e são gerados genomas hipermutados (proposto na condição 02) e quando as células encontram-se em repouso e as concentrações do pool de dNTPs em total desequilíbrio são gerados diversos mutantes (proposto na condição 01).

O critério da metodologia de “end point” PCR para gerar seqüências provirais de cultura celular, as diferentes condições de cultura a partir de PBMCs e o tempo de permanência em cultura das células infectadas foram fundamentais para que pudéssemos chegar a estes resultados. O que pudemos observar foi que o HIV-1 produziu genomas mutados nas três condições de cultura onde as células encontravam-se em diferentes estados de ativação celular, em um período de 48h e não 72h como descrito em outros trabalhos. Houve um intenso processo mutacional visto que a variação genética não esteve presente no inóculo viral pois este foi seqüenciado em três momentos diferentes de cultura celular e todos as seqüências analisadas eram idênticas.

Embora o processo mutacional de erro na incorporação de nucleotídeos seja aleatório por definição, de maneira surpreendente encontramos um padrão mutacional em nossas seqüências. Isso fica claro quando observamos os gráficos 4, 5, 6 e 7 (ver resultados: pg. 54, 55 e 56). No gráfico três todas as seqüências dos clones da **condição 01** foram alinhadas e comparadas entre si. Observamos as regiões nas quais ocorrem substituições nucleotídicas com maior freqüência. Existem pontos em que as substituições são comuns a quase todos os clones, como, por exemplo, entre as posições 250 a 300 pb, 450 a 550 pb, 800 a 850 pb; No gráfico quatro todas as seqüências da **condição 02** são analisadas. Percebemos que entre as posições 450 a 500 pb, 600 a 650 pb e 800 a 850 pb as substituições nucleotídicas são comuns entre os clones desta condição. No gráfico cinco, observamos as seqüências da **condição 03** e notamos que os pontos comuns de substituições nucleotídicas ficam entre as posições 250 a 300 pb, 400 a 450 pb, 600 a 650 pb, 800 e 850 pb. O gráfico seis sobrepõe os dados dos gráficos três, quatro e cinco, analisando os pontos de substituição nucleotídicas entre os clones das três condições juntas. Fica claro que existem regiões comuns em

que as substituições ocorrem em todas as condições, destacando as regiões entre 200 a 300 pb, 400 a 500 pb, 600 a 690 pb, 800 a 900 pb.

Nestas regiões o processo mutacional é intenso, os eventos mutacionais que mais ocorrem são os de transição, as substituições nucleotídicas mais frequentes são as de G para A, há clones hipermutados nas três condições e a taxa mutacional está em um intervalo de $1,0 \times 10^{-3}$ a $2,1 \times 10^{-2}$, valores muito acima do que os encontrados normalmente.

Podemos observar todas as substituições em cada um dos clones nos resultados das páginas 45 a 51 e os alinhamentos dos clones em cada uma das três condições em comparação com a sequência referencia do BZ167 estão expressos nos anexos I, II e III. No anexo IV podemos observar a análise filogenética com a representação de uma árvore genealógica baseada nas diferenças nucleotídicas entre as seqüências mostrando que os clones se relacionam entre si mas possuem características genéticas distintas.

Em vista destes resultados, podemos inferir que há um processo ordenado de variação genética nos primeiros momentos da replicação viral onde as substituições ocorrem em pontos específicos do genoma que esta sendo gerado, coordenado pelo status de ativação das células no exato momento em que a transcrição reversa esta acontecendo e a síntese de DNA estão ocorrendo.

A replicação viral é um processo dinâmico, com uma produção de 10^{10} novas partículas virais liberadas por dia e, como não existe mecanismo reparador de erro eficiente, esta produção viral pode mudar rapidamente a genética populacional viral em um indivíduo infectado. Desta forma a intensa replicação e altas taxas mutacionais produzem genomas mutados que podem ser favoráveis ao vírus, trazendo vantagens à população viral ou então prejudiciais ao vírus, dependendo do contexto em que ocorrem. As pressões seletivas exercidas sobre a maioria destas mutações provem do sistema imunológico após este ser acionado através da ação de anticorpos neutralizantes ou mecanismos citotóxicos mediados por células T, e ainda, por pressão terapêutica exercida pela terapia anti-retroviral.

Estudos de diversidade viral durante a infecção primária mostram a presença de uma população viral homogênea no início da infecção, atribuindo esta homogeneidade à ação de um

mecanismo seletivo chamado de “gargalo na transmissão” (“bottleneck”), onde, apenas algumas variantes virais perpetuam no novo hospedeiro constituindo uma populacional viral geneticamente semelhante no início da infecção (DOMINGO et al., 2005). Um indivíduo infectado há algum tempo (doador da infecção), possui uma população viral com diversidade genética estabelecida, que aumentou ao longo do tempo. Entretanto, no momento da transmissão apenas uma pequena parte desta população viral é transferida ao novo indivíduo (receptor da infecção). Esta população viral leva consigo as características mutacionais estabelecidas no doador. O mecanismo seletivo conhecido como “bottleneck” ocorre justamente neste momento, reduzindo a diversidade genética transferida na infecção primária. Uma vez no receptor, esta população viral tende a expandir para se estabelecer, para isso, novos vírus serão produzidos (DELWART et al., 1994; SHANKARAPPA et al., 1999; KARLSSON et al., 1999; RITOLA et al., 2004).

