

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

**Avaliação Genotípica e Fenotípica de Isolados de HIV-1 Circulantes no  
Brasil - Caracterização do Longo Terminal Repetitivo da Extremidade 5´**

**GERALDO JOSÉ ARGÔLO FERRARO**

Rio de Janeiro

2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

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

Ferraro, Geraldo José Argolo

F376a Avaliação genotípica e fenotípica de isolados de HIV-1 circulantes no Brasil -  
Caracterização do longo terminal repetitivo da extremidade 5 [manuscrito] /  
Geraldo José Argolo Ferraro. - 2007.

147 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho, Laboratório Avançado  
de Saúde Pública.

1. HIV-1. 2. Expressão Gênica. 3. Genética. 4. Filogenia. I.Título.

CDU 616.98:575

**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Avaliação Genotípica e Fenotípica de Isolados de HIV-1 Circulantes no Brasil -  
Caracterização do Longo Terminal Repetitivo da Extremidade 5´**

**Geraldo José Argôlo Ferraro**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

**Orientação**

Dr. Bernardo Galvão Castro Filho  
Laboratório Avançado de Saúde Pública  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz  
Fundação Oswaldo Cruz – Ba

Rio de Janeiro - RJ  
Agosto de 2007

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**GERALDO JOSÉ ARGÔLO FERRARO**

**Avaliação Genotípica e Fenotípica de Isolados de HIV-1 Circulantes no Brasil -  
Caracterização do Longo Terminal Repetitivo da Extremidade 5´**

**Orientador: Dr. Bernardo Galvão Castro Filho**

**Aprovada em 28 de Abril de 2008**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. José Carlos Couto Fernandez**

**Profa. Dra. Maria fernanda Rios Grassi**

**Profa. Dra. Simone Kashima**

*À Rosa-dos-ventos:  
Marilza Argolo Ferraro  
Andréa Argolo Ferraro e Natalie Argôlo Pereira  
(No Leste nasce o sol, nos demais pontos, cada uma delas)*

*Agradecimentos especiais aos que contribuíram de maneira decisiva para o meu crescimento científico e edificação pessoal, em conversas despreziosas, momentos de reflexão filosófica, e ricas discussões intermináveis sobre os conceitos de quase tudo.*

*Doutores*

*Bernardo Galvão Castro Filho*

*Dumith Chequer Bou-Habib*

*e Humberto de Castro Lima*

*Mesmo acreditando que tudo já aconteceu inclusive o que está por vir, insisto em fazer cada vez melhor o que precisa ser feito, na ilusão de estar contribuindo para o desfecho do tempo. O destino me pertence apenas e simplesmente porque acontece comigo. Se me rebelo contra ele, assim mesmo continuarei sendo vítima daquilo que intuitivamente chamo de futuro, o que está por vir... Tudo já foi dito, mesmo antes de ter sido ouvido.*

*A vida é um capricho termodinâmico*

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao amigo Dr Bernardo Galvão, por sua contribuição inegável na maior parte de minha vida profissional, pela carinhosa camaradagem, generosidade e orientação**

**À Dra Flora Fernandes pela boa vontade, contribuição científica e entusiasmo.**

**À Dra Mariza Gonçalves Morgado pela orientação, compreensão, apoio e acolhimento da idéia central desse trabalho do primeiro ao último fôlego.**

**À Joana Paixão Monteiro, por sua intensa contribuição, amizade e por ter estado no lugar certa na hora certa.**

**Ao amigo Dr. Dumith Chequer Bou-Habib, pelo exemplo de rigorosidade científica, perseverança, orientação e amizade.**

**A Dr Humberto de Castro Lima, pela oportunidade profissional e de desfrute de sua enriquecedora companhia.**

**Ao colega Dr Luiz Carlos Junior de Alcântara, pelo incentivo e ajuda freqüente.**

**A Marco Antônio Gomes Mello, pelo apoio durante o isolamento dos vírus e pelo companheirismo ao longo dessa jornada.**

**A Antônio Marcos pela contribuição no estudo dos isolados de Salvador.**

**À Tanira Bastos Matutino e Tâmara Nogueira pelo convívio e contribuição.**

**Aos pacientes, que concordaram em participar deste trabalho, doando um pouco de si próprios e de suas histórias.**

**Aos amigos do curso de Biomedicina pelo apoio e torcida.**

**Ao Dr Luciano Zulbaran Goldani do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo acolhimento dessas idéias quando ainda germinavam.**

**A todos os membros da comunidade do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela cooperação constante.**

**Ao amigo Craig Milroy pela presença sempre proativa mesmo à distância.**

**À Dra. Inês Dourado e demais colaboradores do ISC pela produtiva parceria no manuscrito III.**



**Aos amigos e colegas do LASP, pelo doce convívio, muito obrigado a todos.**

**Aos amigos da comunidade Casa de Gera: Eu já fui! Pela homenagem sincera, carinho e paciência.**

**À FIOCRUZ, pela oportunidade conferida e ao Ministério da Saúde, pelo apoio logístico e financeiro de grande parte desse trabalho.**

**À FAPESB, pelo apoio financeiro.**

**À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, pelo apoio irrestrito.**

**À Casa do Estudante de Itaberaba e a todos os seus grandes homens e mulheres que comigo compartilharam as alegrias e dissabores dos primeiros passos dessa jornada.**

*À minha mãe, por seu amor incondicional, exemplo de dignidade e retidão... (Bússola).*

*Às minhas irmãs, que me amparam sempre, mesmo sem saberem... (Mapas).*

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS.....	01
1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1.....	05
1.3 MORFOLOGIA E GENOMA DO HIV-1.....	06
1.4 CICLO DE INFECÇÃO/REPLICAÇÃO.....	10
1.5 REGULAÇÃO GÊNICA DO HIV.....	10
1.6 TROPISMO CELULAR E PATOGENIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1.....	14
1.7 TROPISMO VIRAL PARA O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PATOGENES.....	17
1.8 TECIDO-ESPECIFICIDADE NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	18
1.9 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS ANTI-HIV/AIDS BASEADAS NOS MECANISMOS DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA VIRAL.....	24
<b>2 RACIONAL</b> .....	26
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>4 MATERIAL</b> .....	29
4.1 DESENHO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DAS AMOSTRAS.....	29
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	29
4.3 COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS.....	29
4.4 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA.....	30
4.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO FINAL DE AMPLIFICAÇÃO.....	32
4.6 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO.....	32

4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	32
4.8 ANÁLISE COMPARATIVA DOS POTENCIAIS SÍTIOS LIGADORES DE FATORES TRANSCRICIONAIS COM ASSINATURAS SUBTIPO ESPECÍFICAS... ..	33
4.9 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE HIV-1.....	34
<b>4.9.1 Células primárias e tumorais</b> .....	34
<b>4.9.2 Infecção de macrófagos</b> .....	35
<b>4.9.3 Ensaios de formação de sincício</b> .....	35
<b>4.9.4 Uso dos receptores de quimiocinas</b> .....	35
<b>5 RESULTADOS</b> .....	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES .....	37
5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO LTR-5' E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE FATORES TRANSCRICIONAIS .....	40
5.3 IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS SUBTIPO-ESPECÍFICAS NOS POTENCIAIS SLFT .....	45
5.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO GÊNICA TAR .....	47
5.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÔMICA DOS ISOLADOS DE PORTO ALEGRE .....	52
<b>5.5.1 Análise filogenética do gene pol</b> .....	52
<b>5.5.2 Análise comparativa das regiões LTR, gag, pol e env do HIV-1</b> .....	55
<b>5.5.3. Caracterização biológica dos isolados virais</b> .....	59
<b>6 MANUSCRITO I: GENETIC AND BIOLOGIC CHARACTERIZATION OF HIV TYPE 1 SUBTYPE C ISOLATES FROM SOUTH BRAZIL</b> .....	60
<b>7 MANUSCRITO II: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LONG TERMINAL REPEAT SEQUENCES FROM BRAZILIAN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1</b> .....	88
<b>8 MANUESCRITO III: HIV-1 SEROPREVALENCE IN THE GENERAL POPULATION OF SALVADOR, BAHIA STATE, NORTHEAST BRAZIL</b> .....	98
<b>9 DISCUSSÃO</b> .....	107
9.1 ISOLADOS DE SUBTIPO C CIRCULANTES NA CIDADE DE PORTO ALEGRE TAMBÉM APRESENTAM O SÍTIO ADICIONAL PARA NF $\kappa$ B.....	107
9.2 ISOLADOS DE SUBTIPO C APRESENTAM COM EXCLUSIVIDADE O SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA A SUBUNIDADE DO FATOR NUCLEAR $\kappa$ B, CONHECIDO COMO C-REL .....	107