Daí a importância de se conhecer o momento exato e quais as condições em que ocorre a infecção viral nas células do hospedeiro e os mecanismos envolvidos na formação da população viral nos primeiros momentos da infecção.

Em trabalhos anteriores, as observações foram feitas com base em análise de material colhido de indivíduos infectados há bastante tempo, que possuem uma população viral já estabelecida. Em alguns casos, as análises foram feitas com material de indivíduos infectados e sob tratamento anti-retroviral e, em ambos os casos, observar os acontecimentos do primeiro encontro entre o vírus e a célula é impossível. Ainda, quando estudos em cultura celular simulando as condições de infecção primária foram elaborados, estes, observaram os eventos mutacionais após ativar as células com fitohemaglutinina e mantê-las em cultura por 72h, perdendo desta forma a informação dos eventos iniciais do encontro vírus/célula na infecção viral. Neste trabalho tentamos reproduzir este primeiro encontro entre o vírus do doador e as células do receptor, infectando PBMCs de um doador de sangue saudável, em três condições diferentes e mantendo-as em cultura por 48h, permitindo apenas um ciclo replicativo do vírus, o que nos permitiu observar o processo mutacional ocorrido neste período.

Os resultados deste primeiro encontro entre o vírus e as células do hospedeiro observados em nosso trabalho, sugerem haver um processo mutacional com a geração de genomas quase idênticos ao do inócuo inicial, genomas mutados e genomas hipermutados, resultando em uma população viral

bastante heterogênea. Estes dados são um retrato do processo mutacional que pode estar ocorrendo nos primeiros momentos da infecção, exatamente quando o vírus está diversificando sua genética a fim de estabelecer apenas os vírus mais adaptados ao organismo hospedeiro. Portanto, é possível que outros estudos do gênero não tenham registrado estes eventos pois estudaram genomas virais após a ativação das células com fitohemaglutinina e mantidas em cultura por 72h, período que pode ser suficiente para o vírus estabelecer uma população geneticamente homogênea (MANRUBIA et al., 2005).

Ao longo do tempo, a característica genética desta população viral sofre mudanças para se adaptar as pressões seletivas do sistema imunológico do hospedeiro e pressões terapêuticas por ação das drogas anti-retrovirais, o que é descrito em outros trabalhos (DOMINGO et al., 1998). Até então se admitia que esta diversidade genética se constituía sem que houvesse um padrão mutacional pré-existente, porém observamos que a geração de diversidade genética talvez possa ter um padrão mutacional que antecede a pressão seletiva, sendo este, um processo inato ao vírus, estando ocorrendo justamente nos momentos precoces à montagem da resposta imunológica, antes mesmo que haja a estabilização da população viral infectante, até que esta se torne uma população homogênea geneticamente.

CONCLUSÃO

6 – COMENTÁRIOS E CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem haver um processo mutacional em nossos clones com a geração de genomas quase idênticos ao do inócuo inicial, genomas mutados e genomas hipermutados, resultando em uma população viral heterogênea.

Estes resultados são um retrato do processo mutacional ocorrendo nos primeiros momentos da infecção, exatamente quando o vírus está diversificando sua genética a fim de se estabelecer no organismo hospedeiro.

Observamos que a geração de diversidade genética possui um padrão mutacional que antecede a pressão seletiva, sendo este, um processo inato ao vírus, sendo que durante a infecção primária este processo ocorreria nos momentos mais precoces e que antecedem à montagem da resposta imunológica, antes mesmo que haja a estabilização da população viral infectante.

Mais estudos serão necessários até que se compreenda os acontecimentos que circundam os primeiros momentos da infecção viral e quais conseqüências incidiriam sobre a geração de mutações, o estabelecimento da população viral e até mesmo sobre a progressão da doença à aids.

A taxa mutacional encontrada foi maior do que a prevista pela taxa de erro da enzima transcriptase reversa quando considerada isoladamente.

BIBLIOGRAFIA

7 - BIBLIOGRAFIA

ALBETS B. - Molecular biology of the cell, 4th edn, pp. cm. New York: Garland Science, 2002.

ARGAÑARAZ ER, SCHINDLER M, KIRCHHOFF F, CORTES MJ, LAMA J. – Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication.; *J Biol Chem* 2003, 278(36):33912-9.

ARTHUR LO, BESS JW, SOWDER RCI, BENVENISTE RE, MANN DL, CHERMANN JC, HENDERSON LE. - Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines.; *Science* 1992, 258:1935-1938.

BARRE-SINOUSI F, CHERMANN JC, REY F. - Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquire immune deficiency syndrome.; *Science* 1983, 220:868-870.

BECKMAN RA, LOEB LA. - Multi-stage proofreading in DNA replication.; *Q. Rev. Biophys.* 1993, 26:255-331.

BERGER EA. - HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection.; *AIDS* 1997, 11 Suppl A: S3-16.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, Ministério da Saúde, Secretaria de DST/AIDS – Brasil, 2004.

BONGERTZ V, BOU-HABIB DC, BRIGIDO 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, 23:184-93.

- BOUR S, STREBEL K. - The HIV-1 vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release.; *Microbes and Infection* 2003, 5:1029-39.
- CARIELLO NF, SWEMBERG JA, SKOPEK TR. - Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis.; *Nucleic Acids Res.* 1991, Aug 11;19(15):4193-8.
- CHAN DC, KIM PS. - HIV entry and its inhibition.; *Cell Review* 1998, May 29;93(5):681-4.
- CHENG-MAYER C, SETO D, TATENO M, LEVY JA. – Biologic Features of HIV-1 that correlated With the virulence in the host.; *Science* 1998, 240: 80-82.
- CHOE H. - Chemokine receptors in HIV-1 and SIV infection.; *Arch. Pharmacol. Res.* 1998, Dec. 21(6):634-9.
- CLAVEL F, GUYADER M, GUETARD D, SALLE M, MONTAGNIER L, ALIZON M. - Molecular cloning and Polymorphism of the human immune deficiency virus type 2.; *Nature* 1986, 31: 324(6098):691-5.
- COHEN EA, SUBBRAMANIAN RA, GOTTLINGER HG. - Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis.; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, 214:219-35.
- COFFIN JM. – HIV viral dynamics.; *AIDS* 1996, Dec;10 Suppl 3:S75-84
- COOPER GM. – The cell: a molecular approach, 2nd edn, pp. xxiv, 689. Washington, DC, Sunderland, Mass.: ASM Press; Sinauer Associates, 2000.
- DE CLERCQ E. - New perspectives for the treatment of HIV infections.; *Verh K Acad Geneeskd Belg.* 1998; 60(1):13-41; discussion 41-5.

- DELWART EL, SHEPPARD HW, WALKER BD, GOUDSMIT J, MULLINS JI. – Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays.; *J Virol* 1994, Oct.68(10):6672-83.
- DIAZ RS, ZHANG L, BUSH M P, MOSLEY JW, MAYER A. – Divergence of HIV-1 Quasispecies in an epidemiologic cluster.; *AIDS* 1997, 193: 545-562.
- DOMINGO E, ESCARMIS C, LAZARO E, MANRUBIA SC. - Quasispecies dynamics and RNA virus extinction.; *Virus Research* 2005, Feb;107(2):129-39.
- DOMINGO E, ESCARMÍS C, SEVILLA N, BARANOWSKI E. – Population dynamics in the evolution of RNA viruses.; *Adv Exp Med Biol.* 1998, 440:721-7.
- DOMINGO E, ESCARMÍS C, SEVILLA N, MOYA A, ELENA SF, QUER J, NOVELLA IS, HOLLAND JJ. - Basic concepts in RNA virus evolution.; *FASB J* 1996, 10:859-864.
- EIGEN M. – Molecular self-organization and the early stages of evolution.; *Experientia* 1971, 27(11):149-212.
- EMERMAN M, MALIM MH. - HIV-1 regulatory/accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology.; *Science* 1998, 280:1880-4.
- FRANKEL AD, YOUNG JA. - HIV-1: fifteen proteins and an RNA.; *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67:1-25.
- FISCHER AG, FEINBERG MB, JOSEPHS S F., The trans-activator gene of HTLV IIIs essential for the virus replication.; *Nature* 1986; 320:367-371.
- GALLO RS, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M, SHEARER GM, KAPLAM M, HAYNES BF, PALKER TJ, REDFIELD R, OLESKE J, SAFAI B. - Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.; *Science* 1984, 224:500-5003.

- GOFF SP. - Death by deamination: a novel host restriction system for HIV-1.; *Cell* 2003, 114:281-3.
- GONDA MA, WONG-STAAAL F, GALLO RC, CLEMENTS JE, NARAYAN O, GILDEN RV. - Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus.; *Science* 1985, Jan 11;227(4683):173-7.
- GOMES P, ABECASIS A, ALMEIDA M, CAMACHO R, MANSINHO K. - Transmission of HIV-2.; *The Lancet* 2003; 3:683-4.
- GOTTLINGER HG. - HIV-1 gag: a molecular machine driving viral particle assembly and release.; *HIV Sequence Compendium* 2001, p.2.
- GOTTLINGER HG. - The HIV-1 assembly machine.; *AIDS*. 2001, 15 Suppl 5:S13-20.
- HO DD, NEWMANN AU, PERELSON AS, CHEN W, LEONARD JM, MARKOWITZ M. - Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV infection.; *Nature* 1995, 317:123-126.
- HOFFMANN AA, PARSONS PA. - Evolutionary Genetics and environmental stress.; *Oxford University Press* 1991; Oxford.
- HOFFMAN NG, SEILLIER-MOISEIWITSCH F, AHN J, WALKER JM, SWANSTROM R. - Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop.; *J Virol* 2002, Apr; 76(8):3852-64.
- HOLLAND JJ, DE LA TORRE JC, STEINHAUER DA. - RNA virus populations as quasispecies.; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992, 176:1-20.
- HOPE TJ. - Viral RNA export.; *Chem. Biol.* 1997, May; 4(5):335-44.