9.3 OS SÍTIOS SP1 TRAZEM ASSINATURAS SUBTIPO ESPECÍFICAS E SE APRESENTAM COM RELATIVA CONSERVAÇÃO DENTRE AS AMOSTRAS ANALISADAS.....	108
9.4 A REGIÃO TATA BOX É CONSTANTE E EXTREMAMENTE CONSERVADA DENTRE OS ISOLADOS BRASILEIROS ESTUDADOS .....	109
9.5 A REGIÃO TAR E O GRAMPO RNA-TAR APRESENTAM CARACTERÍSTICAS SUBTIPO-ESPECÍFICAS .....	109
9.6 A REGIÃO NRE DA LTR-5´ APRESENTA SÍTIOS COM C ARACTERÍSTICAS SUBTIPO ESPECÍFICAS .....	111
9.7 A IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS RECOMBINANTES E A CONFIRMAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DESSE FENÔMENO COMO ELEMENTO GERADOR DA DIVERSIDADE VIRAL .....	112
9.8 PREDOMÍNIO DOS SUBTIPO B E C NAS REGIÕES LTR DE ISOLADOS BRASILEIROS .....	114
9.9 LTRS DE ISOLADOS DE SUBTIPO C APRESENTAM MAIOR NÚMERO DE SÍTIOS RELACIONADOS COM OS FATORES TRANSCRICIONAIS, INCLUINDO OS COM ATIVIDADE ESPECÍFICA NO SISTEMA NERVOSO, DO QUE OS ISOLADOS DE SUBTIPO B.....	116
9.10 OS ISOLADOS DE SUBTIPO C BRASILEIROS APRESENTAM COMPORTAMENTO BIOLÓGICO TÍPICO .....	118
9.11 A CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS E A ADAPTABILIDADE VIRAL .....	119
9.12 IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO LTR EM PERSPECTIVAS PRÁTICAS .....	120
<b>10 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>122</b>
<b>11 CONCLUSÕES .....</b>	<b>124</b>
<b>12 REFERENCIAS.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>142</b>
ANEXO 1 -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	143
ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO DE PESQUISA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS.....	145

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Contribuição das principais formas genéticas do HIV-1 para a epidemia global de AIDS no ano de 2004 .....	3
<b>Figura 1.2:</b> Distribuição das principais formas genéticas do HIV-1 no Mundo em 2004.....	3
<b>Figura 1.3:</b> Modelo esquemático do mecanismo de regulação da expressão gênica do HIV-1. Retirado de HIV Sequence Compendium 2000.....	11
<b>Figura 1.4:</b> Representação esquemática da estrutura do genoma do HIV-1 com destaque para o promotor viral e a região TAR com a correspondente estrutura secundária do grampo RNA TAR .....	12
<b>Figura 4.1:</b> Representação esquemática do genoma do HIV-1, com destaque para os fragmentos dos genes amplificados .....	31
<b>Figura 5.1:</b> Gráfico do cálculo de saturação para o alinhamento da região genômica LTR-5', obtido no programa DAMBE .....	41
<b>Figura 5.2:</b> Árvore filogenética neighbor-joining da região LTR (450bp), enraizada com SIVmac. ....	43
<b>Figura 5.3:</b> Freqüência de ocorrência de potenciais sítios de ligação a fatores transcricionais com atividade em neuroglia.....	44
<b>Figura 5.4:</b> Freqüência de ocorrência de potenciais sítios de ligação a fatores transcricionais com atividade em fagócitos, linfócitos e monócitos .....	44
<b>Figura 5.5:</b> Caracterização de assinaturas subtipo-específicas nos potenciais SLFT TCF15 e Regulador Autoimune .....	46
<b>Figura 5.6:</b> Caracterização de assinaturas subtipo-específicas nos potenciais SLFT Tal 1-alfa e AP-4.....	46
<b>Figura 5.7:</b> Caracterização de assinaturas subtipo-específicas nos potenciais SLFT v-Maf.....	47
<b>Figura 5.8:</b> Identificação dos polimorfismos pontuais da região TAR dos isolados de Porto Alegre .....	48

<b>Figura 5.9:</b> Representação esquemática da estrutura secundária das Sequências TAR de diferentes subtipos.....	48
<b>Figura 5.10:</b> Representação esquemática da estrutura secundária do grampo RNA TAR modelado no programa <i>RNA folding</i> .....	49
<b>Figura 5.11:</b> Árvore filogenética <i>neighbor-joining</i> de 46 cepas de HIV-1, com base no fragmento do gene <i>pol</i> com 1150-pb.....	53
<b>Figura 5.12:</b> Identificação do padrão recombinante BC.....	54
<b>Figura 5.13:</b> Padrões genéticos do fragmento <i>pol</i> dos isolados de Porto Alegre .....	54
<b>Figura 5.14:</b> Contribuição gênica dos subtipos de HIV-1 para a composição dos isolados de Porto Alegre .....	57
<b>Figura 5.15:</b> Análise filogenética dos isolados de Porto Alegre (RS) com fragmentos genômicos concatenados .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Número global de infecções causadas pelas principais formas genéticas de HIV-1 por região do mundo em 2004 .....	02
<b>Tabela 1.2:</b> Função e localização das proteínas estruturais do HIV-1 .....	08
<b>Tabela 1.3:</b> Função e localização das proteínas regulatórias (tat e rev) e acessórias (vif, vpu, vpr e nef) do HIV-1.....	09
<b>Tabela 4.1:</b> Iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos e posição relativa à cepa de referência HXB2.....	31
<b>Tabela 5.1:</b> Dados demográficos e comportamentais dos pacientes de Porto Alegre .....	38
<b>Tabela 5.2:</b> Caracterização do grupo completo de pacientes originários do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – Salvador.....	39
<b>Tabela 5.3:</b> Dados dos pacientes originários de Salvador incluídos no estudo .....	40
<b>Tabela 5.4:</b> Caracterização molecular dos isolados de Porto Alegre e Salvador envolvendo as regiões gênicas LTR, gag, pol e env.....	56
<b>Tabela 5.5:</b> Caracterização Fenotípica dos isolados de subtipo C de Porto Alegre .....	59

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AHP - {2-amino-6[2-(ciclopropilmetoxi)-6-hidroxifenil]-4-i1-nicotinonitrili}
- AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida
- AP-1 – proteína ativadora 1
- AP-4 – proteína ativadora 4
- ATF – fator de ativação de transcrição
- C/EBP – do inglês, CCAAT/*enhancer-binding protein*
- cAMP – AMP cíclico
- CBP/p300 – CREB-*binding protein*
- CCR5 – do inglês, *chemokine (C-C motif) receptor 5*
- CD4 – do inglês, *cluster of differentiation 4*
- Cdk9 – ciclina 9
- Cels/mm<sup>3</sup> - células por mm<sup>3</sup>
- COUP-TF - do inglês, *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*
- CREB - do inglês, cAMP-*responsive element binding protein*
- CRF - Forma recombinante circulante; do inglês, *circulating recombinant form*
- CXCR4 – do inglês, *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*
- CycT1 – ciclina T1
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- DT – tropismo duplo
- EGCg – do inglês, *epigallocatechin gallate*
- EMSA – ensaio de troca de mobilidade eletroforética
- Env* - gene do envelope do HIV-1
- Ets – do inglês, *E-twenty six avian erythroblastosis virus oncogene*
- GABP – do inglês, *GA-binding protein*
- gag* - gene *gag (group-specific antigen)* do HIV-1
- GATA – fator de ligação GATA
- Gp 41 – glicoproteína 41
- Gp120 – glicoproteína 120
- HAART – terapia anti-retroviral de alta atividade
- HAD – demência associada à AIDS
- hGCN5 – do inglês, Human GCN5



HIV -1 - vírus da imunodeficiência humana tipo 1  
HIV -2 - vírus da imunodeficiência humana tipo 2  
HMG – do inglês, *high mobility group*  
IFN – interferon  
IL-2 – interleucina 2  
IL-6 – interleucina 6  
Inr – iniciador do core da região promotora  
IS – indutor de sincícios  
LASP – Laboratório Avançado de Saúde Pública  
LBP-1 – proteína ligadora de lipopolissacarídeo 1  
LDP-43 – proteína ligadora de DNA TAR  
LEF-1 – Fator de ligação potencializador linfóide  
LTR-3' - longo terminal repetitivo da extremidade 3'  
LTR-5' – longo terminal repetitivo da extremidade 5'  
M – do inglês, *major*  
ML – do inglês, *maximum likelihood*  
N – do inglês, *non major/non outliers*  
*nef* - gene *nef* (*negative factor*) do HIV-1  
NF-AT – Fator nuclear de ativação de células T  
NF-AT- do inglês, *nuclear factor of activated T cells*  
NF-IL-6 - fator nuclear interleucina 6  
NF-KapaB (NF-κB) – fator nuclear KapaB  
Ngn1/3 – neuroginina  
NIS – não indutor de sincícios  
NJ - do inglês, *neighbor-joining* (algoritmo de reconstrução de árvores filogenéticas)  
NKX5-2 – fator de transcrição homeodomínio NKX  
NRE – elemento de resposta negativa  
NRRE – elemento de resposta ao receptor nuclear  
nt – nucleotídeo  
P –TEFb – do inglês, *positive transcription elongation factor*  
PAUP\* - *Phylogenetic analysis under parsimony \*and other methods* (programa de filogenia)