HORWITZ JP, CHUA J, NOEL M, DAROUGE MA. - Nucleosides IV. 1-(2-deoxy-beta-d-lyxofuranosyl)-5-iodouracil.; *J Med Chem.* 1964, 15:385-6.

JANINI LM, PIENIAZEK D, PERALTA JM, SCHECHTER M, TANURI A, VICENTE AC, DELA TORRE N, PIENIAZEK NJ, LUO CC, KALISH ML, SCHOCHETMAN G, RAYFIELD MA. - Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis.; *Virus Genes* 1996, 13(1):69-81.

JANINI LM, TANURI A, SCHECHTER M, PERALTA JM, VICENTE AC, DELA TORRA N, PIENIAZEK NJ, LUO CC, RAMOS A, SORIANO V, SCHOCHETMAN G, RAYFIELD MA, PIENIAZEK D. - Horizontal and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 dual infections caused by viruses of subtypes B and C.; *J Infect Dis.* 1998, Jan;177(1):227-31.

JANINI LM, ROGERS M, BIRX DH, MCCUTCHAN FE. – Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4⁺ T Cells.; *J of Virology* sept. 2001, 75:7973-7986.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME on HIV/Aids (UNAIDS); 2004 Report on the Global Aids Epidemic. *UNAIDS* 2004.

KARLSSON AC, LINDBÄCK S, GAINES H, SÖNNERBORG A. - Characterization of viral population during primary HIV-1 infection.; *AIDS* 1998, 12:839-847.

KARLSSON AC, GAINES H, SÄLLBERG S, LINDBÄCK S, SÖNNERBORG A. - Reappearance of founder virus sequence in human immunodeficiency virus type 1-infected patients.; *J Virol* 1999, 73(7):6191-61-96.

KOK T, LI P, BURRELL C. - Cell-to-Cell transmission of human immunodeficiency virus infection induces two distinct phases of viral RNA expression under separate regulatory control.; *J Gen Virol* 1993, 74(Pt.1) 33-8.

KORIN YD, ZACK JA. - Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection in nucleoside-treated G0 lymphocytes.; *Journal of Virology* 1999, 73(8):6526-6532.

KORIN YD, ZACK JA., - Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in the cells.; *Journal of Virology* 1998, 72(4);3161-3168.

LEVY JA. - Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.; *Microbiol* 1993, Mar; 57(1):183-289.

LEVY JA, HOFFMAN AD, KRAMER SM, LANDIS JA, SHIMABUKURU JM, OSHIRO LS. - Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.; *Science* 1984, Aug 24; 225(4664):840-2.

LEWIN B. – Genes VII, pp. xvii, 900. Oxford; New York: Oxford University Press, 2000.

YU X, YUAN X, MATSUDA Z, LEE TH, ESSEX M. - The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions.; *J Virol* 1992, Aug; 66(8):4966-71.

MANRUBIA CS, ESCARMÍS C, DOMINGO E, LÁZARO E. - High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies.; *Gene* 2005; 347:273-282.

MANSKY LM, TEMIN HM. - Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase.; *J Virol* 1995, Aug; 69(8):5087-94.

MEEK TD. - Inhibitors of HIV-1 protease.; *J. Enzyme Inhib.* 1992, 6(1):65-98.

MORIYAMA EN, INA Y, IKEO K, SHIMIZU M, GOJOBORI T. - Mutation pattern of human immunodeficiency virus gene.; *J Mol Evol.* 1991, May;32(5):360-3.

O'BRIEN WA, NAMAZI A, KALHOR H, MAO SH, ZACK JA, AND CHEN ISY. – Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in blood mononuclear phagocytes are slowed by limitations of nucleotide precursors. *Journal of Virology* 1994, 68:1258-1263.

PEÇANHA EP, ANTUNES OAC, TANURI A. - Pharmacological Strategies for anti-HIV Therapy.; *Quim. Nova* 2002, 25(6B), 1108-1116.

PETERLIN BM, TRONO D. - Hide shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication.; *Nature Immunol.* 2003, Feb; 3(2):97-107.

PIANIAZEK D, PERALTA JM, FERREIRA JA, KREBS JW, OWEN SM. - Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction.; *AIDS* 1991, 5:1293-9.

RATNER L, GALLO RC, WONG-STAAAL F. - HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus; *Nature* 1985b; 313:636-637.

RITOLA K, PILCHER CD, FISCUS SA, HOFFMAN NG, NELSON JAE, KITRINOS KM, HICKS CB, ERON JR JJ, SWANSTROM S. - Multiple V1/V2 env variants are frequently present during primary infection with human immunodeficiency virus type 1.; *J Virol* 2004, Oct;78(20):11208-18.

RIZZUTO CD, WYATT R, HERNANDEZ RN, SUN Y, KWONG P, HENDRICKSON W, SODRISK J. – Identification of a conserved, discontinuous gp120 epitope involved in CCR-5 binding.; *HIV Patog Treat Conf* 1998,74.

SAAG MS, HAHN BH, GIBBONS G. - Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*.; *Nature* 1998; 334:440-444.

SABINO EC, SHPAER EG, MORGADO MG, KORBER BT, DIAZ RS, BONGERTZ V, CAVALCANTE S, GALVAO-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. Virology* 1994, Oct;68(10):6340-6.

SHANKARAPPA R, MARGOLICK JB, GANGE SJ, RODRIGO AG, UPCHURCH D, FARZADEGAN H.; GUPTA P, RINALDO CR, LEARN GH, HE X, HUANG XL, MULLINS JI. - Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999, Dec;73(12):10489-502.

STAMATATOS L, CHENG-MAYER C. – Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range and syncytium-forming ability.; *J. Virol* 1993, 67: 5635-5639.

TANTILLO C, DING J, JACOBO-MOLINA A, NANNI RG, BOYER PL, HUGHES SH, PAUWELS R, ANDRIES K, JANSSEN PA, ARNOLD E. - Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance.; *J Mol Biol.* 1994, Oct 28; 243(3):369-87.

THOMSON MM, PÉREZ-ÁLVAREZ L, NAJERA R. - Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy.; *The Lancet Infect. Dis.* 2002, Aug;2(8):461-71.

TUNGATURTHI PK, SAWAYA BE, SINGH SP, TOMKOWICZ B, AYYAVOO V, KHALILI K, COLLMAN RG, AMINI S, SRINIVASAN A - Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr.; *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2003, Jan;57(1):20-4.

TURNER BG, SUMMERS MF. - Structural biology of HIV.; *J Mol Biol* 1999, Jan 8;285(1):1-32.

VAISHNAV YN, WONG-STAAAL F. - The biochemistry of AIDS.; *Annu. Rev. Biochem.* 1991, 60:577-630.

VERONESE FD, COPELAND TD, OROSZLAN S, GALLO RC, SARNGADHARAN MG. - Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J. Virol. Methods* 1988, Mar; 62(3):795-801.

ZACK JA, ARRIGO SJ, WEITSMAN SR, GO AS, HAISLIP A, CHEN ISY. - HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure.; *Cell* 1990, 61:213-22.

ZACK JA. – The role of cell cycle in HIV-1 infection.; *Adv. Exp. Med. Biol* 1995, 31: 374-27.

WEISS RA. - How does HIV causes AIDS?.; *Science* 1993, May 28; 260(5112):1273-9.

WESTFALL MV, ALBAYYA, FP, METZGER JM. - Functional analysis of troponin I regulatory domains in the intact myofilament of adult single cardiac myocytes.; *J Biol Chem.* 1999, Aug 6;274(32):22508-16.

WLODAWER A, VONDRASEK J. - Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1998, 27:249-84.

ANEXO I

```

#BZ167-NIH cct caa atc act ctt tgg caa cga ccc ctc gtc aca gta aaa ata ggg ggg caa tta aag gaa gct cta tta gat aca gga gca gat gat aca gta tta
#C1-07      ... ..
#C1-08      ... ..
#C1-01      ... ..
#C1-02      ... ..
#C1-09      ... ..a ..
#C1-13      ... ..
#C1-10      ... ..
#C1-05      ... ..
#C1-06      ... ..
#C1-11      ... ..
#C1-19      ... ..
#C1-15      ... ..
#C1-16      ... ..
#C1-18      --- ---

#BZ167-NIH gaa gaa atg aat ttg cca gga aga tgg aaa cca aaa atg ata ggg gga att gga ggt ttt atc aaa gta aga cag tat gat cag ata ccc ata gaa atc
#C1-07      ... ..
#C1-08      ... ..
#C1-01      ... ..
#C1-02      ... ..
#C1-09      ... ..a..a.. ..t
#C1-13      ... ..t
#C1-10      ... ..
#C1-05      ... ..
#C1-06      ... ..
#C1-11      ... ..
#C1-19      ... ..
#C1-15      ... ..
#C1-16      ... ..
#C1-18      --- ---

```

```

#BZ167-NIH tta gta gaa att tgt aca gaa atg gaa aag gaa ggg aaa att tca aaa att ggg cct gaa aat cca tac aat act cca gta ttt gcc ata aag aaa aaa
#C1-07      ... .. a..
#C1-08
#C1-01
#C1-02
#C1-09      ... .. a .. a.. .. g..
#C1-13      ... .. a..
#C1-10      ... .. a..
#C1-05
#C1-06
#C1-11
#C1-19
#C1-15
#C1-16      ... .. t..
#C1-18

#BZ167-NIH gac agt act aaa tgg aga aaa tta gtg gat ttc aga gaa ctt aat aag aga act caa gac ttc tgg gaa gtt caa tta gga ata cca cat ccc gca ggg
#C1-07      ... .. a .. .. a ..
#C1-08
#C1-01
#C1-02
#C1-09      ... .. a .. .. a .. .. a .. .. a..
#C1-13
#C1-10
#C1-05
#C1-06
#C1-11
#C1-19      .. t ..
#C1-15
#C1-16
#C1-18      ... .. a..