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico  
pCAF - p300/CBP-associated factor  
PCR - reação da polimerase em cadeia  
*pol* - gene da polimerase do HIV-1  
PPARalfa – do inglês, *peroxisome proliferator activated receptors alpha*  
PPARGama – do inglês, *peroxisome proliferator activated receptors gamma*  
PRDI – do inglês, *positive regulatory domain I*  
P-TEFb – complexo kinase fator b positivo para alongação da transcrição  
R3 – vírus capazes de utilizar o receptor CCR3  
R5 - vírus que utiliza o receptor CCR5  
R5X4 - vírus com capacidade de utilizar simultaneamente os receptores CCR5 e CXCR4  
RAR – receptores de ácido retinóico  
RNA - ácido ribonucléico  
RNA TAR – transcrito resultante da região TAR  
RNAm – RNA mensageiro  
SIV - vírus da imunodeficiência símia  
SLFT – sítio de ligação aos fatores transcripcionais  
SNC – sistema nervoso central  
Sp-1 - do inglês, *specificity protein 1*  
T3R – receptor ao hormônio da tireóide T3  
TAR – elemento responsivo da transativação  
*tat* - gene *tat* (*transcriptor activator*) do HIV-1  
Tat – Proteína ativadora da transcrição do HIV-1  
TCF-15 – fator celular de transcrição 15  
TCF-1alfa – fator alfa de células T  
TCLA – célula tumoral adaptada de laboratório  
TFIID – fator transricional IID  
TL – Tropismo para linfócitos  
TM – monocitotrópicos ou macrofagitrópicos  
TNF-alfa – do inglês, *tumor necrosis factor  $\alpha$*   
TNF-beta - do inglês, *tumor necrosis factor  $\beta$*

TVM – modelo transversional

U – unidade internacional

UNAIDS – Programa de AIDS das Nações Unidas

*vif* – fator de infectividade viral

*vpr* – proteína viral R

*vpu* – proteína viral U

X4 – vírus que utiliza o receptor CXCR4

YY1 – Fator transcricional celular Yin Yang 1

## RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de investigar as características moleculares e biológicas dos subtipos de HIV-1 circulantes em Porto Alegre e Salvador, para avaliar se essas características estão relacionadas com o perfil da epidemia de HIV/AIDS no Brasil. Vinte e oito isolados foram estudados a partir da análise molecular dos genes *gag*, *pol* e *env*, além da região LTR-5', avaliando-se as relações filogenéticas, além da identificação e caracterização dos potenciais sítios de ligação aos fatores transcricionais, presença de sítios ligantes de fatores de transcrição, assinaturas específicas e o comportamento biológico dos isolados de subtipo C. Os resultados confirmam a prevalência dos subtipos B, C e F dentre as amostras originárias de Porto Alegre e B e F entre as originárias de Salvador. Dentre as amostras de Porto Alegre foi possível a genotipagem de 22 isolados para o gene *gag*, sendo 41% (09/22) de subtipo B, 55% (12/22) de subtipo C e 4% (01/22) de subtipo F; 14 para o gene *pol*, sendo 43% (06/14) de subtipo B, 50% (07/14) de subtipo C e 7% (01/14) recombinante CB; 20 para o gene *env*, 60% (12/20) de subtipo B, 30% (06/20) de subtipo C e 10% (02/20) de subtipo F; 13 para a região LTR-5' 69% (09/13) de subtipo B e 31% (04/13) de subtipo C. Em relação às 06 amostras originárias da cidade de Salvador, foram investigados os genes *gag* com 01 isolado de subtipo F e 05 recombinantes BF, *env* com 01 isolado de subtipo F e 05 de subtipo B, além da região LTR-5' com todos os isolados classificados como de subtipo B. Adicionalmente, foram identificados também diversos fenômenos de recombinação intergênica, envolvendo os diversos fragmentos gênicos avaliados. Considerando-se os genes amplificados de todas as amostras estudadas, 50% (14/28) apresentaram algum tipo de evento recombinante, envolvendo diferentes genes ou dentro de um mesmo gene. A variabilidade genotípica foi bastante expressiva também ao longo da região LTR-5', o que conota o caráter plástico do promotor de ativação gênica do HIV-1, inclusive com a identificação do sítio adicional para NF-kappaB nos 04 isolados de subtipo C brasileiros. Uma outra contribuição importante deste trabalho foi a identificação de uma maior frequência dos potenciais sítios de ligação aos fatores transcricionais para os isolados de subtipo C, em comparação com os isolados de subtipo B. Esta tendência foi identificada inclusive para potenciais sítios de ligação funcionais em células neurogliais, apontando para um possível tropismo preferencial para o sistema nervoso central dos isolados de subtipo C em comparação com os isolados de subtipo B. Em relação ao comportamento biológico pôde-se confirmar também o predominante caráter não indutor de sincícios para os isolados de subtipo C, mesmo para vírus isolados de pacientes em fase de AIDS. Os resultados aqui descritos ampliam o conhecimento sobre as características moleculares e biológicas do HIV-1 circulante no país. Além disso, algumas evidências aqui levantadas lançam novas perguntas acerca da biologia viral e sua relação com a história natural da infecção pelo HIV-1, contudo algumas dessas questões necessitam da condução de experimentos funcionais para serem esclarecidas.

## ABSTRACT

More than twenty five years after the original case descriptions of AIDS, the human immunodeficiency virus continues to be one of the principal public health problems in Brazil and throughout the world. The LTR-5' region of HIV-1 is associated with the regulation of viral genetic expression and integration into the cellular genome. The possibility that additional binding sites for transcription factors are related to epidemiological profiles of the viral subtypes has been suggested. In fact, the subtype that has the highest global prevalence (subtype C) frequently contains an additional site for the NF-kappaB transcription factor. The important sub-epidemic of subtype C in the Southern region of Brazil and other geographic regions of the world suggests that the dissemination of the virus might be related to the viral attributes of this genetic variant. Thus, the objective of this work was to investigate the molecular and biological characteristics of HIV-1 subtypes circulating in Porto Alegre and Salvador, in order to evaluate whether these characteristics are related to the epidemic profile of HIV/AIDS in Brazil. Twenty-eight isolates were studied with molecular analysis of the *gag*, *pol* and *env* genes and the LTR-5' region. Phylogenetic relationships were evaluated, as were the identification and characterization of potential binding sites for transcription factors, the presence of binding sites for additional transcription factors, specific signatures, and biological behavior of the subtype C isolates. The results confirm the prevalence of subtypes B, C and F in the samples originating from Porto Alegre, and of subtypes B and F among those from Salvador. Genotyping of the *gag* region in 22 of the 28 isolates from Porto Alegre indicated that 9 (41%) were subtype B, 12 (55%) were subtype C, and 1 (4%) was subtype F. In addition, 14 isolates were genotyped in the *pol* region: 6 (43%) were found to subtype B, 7 (50%) were subtype C, and 1 (7%) recombinant CB. A total of 20 samples were subtyped for *env*, 12 of which (60%) were subtype B, 6 (30%) were subtype C and 2 (20%) were subtype F; of the 13 isolates that were subtyped in the LTR-5' region, 9 (69%) were subtype B, and 4 (31%) were subtype C. Six samples from Salvador were subtyped in *gag*: 1 was found to be subtype F and the other 5 were BF recombinants; in *env* there was 1 isolate that was subtype F and 5 that were subtype B, and all isolates were subtype B in the LTR-5' region. In addition, diverse intergenetic recombination phenomena involving these genetic fragments were identified. Considering all genes evaluated here, it was found that 50% (14 of 28) of the amplified genes evaluated here were found to have some form of recombinant event, either involving different genes or within the same gene. The genotypic variability was also very expressive in the LTR-5' region, which suggests a plastic character of the promotor for the genetic activation of HIV-1. In addition, an extra site for NF-kappaB in the 4 Brazilian subtypes C isolates was identified. The results of this study contribute to the knowledge of the molecular and biological characteristics of HIV-1 circulating in the country. In addition, some of these observations raise new questions about viral biology and its relationship with the history of HIV-1 infection. Together, these questions require functional experiments to further clarify.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS

Os níveis extremamente altos de variabilidade genética e biológica do HIV representam, certamente, importantes componentes para o impacto da epidemia e também se destacam como obstáculos para a efetividade dos programas de tratamento, estratégias de prevenção e controle da epidemia. Esforços nacional e internacional têm possibilitado o estudo da evolução da epidemia e o mapeamento da distribuição genotípica do HIV pelo mundo. Foram estabelecidas normas e critérios para a definição das categorias virais do HIV como grupo, subtipo ou forma recombinante circulante. Além da distância filogenética, é necessária a descrição de pelo menos três sequências completas ou quase completas. Os pacientes relacionados não devem ter relação epidemiológica direta e as sequências devem ainda ser filogeneticamente semelhantes entre si ao longo de todo o genoma viral (Robertson 1999). Até o momento foram descritos nove subtipos conhecidos do grupo M (A [sub-subtipos A1-A4], B, C, D, F [sub-subtipos F1 e F2], G, H, J e K) e diversas formas recombinantes circulantes. (Robertson et al 2000; Vidal et al., 2006). Além disso, foi reportada a ocorrência de um grupo de vírus altamente divergente, identificado com distribuição restrita ao Oeste africano (República dos Camarões, Gabão e Guiné Equatorial na África) (Gürtler et al. 1996), classificados como grupo “O”, do inglês “Outliers”. Outra cepa extremamente divergente foi também identificada no Oeste africano, tendo sido classificada como grupo “N” (Robertson et al 2000). O Grupo “N” (*non-M/non-O*), descrito por último, é o que, dentre todos os grupos, apresenta a menor dispersão, documentado até 1998, em apenas dois indivíduos da República dos Camarões (Simon et al. 1998). O subtipo B do HIV-1 encontra-se disseminado principalmente nas Américas, Europa, Japão, Austrália e Caribe; o subtipo A e D predominam na África Sub-Sahariana; o subtipo D na África do Sul e Índia; o subtipo F no Brasil e Romênia, G e H na Rússia e África Central; o J e o K na África e o C em quase todo o mundo (Tabela 1.1). Curiosamente, o subtipo C apresenta a maior prevalência dentre todas as demais formas genéticas do HIV-1, com uma contribuição de mais de 50% de todos os casos do mundo (Fig. 1.1), estando presente principalmente nas epidemias da África, Índia e Brasil (Tabela 1.1).

A tabela 1.1 mostra a epidemiologia global do HIV-1 e apresenta a distribuição dos subtipos e principais CRFs por região geográfica. Já foram identificadas pelo menos três dezenas de CRFs prevalentes em diferentes regiões geográficas do mundo, dentre elas a CRF12\_BF que ocorre na América do Sul, inclusive no Brasil, recombinantes entre os subtipos B e F (Thomson 2000, Thomson 2002<sup>a</sup>, Sá-Filho et al 2006). O fenômeno de recombinação tem sido reconhecido como um importante fator adicional para a variabilidade do HIV, atuando como um potencial mecanismo para a emergência de novas variantes genotípicas de HIV, que, inclusive, podem concorrer para a alteração das propriedades biológicas e antigênicas. Alguns recombinantes foram identificados como responsáveis pela rápida emergência de subepidemias em algumas regiões do mundo; como Tailândia, China e Oeste europeu (Revisto em Hemelaar 2006). Um resumo do perfil de distribuição das principais formas genéticas do HIV-1 pelo mundo é apresentado na figura 1.2.

Tabela 1.1- Número global de infecções causadas pelas principais formas de HIV-1 por região do mundo em 2004.

Tabela 1. Número global de infecções causadas pelas principais formas genéticas de HIV-1 por região do mundo em 2004

Região do Mundo	A	B	C	D	F	G	H	J	K	CRF01_AE	CRF02_AG	CRF03_AB	Outros recombinantes
América do Norte	0.05	24.23	0.02	0.07	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.05	0.00	0.03
Canha	0.00	10.19	0.02	0.01	0.05	0.02	0.18	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.66
América Latina	0.00	31.18	1.10	0.25	32.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.57
Oeste Europeu	0.20	12.29	0.06	0.27	0.88	0.56	0.03	0.00	0.55	0.19	0.63	0.00	0.47
Leste Europeu e Ásia Central	24.68	5.37	0.14	0.00	7.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49	0.21	100.00	0.00
Índia	1.25	0.29	25.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.31	0.00	0.00	1.91
Sul e Sudoeste Asiático (excluindo Índia)	0.00	3.58	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	83.00	0.00	0.00	2.51
Leste Asiático	0.29	10.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.35	0.18	0.00	15.77
Oceania	0.00	0.76	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.02	0.00	0.01
Norte e Meio Oeste Africano	0.70	0.99	0.80	25.74	0.00	0.00	0.00	1.38	0.00	0.00	0.30	0.00	1.63
Oeste Africano	27.11	0.01	0.19	3.47	11.16	89.38	4.42	25.76	2.55	0.88	94.32	0.00	29.16
Leste Africano (excluindo Etiópia)	28.45	0.11	5.03	43.21	1.88	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	35.60
Etiópia	0.44	0.00	7.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
África Central	15.69	0.11	1.20	22.45	35.13	9.04	95.37	65.70	96.90	4.37	4.28	0.00	6.76
Sudoeste Africano	1.13	0.60	58.11	4.52	10.69	0.61	0.00	6.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91

Adaptado de Hemelaar J. et al. (2006).

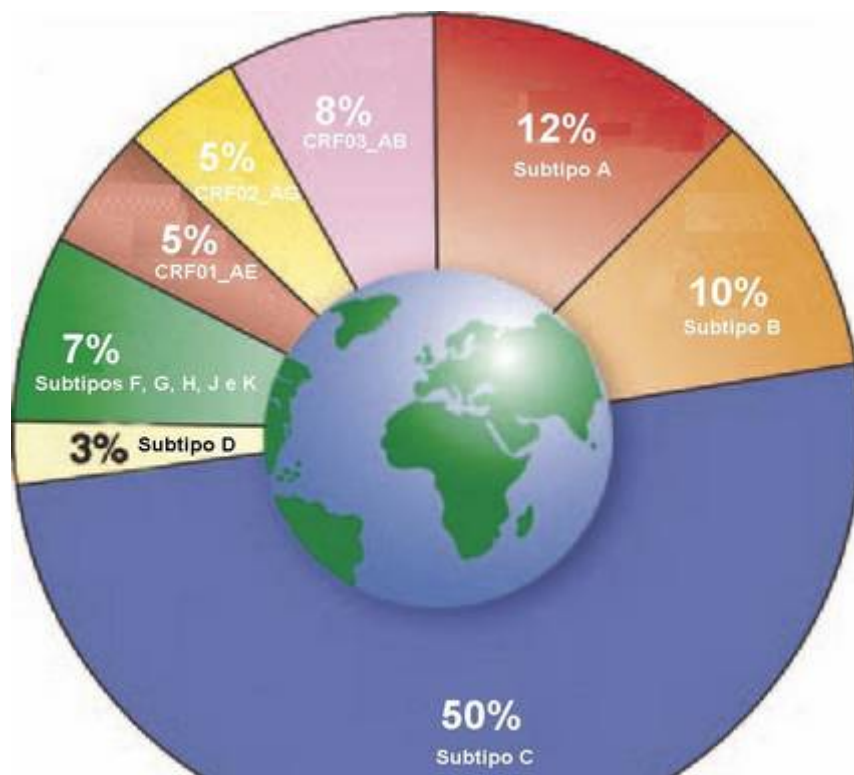


Figura 1. Contribuição das principais formas genéticas do HIV-1 para a epidemia global de AIDS no ano de 2004. Adaptado de Hemelaar J. et. al. (2006).

Figura 1.1- Contribuição das principais formas genéticas do HIV-1 para a epidemia global de AIDS no ano de 2004.

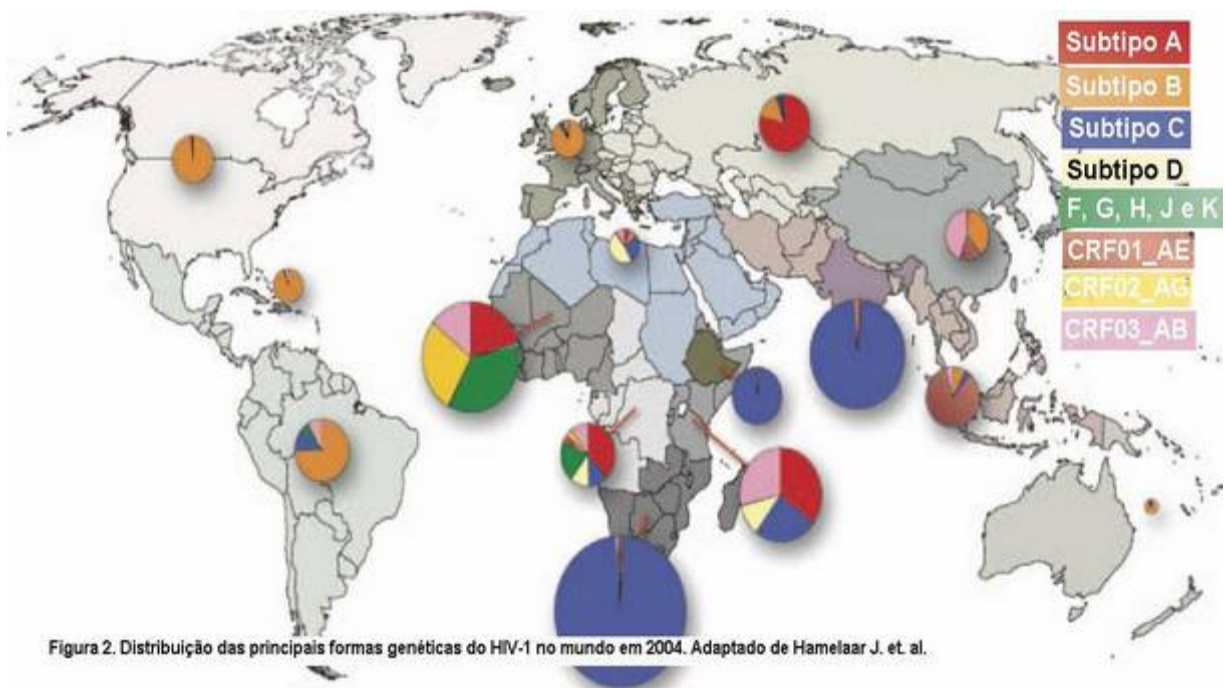


Figura 2. Distribuição das principais formas genéticas do HIV-1 no mundo em 2004. Adaptado de Hamelaar J. et. al.