```

```

#BZ167-NIH tta aaa aag aaa aaa tca gtr aca gta ctg gat gtg ggt gat gca tat ttt tca gtt ccc tta gat gaa gac ttc agg aag tat act gca ttt acc ata
#C1-07     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-08     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-01     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-02     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-09     ... ..g ... ..g.. ... ..g.. ... ..g..
#C1-13     ... ..a ... ..c.. ... ..c.. ... ..c..
#C1-10     ... ..g ... ..g.. ... ..g.. ... ..g..
#C1-05     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-06     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-11     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-19     ... ..a ... ..c.. ... ..c.. ... ..c..
#C1-15     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-16     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-18     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..

#BZ167-NIH cct agt ata aac aat gag aca cca ggg att aga tat cag tac aat gtg ctt cca cag gga tgg aaa gga tca cca gca ata ttc caa agt agc atg aca
#C1-07     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-08     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-01     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-02     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-09     ... ..g ... ..g.. ... ..g.. ... ..g..
#C1-13     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-10     ... ..g ... ..g.. ... ..g.. ... ..g..
#C1-05     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-06     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-11     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-19     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-15     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-16     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..
#C1-18     ... ..a ... ..a.. ... ..a.. ... ..a..

```

ANEXO II

```

#BZ167-NIH cat aga aat ctg tgg aca taa agc tat agg tac agt att agt agg acc tac acc ggt caa cat aat tgg aag aaa tct gtt gac rca gat tgg ttg cac
#C2-01      ... .. a.. ..
#C2-16      ... .. a.. ..
#C2-10      ... .. a.. ..
#C2-17      ... .. a.. ..
#C2-08      ... .. a.. ..
#C2-02      ... .. a.. ..
#C2-15      ... .. t.. .. .t.. .. a.. ..
#C2-18      ... .. a.. ..
#C2-09      ... .. a.. ..
#C2-05      ... .. .t.. .. g.. ..
#C2-07      ... .. a.. ..
#C2-06      ... .. .t.. .. g.. ..
#C2-12      ... .. a.. ..
#C2-13      ... .. a.. ..
#C2-11      ... .. a.. ..

#BZ167-NIH ttt aaa ttt tcc cat tag tcc tat tga aac tgt acc agt aaa att aaa gcc agg aat gga tgg ccc aaa agt taa aca atg gcc att gac aga aga aaa
#C2-01      ... ..
#C2-16      ... ..
#C2-10      ... ..
#C2-17      ... ..
#C2-08      ... ..
#C2-02      ... ..
#C2-15      ... ..
#C2-18      ... ..
#C2-09      ... ..
#C2-05      ... ..
#C2-07      ... ..
#C2-06      ... ..
#C2-12      ... ..
#C2-13      ... ..
#C2-11      ... ..

```

```

#BZ167-NIH aat aaa agc att agt aga aat ttg tac aga aat gga aaa gga agg gaa aat ttc aaa aat tgg gcc tga aaa tcc ata caa tac tcc agt att tgc cat
#C2-01      ... ..
#C2-16      ... ..
#C2-10      ... ..      .a.
#C2-17      ... ..
#C2-08      ... ..
#C2-02      ... ..
#C2-15      ... ..
#C2-18      ... ..
#C2-09      ... ..
#C2-05      ... ..      a.      t.
#C2-07      ... ..      a.      t.
#C2-06      ... ..
#C2-12      ... ..      .t      .t      t.      t.
#C2-13      ... ..
#C2-11      ... ..

#BZ167-NIH aaa gaa aaa aga cag tac taa atg gag aaa att agt gga ttt cag aga act taa taa gag aac tca aga ctt ctg gga agt tca att agg aat acc aca
#C2-01      ... ..
#C2-16      ... ..
#C2-10      ... ..
#C2-17      ... ..
#C2-08      ... ..
#C2-02      ... ..
#C2-15      ... ..      a.
#C2-18      ... ..
#C2-09      ... ..
#C2-05      ... ..
#C2-07      ... ..
#C2-06      ... ..
#C2-12      ... ..
#C2-13      ... ..
#C2-11      ... ..