Figura 1.2- Distribuição das principais formas genéticas do HIV-1 no mundo em 2004.



Apesar dos esforços na tentativa de se relacionar o polimorfismo do HIV com as suas características fenotípicas, ainda não está clara a associação entre os componentes genéticos dos diferentes subtipos com os atributos biológicos tais como: aumento da transmissibilidade e infectividade, velocidade de progressão para AIDS, sensibilidade aos agentes neutralizantes e terapêuticos e demais relações entre o vírus e o hospedeiro (Phan et al. 2000, Soto-Ramirez et al. 1996, Shaffer et al 1999). Entretanto, como será exposto adiante, a identificação dos fatores da superfície das células alvo do hospedeiro, utilizadas pelo HIV para a infecção, foi de grande valia para o esclarecimento das bases moleculares do processo de interação vírus-célula, o que permitiu o entendimento do tropismo viral e o fenômeno de formação de sincícios em culturas de células T de linhagens tumorais. Têm sido proposta a correlação entre o polimorfismo da região LTR do HIV-1 e a velocidade de avanço para a fase de AIDS em pacientes infectados (Ramírez et al. 2007). Em suma, as potenciais implicações da variabilidade genética e biológica do HIV para a saúde pública e especificamente para a efetividade da terapêutica anti-HIV/AIDS corrente e/ou futuras estratégias de controle e profilaxia, bem como o diagnóstico, a qualidade dos derivados de sangue e o desenvolvimento de drogas e vacinas anti-HIV/AIDS são de difícil estimativa.

Ilustrativamente pode-se citar as diferenças entre os tipos 1 e 2 do HIV: Embora o HIV-2 compartilhe o mesmo modo de transmissão do HIV-1, a distribuição do tipo 2 permanece restrita ao Oeste da África, onde as taxas de prevalência têm sido estáveis ao longo do tempo, e com uma tímida introdução na Índia. Em contraste, a distribuição do HIV-1 tem crescido exponencialmente não apenas na África, mas na maioria dos países em desenvolvimento. De fato, estudos epidemiológicos prospectivos têm demonstrado que o HIV-2 é menos transmissível que o HIV-1, tanto por via sexual quanto perinatal (Marlink et al. 1994). Curiosamente, o HIV-2 apresenta um acentuado multitropismo para os receptores de quimiocinas. Quanto à velocidade de progressão para a AIDS, parece claro que pacientes portadores de infecção pelo HIV-2 evoluem mais lentamente para a fase de AIDS do que aqueles contaminados pelo HIV-1 ou com dupla infecção (Marlink et al 1994). No entanto, esta diferença ainda não está clara entre os subtipos. Certamente alguns fatores como diagnóstico tardio, condições

nutricionais desfavoráveis, inacessibilidade a cuidados médicos de qualidade, aliado a elevadas incidências de outros patógenos oportunistas, como a tuberculose, por exemplo, devem ser importantes para a transmissibilidade, patogênese e progressão para AIDS.

Os primeiros estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil identificaram a presença majoritária do subtipo B e, por isso, imaginou-se que o perfil da epidemia de AIDS no País seria semelhante ao encontrado na Europa e Estados Unidos (Potts et al. 1993). No entanto, em seguida, outros estudos identificaram a emergência de isolados do subtipo F (Morgado et al. 1994; Louwagie et al., 1994) e recombinantes B/F (Sabino et al. 1994), além do C (WHO 1994). Estudos mais recentes, com maior poder amostral, identificaram novos subtipos, como o D (Morgado et al. 1998). Outros trabalhos de caracterização genotípica de isolados de HIV-1 no Brasil descreveram a substituição do aminoácido prolina por triptofano (GPGR→GWGR), caracterizando um variante chamado de B” (B brasileiro) (Morgado et al. 1996). Aproximadamente 40% dos vírus de subtipo B circulantes no Brasil são da variante B” (Covas et al. 1998).

Uma importante dúvida para o desenvolvimento de vacinas é se a eficácia de vacinas anti-HIV/AIDS pode ser determinada pelos subtipos genéticos de HIV, que deveriam ser estudados durante a fase III dos testes de avaliação da eficácia de vacinas, com capacidade de detecção de “clades” homotípicos ou heterotípicos específicos com proteção cruzada. Para contemplar este quesito, a preparação de cada teste de avaliação de vacinas deve ser dirigida a grupos populacionais em que as infecções sejam causadas por no mínimo 2 diferentes subtipos genéticos de HIV. Além disso, a determinação do tamanho da amostra, bem como o cálculo da eficácia da vacina contra cada subtipo genético, a base de dados sobre prevalência, incidência e as possíveis interfaces na dinâmica entre os variantes virais são eventos particulares para cada região geográfica, de acordo com a circulação e prevalência de subtipos, bem como a bagagem genética, cultural, características sócio-econômicas e demográficas.

## 1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUAMANA TIPO 1

O HIV-1 é um membro da família *Retroviridae* e subfamília *lentivirinae*, que utiliza como células-alvo para a infecção e replicação aquelas que apresentam o

marcador de membrana CD4 (linfócitos T CD4<sup>+</sup> e monócitos/macrófagos, células de Langerhans e microgliais) (Pantaleo et al. 1995). Uma característica básica dos retrovírus é o carregamento da informação genética em fitas de RNA. Durante a retrotranscrição do RNA viral para DNA pela enzima transcriptase reversa, o genoma do vírus pode sofrer alterações em sua seqüência de DNA, acarretando grande variabilidade genotípica, o que se reflete na emergência de partículas virais com diferente expressão fenotípica (Simmonds et al. 1990). Tal fato se deve aos limites de acurácia da transcriptase reversa e à dinâmica da replicação viral (Takeuchi et al. 1989, Ho et al. 1995). A rápida produção de novos vírus permite que grande número de gerações virais se suceda em um período de tempo muito curto, resultando no acúmulo de mutações pontuais que alteram a suscetibilidade dos vírus aos multiterápicos (Perelson et al. 1997), assim como os perfis fenotípicos da população viral (Coffin, 1995). Além disso, o fenômeno de recombinação a partir de episódios de superinfecção de um organismo por mais de um subtipo viral, contribue ainda mais para o aumento do polimorfismo do HIV-1.

### 1.3 MORFOLOGIA E GENOMA DO HIV-1

O HIV-1 é uma partícula esférica de cerca de 110nm de diâmetro, constituído externamente por um envoltório de natureza lipoprotéica, associado às glicoproteínas do envelope, cujo peso molecular de suas unidades é de 120 Kd (gp120) para a proteína externa e 41 Kd (gp41) para a porção transmembranar (Chan *et al.* 1998). As proteínas do envelope se complexam três a três, de forma não covalente, espalhando-se por toda a superfície do envelope viral (Chan *et al.* 1998). Internamente, as proteínas que integram a matriz (p17, 17 Kd), circundam o nucleocapsídeo, o qual alberga duas fitas de RNA e as enzimas associadas transcriptase reversa, integrase, e as proteases (Zeichner et al. 1994). O genoma do HIV-1 possui cerca de 10 kb de comprimento, delimitado por duas regiões denominadas LTR-5' e LTR-3' (*long terminal repeats*), entre as quais se encerram três genes constitutivos: *env* (codifica para uma proteína precursora, gp160, cuja clivagem origina as glicoproteínas do envelope viral gp120 e gp41); *pol* (codifica para as proteínas com propriedades enzimáticas, transcriptase reversa p66 e p51, protease p11, e integrase p32); e *gag* (codifica para as proteínas do nucleocapsídeo, p24) (Zeichner et al. 1994), e seis genes regulatórios: *tat*,

gene transativador, que regula a replicação viral e determina a expressão final de todos os genes virais; *nef*, ou fator negativo, que está relacionado com o controle da expressão dos genes virais; *rev*, gene responsável pela regulação da expressão de proteínas virais envolvidas no transporte e processamento dos genes constitutivos, sendo também capaz de antagonizar a expressão do gene *tat*; *vpr*, *vpu* e *vif*, que parecem estar relacionados com os processos de maturação, empacotamento e brotamento do vírus, bem como a infectividade das partículas virais (Cullen et al. 1998). As funções e localização das proteínas estruturais, regulatórias e genes acessórios do HIV-1 estão sumarizados nas Tabelas 1.2 e 1.3.

Tabela 1.2- Função e localização das proteínas estruturais do HIV-1

<b>Nome</b>	<b>Origem</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
p16	<i>gag</i> (p55)	Região interna do envelope viral	Constitui a matriz com associação ao envelope viral
p24	<i>gag</i> (p55)	Capsídeo viral	Constitui o core viral
p19	<i>gag</i> (p55)	Região interna do core viral	Constitui o nucleocapsídeo
p6	<i>gag</i> (p55)		
Protease	Poliproteína <i>gag-pol</i>	Sítios de maturação das partículas virais	Cliva a poliproteína <i>gag-pol</i> nos produtos finais; requerida na etapa final de maturação do virion
Transcriptas e reversa	Poliproteína <i>gag-pol</i>	Interior do virion maduro; citoplasma durante a transcrição reversa	DNA polimerase a partir do RNA genômico (transcrição reversa) e RNase H
Integrase	Poliproteína <i>gag-pol</i>	Interior do virion maduro; núcleo celular durante a integração do provírus	Catalisa a integração do cDNA viral no DNA da célula hospedeira
Env (gp120)	<i>env</i> (gp160)	Envelope viral; associada com gp41	Medeia a interação inicial entre o vírus e a célula hospedeira; interage com a molécula CD4 e receptores de quimiocinas
Env (gp41)	<i>env</i> (gp160)	Envelope viral	Ancoramento à membrana celular, mediando a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula

Tabela 1.3 - Função e localização das proteínas regulatórias (*tat* e *rev*) e acessórias (*vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*) do HIV-1.

	<b>Origem</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
Tat		Atua no núcleo	Potente transativador da expressão dos genes virais; sinal de localização nuclear do complexo de pre-integração viral
Rev		Atua no núcleo	Exporta do núcleo ao citoplasma RNAs mensageiros sem "splice" ou com "splice" único. regula a transição entre a expressão gênica inicial e tardia
Vif			Afeta a infectividade do virion
Vpu	Mensageiro bicistrônico <i>vpu-env</i>	Região perinuclear e Golgi	Facilita o processamento e exportação das proteínas do <i>env</i> ; inibe a formação dos complexos gp160-CD4. Reduz expressão de CD4
Vpr		Virion maduro	Ativação modesta da transcrição; sinaliza a localização nuclear do grande complexo de pre-integração viral
Nef		Desconhecida	Aumenta a replicação viral <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Reduz a expressão de CD4

## 1.4 CICLO DE INFECÇÃO/REPLICAÇÃO

O ciclo biológico do HIV-1 tem início com o acoplamento da partícula viral à molécula de CD4 e aos receptores de quimiocinas presentes na membrana da célula-alvo. A proteína da superfície viral, gp120, interage com a molécula CD4 (Ugolini et al. 1999) e a ligação entre ambas induz mudanças conformacionais e exposição de outros sítios da gp120. Em seguida, a gp120 interage com uma das moléculas da família dos receptores de quimiocinas (CCR5 e CXCR4 principalmente), formando um complexo ternário (Ugolini et al. 1999). Este complexo gp120/CD4/receptor de quimiocina, induz a uma nova alteração na conformação das proteínas do envelope viral, permitindo a participação da gp41, que se ancora na membrana plasmática através de um de seus sítios hidrofóbicos (Ugolini et al. 1999). Essas reações culminam na fusão do envelope viral com a membrana plasmática e a introdução do nucleocapsídeo, contendo genoma e enzimas virais, no citoplasma da célula (Doms et al. 1997). Em seguida, a enzima transcriptase reversa transcreve o RNA viral em DNA. Este por sua vez, é transportado para o núcleo da célula, integrado ao genoma por ação da integrase, recebendo o nome de provírus (Zeichner et al. 1994). A partir daí, com o uso da maquinaria biossintetizadora da célula, o provírus é repetidamente traduzido em suas proteínas. As proteínas virais são clivadas pela ação das proteases, migrando em seguida para os sítios de maturação, nas imediações da membrana plasmática, de onde brotam as partículas virais em busca de novas células hospedeiras (Zeichner et al. 1994).

## 1.5 REGULAÇÃO GÊNICA DO HIV

Imediatamente após a infecção de uma célula pelo HIV, o vírion RNA é copiado para DNA e o genoma proviral é transportado para o núcleo onde é integrado ao genoma celular. Uma vez integrado no cromossomo, o HIV-1 se torna alvo da regulação transcricional pelos fatores de transcrição celular e por suas próprias proteínas regulatórias. A transcrição do HIV é controlada primariamente pela proteína transativadora (Tat), que regula a expressão viral através do controle da elongação da transcrição do provírus mediada pela RNA polimerase II. Na ausência de Tat, o início da leitura na LTR-5' é eficiente, mas a transcrição é impedida pelo pobre encaixe entre o promotor e a polimerase, fazendo com que a polimerase se dissocie prematuramente da fita de DNA durante a transcrição (Fig. 1.3). A habilidade da região LTR do HIV em

funcionar como promotor foi primeiro descrita por Sodroski e colaboradores (1985), que identificaram o papel da proteína Tat na transativação do genoma viral. Dessa forma, Tat parece participar de um mecanismo de retroalimentação positiva que assegura altos níveis de transcrição do HIV, acompanhada da ativação da célula infectada. Estas observações demonstram que a proteína Tat, além de sua propriedade transativadora, funciona como um fator de alongação da fita de RNA (Barboric et al. 2001). O centro de controle da regulação transcricional do HIV-1 se encontra na região LTR-5 e se caracteriza por apresentar seqüências comuns a outras regiões promotoras da transcrição gênica celular. A região promotora da transcrição do genoma viral apresenta uma estrutura geral, típica dos promotores relacionados com a RNA polimerase II, com dois sítios de ligação para NF- $\kappa$ B, três sítios de ligação para SP-1 e uma região TATA Box, da LTR, também reconhecida por alguns autores como CATA box (van Opijnen et al 2004a). Finalmente, encontra-se a região TAR (Região Responsiva da Transativação), cujo transcrito primário funciona como sítio de ligação à proteína Tat (Karn 1999). O transcrito resultante da região TAR (RNA TAR) é composto de uma haste, um bojo e uma alça (Fig. 1.4), cuja configuração é crucial para a ligação da proteína Tat (Jeeninga et al. 2000).

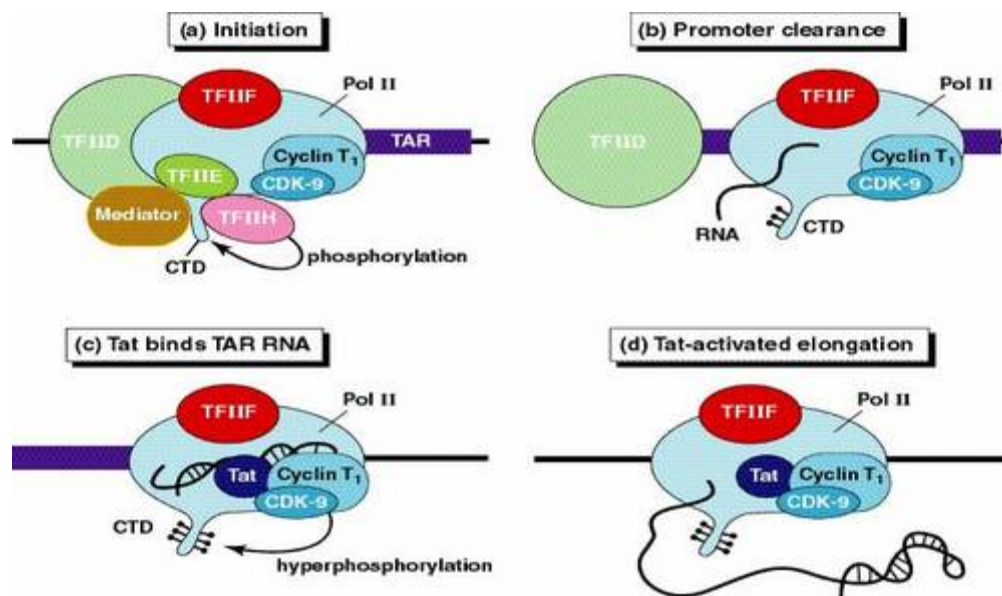


Figura 1.3 - Modelo esquemático do mecanismo de regulação da expressão gênica do HIV-1. Retirado de HIV Sequence Compendium 2000.