```

```

#BZ167-NIH tcc cgc agg gtt aaa aaa gaa aaa atc agt rac agt act gga tgt ggg tga tgc ata ttt ttc agt tcc ctt aga tga aga ctt cag gaa gta tac tgc
#C2-01      ... .. a.. ..
#C2-16      ... .. a.. .. .a.
#C2-10      ... .. a.. .. .a.
#C2-17      ... .. a.. ..
#C2-08      ... .. a.. .. .a. .g.
#C2-02      ... .. a.. g.. .. c..
#C2-15      ... .. a.. .. .a.
#C2-18      ... .. a.. ..
#C2-09      ... .. a.. .. .a.
#C2-05      ... .. a.. .. c.. c..
#C2-07      ... .. a.. .. c..
#C2-06      ... .. a.. .. .a.
#C2-12      ... .. a.. .. .a.
#C2-13      ... .. g.. .. .a.
#C2-11      ... .. a.. .. .a.

#BZ167-NIH att tac cat acc tag tat aaa caa tga gac acc agg gat tag ata tca gta caa tgt gct tcc aca ggg atg gaa agg atc acc agc aat att cca aag
#C2-01      ... ..
#C2-16      ... .. .g.
#C2-10      ... ..
#C2-17      ... ..
#C2-08      ... ..
#C2-02      ... ..
#C2-15      ... ..
#C2-18      ... ..
#C2-09      ... ..
#C2-05      ... ..
#C2-07      ... ..
#C2-06      ... ..
#C2-12      ... .t .. .. .t.
#C2-13      ... ..
#C2-11      ... ..

```

ANEXO III

```

#BZ167-NIH tca aat cac tct ttg gca acg acc cct cgt cac agt aaa aat agg ggg gca att aaa gga agc tct att aga tac agg agc aga tga tac agt att
#C3-06      ... ..
#C3-20      ... ..
#C3-08      ... ..
#C3-07      ... ..
#C3-11      ... ..
#C3-03      ... ..
#C3-17      ... ..
#C3-10      ... ..
#C3-14      ... ..
#C3-12      ... ..
#C3-05      ... .. g. . . . . t. . . . .
#C3-04      ... ..
#C3-16      ... ..
#C3-02      ... ..
#C3-01      ... ..
#C3-18      ... ..
#C3-09      ... .. g. . . . . t. . . . .

#BZ167-NIH aga aga aat gaa ttt gcc agg aag atg gaa acc aaa aat gat agg ggg aat tgg agg ttt tat caa agt aag aca gta tga tca gat acc cat aga aat
#C3-06      ... ..
#C3-20      ... ..
#C3-08      ... ..
#C3-07      ... ..
#C3-11      ... ..
#C3-03      ... ..
#C3-17      ... ..
#C3-10      ... .. a. . . . .
#C3-14      ... ..
#C3-12      ... ..
#C3-05      ... ..
#C3-04      ... ..
#C3-16      ... ..
#C3-02      ... ..
#C3-01      ... ..
#C3-18      ... ..
#C3-09      ... ..

```

```

#BZ167-NIH att agt aga aat ttg tac aga aat gga aaa gga agg gaa aat ttc aaa aat tgg gcc tga aaa tcc ata caa tac tcc agt att tgc cat aaa gaa aaa
#C3-06      ... ..
#C3-20      ... ..
#C3-08      ... ..
#C3-07      ... ..
#C3-11      ... ..a.. ..a.. ..
#C3-03      ... ..
#C3-17      ... ..
#C3-10      ... ..a.. ..
#C3-14      ... ..
#C3-12      ... ..
#C3-05      ... ..
#C3-04      ... ..
#C3-16      ... ..
#C3-02      ... ..a.. ..
#C3-01      ... ..a.. ..
#C3-18      ... ..
#C3-09      ... ..

#BZ167-NIH aga cag tac taa atg gag aaa att agt gga ttt cag aga act taa taa gag aac tca aga ctt ctg gga agt tca att agg aat acc aca tcc cgc agg
#C3-06      ... ..
#C3-20      ... ..
#C3-08      ... ..
#C3-07      ... ..
#C3-11      ... ..a.. ..a.. ..g.. ..
#C3-03      ... ..
#C3-17      ... ..
#C3-10      ... ..
#C3-14      ... ..
#C3-12      ... ..
#C3-05      ... ..
#C3-04      ... ..
#C3-16      ... ..
#C3-02      ... ..a.. ..
#C3-01      ... ..
#C3-18      ... ..a.. ..a.. ..
#C3-09      ... ..