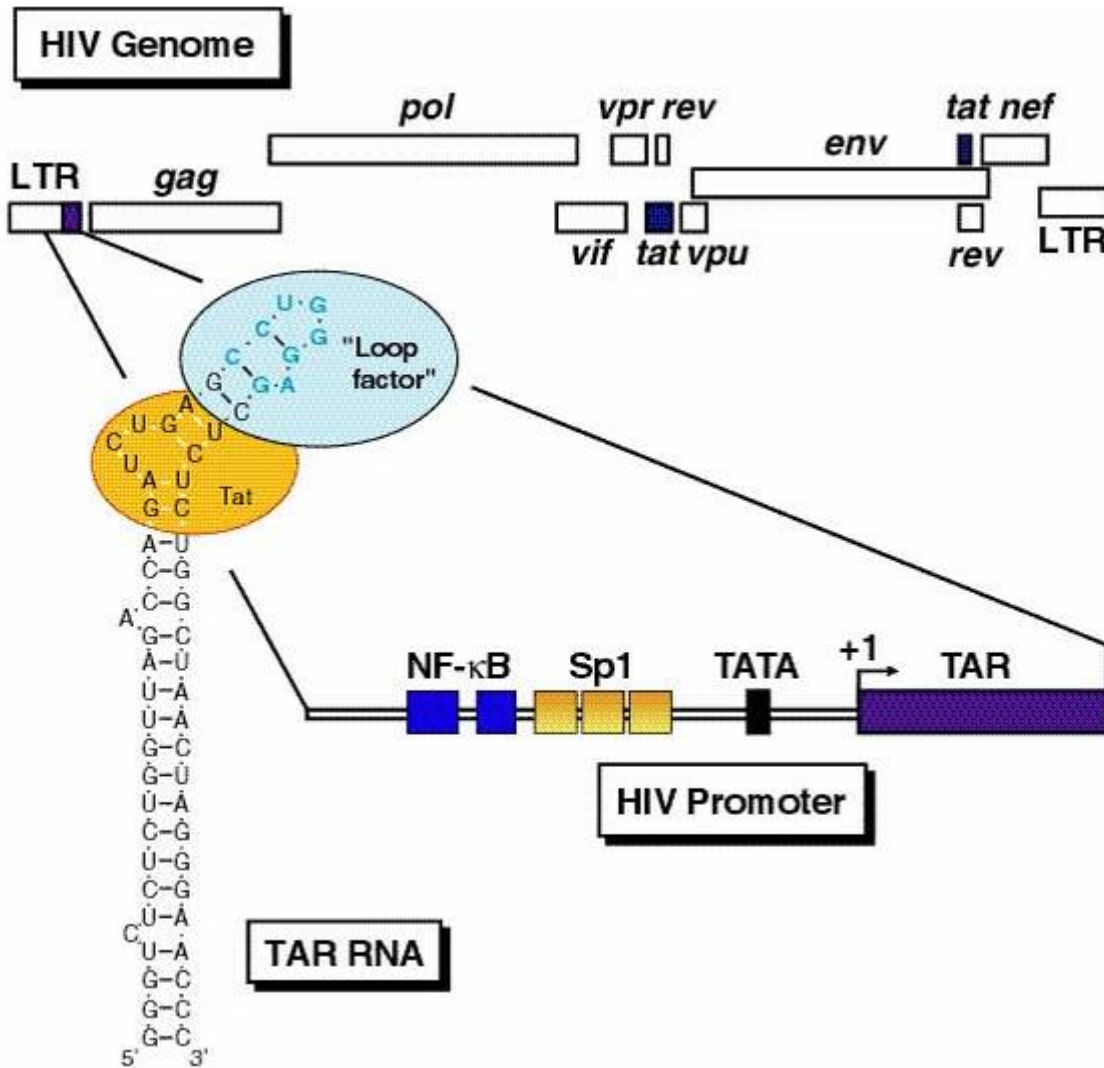


Figura 1.4- Representação esquemática da estrutura do genoma do HIV-1 com destaque para o promotor viral e a região TAR com a correspondente estrutura secundária do grampo RNA TAR. A região do bojo está realçada em laranja e a alça apical da estrutura com a seqüência nucleotídica característica em azul. Retirado de HIV Sequence Compendium 2000 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/reviews.html>).

Apesar da maioria dos estudos sobre os mecanismos de transcrição enfatizar o papel da proteína Tat durante a fase de alongação da transcrição, a característica chave, embora ainda pouco entendida, para este novo sistema regulatório reside na habilidade da região LTR do HIV-1 em estabelecer uma taxa de transcrição apenas basal na ausência da proteína Tat (Sune & Garcia-Blanco 1995). Em células que se dividem o HIV é transcrito quase que imediatamente após a infecção. Contudo, algumas células T após a infecção entram em estado de quiescência resultando em um estado de latência do provírus integrado que assim pode permanecer

transcricionalmente silencioso, até que a célula receba algum sinal mitogênico. Esta habilidade que o vírus apresenta de manter a infecção de forma latente, auxilia o HIV a estabelecer infecções persistentes apesar da intensa resposta imune contra as proteínas virais. Quando células T residentes do tecido linfóide são ativadas, os provírus latentes podem eficientemente infectar células adjacentes através da transferência de vírions no contato célula a célula (Grossman et al., 1998; Pantaleo et al., 1993). Isto torna extremamente difícil a ação bloqueadora dos anticorpos em virtude da inacessibilidade das partículas virais.

Uma outra consequência da latência transcricional do HIV envolve a criação de um grande e estável reservatório de variantes genéticas, cujas cepas resultantes apresentam propriedades fenóticas que permitem o desenvolvimento de resistência à resposta imune e à ação das drogas antiretrovirais (Wei et al., 1995).

A característica mais importante da proteína Tat esta, sem dúvida, relacionada com o seu envolvimento na ativação e inativação do promotor do provírus. Além dos elementos presentes no centro da região promotora, o HIV-1 contém normalmente dois sítios de ligação para NF- $\kappa$ B, localizados próximos ao sítio de início da transcrição, TAR. Estudos utilizando a LTR viral como gene reporter demonstraram o papel central do fator transcricional NF- $\kappa$ B na ativação do provírus (Nabel e Baltimore, 1987). Em células T em repouso e na maioria das linhagens de célula T, o NF- $\kappa$ B é seqüestrado no citoplasma pela proteína inibidora I $\kappa$ Balfa (Baeuerle & Henkel 1994). Após a exposição das células a antígenos, ou tratamento das mesmas por agentes mitogênicos inespecíficos tal como a fitohemaglutinina, o NF- $\kappa$ B é liberado em uma reação seqüencial de fosforilação, com ação da ubiquitina que degrada o I $\kappa$ B-alfa. Uma vez liberado, o NF- $\kappa$ B é então translocado para o núcleo onde será capaz de ativar a transcrição de uma grande variedade de promotores, incluindo o presente na LTR do HIV (Nabel & Baltimore 1987; Perkins et al 1993).

Modelos de ativação da transcrição do HIV indicam que o aumento nos níveis de NF- $\kappa$ B estimula exclusivamente as taxas de iniciação da transcrição na LTR viral. De acordo com esses modelos, a proteína Tat é produzida inicialmente, simplesmente porque o promotor presente no LTR pode ser acessado por uma pequena fração de complexos de transcrição, capazes de produzir fortuitamente transcritos de comprimento total (Marciniak e Sharp, 1991). Parece que além de processos com

resultantes estocásticas, algum mecanismo específico esteja envolvido para garantir a produção inicial da proteína Tat (Sune & Garcia-Blanco 1995).

Algumas evidências sugerem que o NF- $\kappa$ B atue estimulando ambos, início da transcrição, e em menor grau, alongação. Após a integração no genoma da célula hospedeira, o provírus é associado às histonas e enovelado como nucleossomos que são posicionados em regiões precisas ao redor do promotor (Sheridan et al 1997; Van Lint et al 1996). O arranjo da cromatina na região do provírus dificulta a transcrição pela oclusão do sítio de início da transcrição. Parece que o NF- $\kappa$ B está envolvido no processo de mobilização das histonas e afrouxamento dos nucleossomos para exposição do sítio de início da transcrição (Sheridan et al 1997; Van Lint et al 1996).

A atividade sinérgica do NF- $\kappa$ B e Tat em estimular a transcrição proviral atua como um mecanismo molecular que regula a transição do estado de infecção latente para a replicação lítica. Em HIV-2 e SIV, onde se encontra, em geral, apenas um sítio de ligação para NF- $\kappa$ B, proteínas regulatórias adicionais, semelhantes a aquelas com atividade realçadora, devem estar envolvidas no aumento das taxas iniciais de transcrição (Sakuragi et al. 1991). Alternativamente, o fato do HIV-2 apresentar uma quantidade menor de motivos ligadores de NF- $\kappa$ B do que o HIV-1 parece coincidir com sua também menor dispersão geográfica, o que remete a uma possível relação com as propriedades de infectividade desses vírus. Além disso, esse fato também corroborou a especulação entre a presença de um terceiro motivo ligador de NF- $\kappa$ B em isolados do subtipo C e sua maior dispersão, em comparação com os demais subtipos.

## 1.6 TROPISMO CELULAR E PATOGÊNICA DA INFECÇÃO PELO HIV-1

O tropismo celular é determinado pela presença das moléculas CD4 e dos receptores de quimiocinas nas células-alvo, em conjunto com o tipo de seqüência de aminoácidos da alça V3 da gp120 de cada vírus e sua decorrente carga elétrica. O aumento da virulência, e da carga viral, e a progressão mais rápida para a fase de AIDS podem estar relacionados com a evolução do tropismo e também com o multitropismo da população viral presente no paciente (Bhattacharyya et al. 1996, Connor et al. 1997).