```

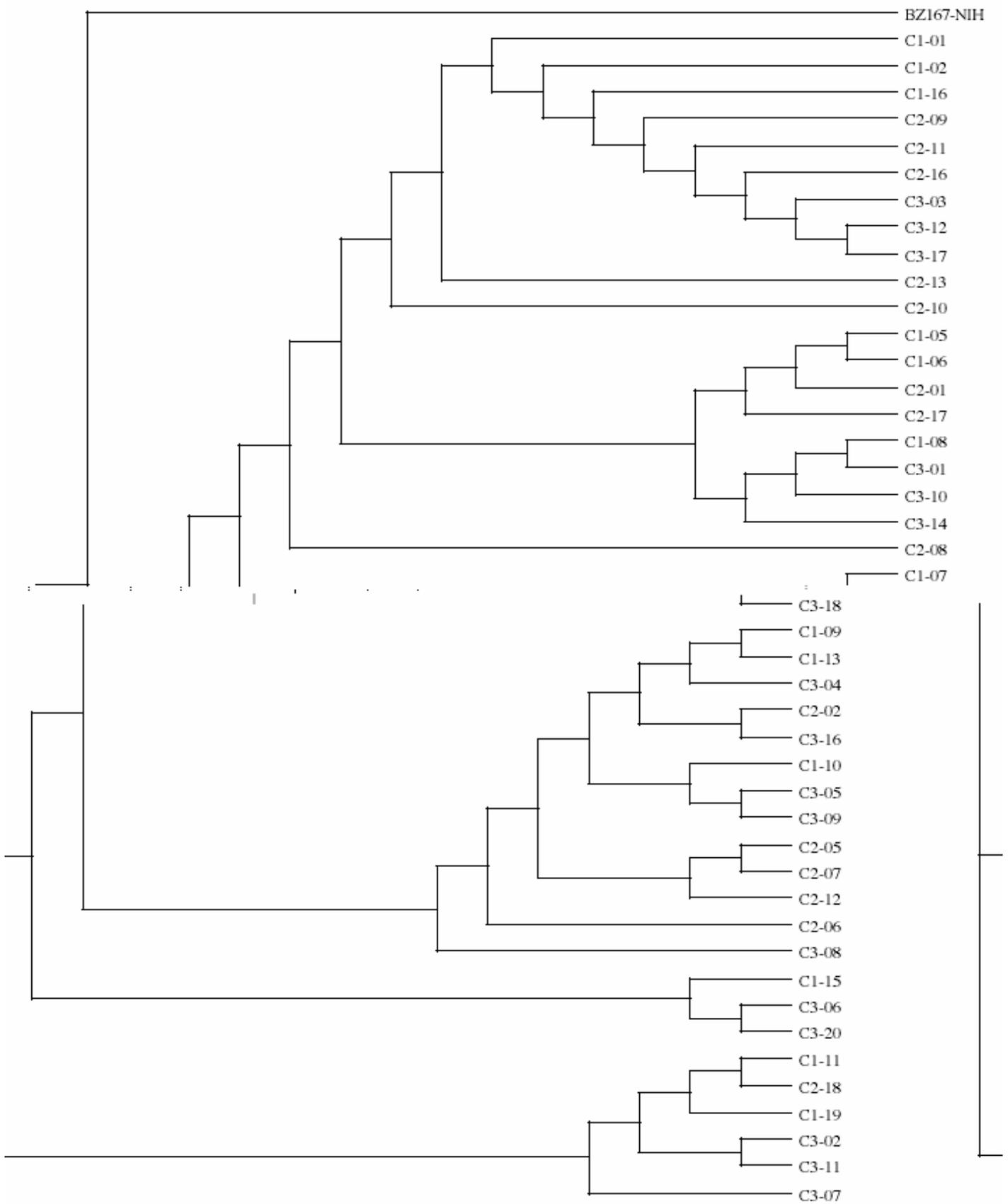
```

#BZ167-NIH gtt aaa aaa gaa aaa atc agt rac agt act gga tgt ggg tga tgc ata ttt ttc agt tcc ctt aga tga aga ctt cag gaa gta tac tgc att tac cat
#C3-06      ... .. .a. ....
#C3-20      ... .. .a. ....
#C3-08      ... .. .a. ....
#C3-07      ... .. .g. ....
#C3-11      ... .. .a. .g. ....
#C3-03      ... .. .a. ....
#C3-17      ... .. .a. ....
#C3-10      ... .. .a. ....
#C3-14      ... .. .a. ....
#C3-12      ... .. .a. ....
#C3-05      ... .. .g. ....
#C3-04      ... .. .a. ....
#C3-16      ... .. .a. .g. ....
#C3-02      ... .. .g. ....
#C3-01      ... .. .a. ....
#C3-18      ... .. .a. ....
#C3-09      ... .. .g. ....

#BZ167-NIH acc tag tat aaa caa tga gac acc agg gat tag ata tca gta caa tgt gct tcc aca ggg atg gaa agg atc acc agc aat att cca aag tag cat gac
#C3-06      ... .. .t. ....
#C3-20      ... .. .t. ....
#C3-08      ... .. .t. ....
#C3-07      ... .. .t. ....
#C3-11      ... .. .t. ....
#C3-03      ... .. .t. ....
#C3-17      ... .. .t. ....
#C3-10      ... .. .t. ....
#C3-14      ... .. .t. ....
#C3-12      ... .. .t. ....
#C3-05      ... .. .t. ....
#C3-04      ... .. .t. ....
#C3-16      ... .. .t. ....
#C3-02      ... .. .t. ....
#C3-01      ... .. .t. ....
#C3-18      ... .. .t. ....
#C3-09      ... .. .t. ....

```

ANEXO IV



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)