Assim, parece haver uma relação direta entre a evolução do tropismo celular e as manifestações clínicas do indivíduo infectado nas diversas fases da infecção. Os

vários mecanismos de interação entre o HIV-1 e a célula hospedeira são de crucial importância na progressão para a AIDS (Wolinsky et al. 1996). É possível que o aumento da replicação viral provoque uma maior dinâmica de mutações na gp120, favorecendo a emergência de variantes virais capazes de utilizar os múltiplos correceptores (Xiao et al. 1998). Alternativamente, eventos ativadores do sistema imune que levem à modulação na expressão ou produção de quimiocinas podem funcionar como mecanismos selecionadores, permitindo também a emergência dos variantes virais multitrópicos (Xiao et al. 1998). Provavelmente ambos, tanto os determinantes virais quanto os relacionados com o hospedeiro, sejam críticos para a evolução da infecção e deflagração da fase de AIDS (Coffin 1995, Wolinsky et al. 1996, Fauci et al. 1996). A evolução para o multitropismo pode, portanto, representar uma vantagem adaptativa importante para o HIV-1 durante o curso da infecção, já que este possibilita o aumento do número de células-alvo e pode favorecer o escape de mecanismos inibitórios (Virelizier et al. 1998). O fenótipo multitrópico pode, portanto, representar um instante decisivo no curso da infecção para a deflagração da fase sintomática da infecção (Virelizier et al. 1998).

Tanto os vírus R5 quanto os X4 podem ser transmitidos para outros indivíduos. No entanto, acredita-se que os R5 sejam mais freqüentemente transmitidos (Zhu et al. 1993). De fato, durante o estágio assintomático da infecção pelo HIV-1, que pode durar vários anos, são isolados quase exclusivamente variantes R5 (Pantaleo et al. 1997). Além disso, o surgimento dos variantes X4 ou R5X4 está relacionado com o instante clínico de dramática queda do número de células T CD4<sup>+</sup> circulantes e conseqüente depressão da resposta imune, e concomitante progressão para o quadro clínico característico de AIDS (Schuitemaker et al. 1992). Cepas R5 estão envolvidas em mais de 90% dos casos de transmissão primária da infecção pelo HIV-1, enquanto cepas X4, como já foi dito, surgem apenas em períodos relativamente mais adiantados da infecção em aproximadamente 50% dos pacientes (Richman et al. 1994, Cohen et al. 1999). A dinâmica de transição que determina o surgimento das formas fenotípicas X4 ou R5X4 a partir da infecção primária por cepas R5, ainda é pouco conhecida. Entretanto, sabe-se que a emergência das cepas X4 ou R5X4 está relacionada com mutações na alça V3, mais especificamente com a substituição de resíduos negativamente carregados por outros de carga positiva ao longo da alça V3 (Collman et

al. 1992, York-Higgins et al. 1990, de Jong et al. 1992, Kuiken et al. 1992, Hwang et al. 1991, Takeuch et al. 1991, Battacharyya et al. 1996).

Foi identificada, em uma série de indivíduos que não se infectavam por HIV-1, apesar de múltiplas exposições, a presença de uma proteína CCR5 defeituosa, resultante de uma deleção de 32 pares de bases em seu gene. Esta mutação resulta na tradução de uma proteína que não é expressa na superfície da célula (Zimmerman et al. 1997, Dean et al. 1996). A presença em homozigose do gene mutante confere uma considerável resistência à infecção pelo HIV-1, enquanto sua presença em heterozigose está relacionada com uma progressão mais lenta para o quadro de AIDS (Samson et al. 1996, Zimmerman et al. 1997, Dean et al. 1996, Biti et al. 1997, O'Brien et al. 1997, Eugen-Olsen et al. 1997, Pantaleo et al. 1997). A identificação de raros indivíduos homozigotos para deleção de 32 pares de bases no CCR5, infectados por HIV-1 (O'Brien et al. 1997) sugere que vírus X4 podem ser transmitidos, ou, alternativamente, a utilização de um outro receptor, substituindo o CCR5 na função de correceptor para os vírus transmitidos durante a infecção primária.

São ainda desconhecidos os mecanismos que favorecem a transmissão de R5 em relação a X4. No entanto, algumas especulações são sugeridas. A baixa expressão de CXCR4 em relação à CCR5 em células cervicais e do cólon poderia explicar, pelo menos em parte, a maior predominância dos variantes virais R5 na transmissão por via sexual. Berger e colaboradores (1999) discorrem sobre a possibilidade da ocorrência de sítios de replicação em reservatórios enriquecidos por células com alta expressão de CCR5 e escassez de CXCR4, ou que altas concentrações de citocinas, bloqueariam cepas X4 logo após a transmissão, durante a instalação da infecção primária no organismo. Ainda, a presença das células de Langerhans no trato genital feminino e seu fenótipo CCR5+/CXCR4-, remete para a possível participação crítica dessas células durante a infecção primária, o que justificaria o padrão inicial de isolados predominantemente R5 em transmissões por via sexual (Zaitseva et al. 1997).

Os mecanismos que propiciam a emergência das cepas X4, indutoras da formação de sincícios, são bastante debatidos. Uma possibilidade é baseada na elevação da taxa de expressão de CXCR4 e redução de CCR5 em linfócitos T CD4+ quando ativados (Carrol et al. 1997, Valentin et al. 1998), ou o aumento da produção de  $\beta$ -quimiocinas mediada pela infecção por cepas X4 (Margolis et al. 1998). Além disso,

observou-se que  $\beta$ -quimiocinas estimulam a replicação de cepas X4 (Kinter et al. 1998). Juntos, estes achados parecem sugerir que o bloqueio da entrada de isolados R5 em células-alvo exerceria in vivo, uma pressão seletiva que induziria a mudança do uso de correceptor (de CCR5 para CXCR4) pela população viral do paciente. Como a metodologia utilizada nesses estudos de fenotipagem viral baseia-se freqüentemente na detecção de variantes em células do sangue periférico. Berger et al. (1999) comentam que a freqüência dos variantes X4 pode estar sendo subestimada, diante da possibilidade de que tais vírus possam estar mais presentes em compartimentos de difícil acesso, dificultando assim sua detecção.

## 1.7 TROPISMO VIRAL PARA O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PATOGÊNESE

Foi demonstrada que a dispersão viral no organismo hospedeiro, atingindo o sistema nervoso central (SNC), ocorre no início da infecção (An et al 1999). E que cerca de 20% dos pacientes infectados apresentaram algum tipo de comprometimento das funções do SNC, em consequência deste estímulo inflamatório crônico (McArthur et al 1999). A redução das taxas virêmicas decorrente da administração da terapia anti-retroviral de alta atividade (HAART) está relacionada com o coincidente decréscimo da prevalência de casos de demência associada à AIDS (HAD) (Saktor et al 2002). Foi verificado, entretanto, que algumas das drogas integrantes do coquetel anti-HIV/AIDS não tem ação no SNC, permitindo a emergência associada de cepas virais resistentes (Enting et al 1998, Smit et al 2004). Apesar dos esforços em pesquisa sobre HAD, os mecanismos precisos de evolução para esse quadro bem como os atributos moleculares que direcionam a instalação da infecção no tecido nervoso, ainda não foram completamente esclarecidos. A exemplo do que ocorre no sangue periférico, os isolados obtidos a partir do tecido nervoso são principalmente de fenótipo R5 (Reddy et al 1996, Cunningham et al 2000), apesar da demonstração do potencial neurotóxico intrínseco proposto para as cepas X4, presentes com freqüência em pacientes com AIDS (Zheng et al 1999). Em um trabalho de estudo da carga viral, avaliada a partir do fluido cérebro-espinhal de pacientes soropositivos, foi demonstrada uma relação de aumento de risco para o desenvolvimento de HAD – Demência associada ao HIV (Ellis et al 2002). Parece claro que a infecção pelo HIV-1 produz uma desregulação generalizada nas funções imune e inflamatória nas células do SNC, cuja relação de

estímulo e resposta leva ao estabelecimento de um ambiente potencialmente neurotóxico que conduz à lesão neuronal (Poluektova et al. 2004, Persidsky et al. 2003, Bezzi et al. 2001, Turchan et al 2003). As micróglia, principais células com função macrofágica do SNC, constituem-se como as principais responsáveis pela infecção produtiva deste compartimento (Cosenza 2002). É também possível que outras células do SNC como astrócitos e neurônios também se infectem com o HIV-1 (Trillo Pazos et al. 2003).

## 1.8 TECIDO-ESPECIFICIDADE DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A região LTR é dividida em regiões funcionais: Elemento de resposta a transativação – TAR, *core*, potencializador e região modulatória. A região TAR é o sítio de ligação à proteína Tat. A região do *core* contém o iniciador (Inr), o TATA Box (CATA Box), e os três sítios de ligação a SP1. O elemento potencializador se liga aos fatores nucleares, NF- $\kappa$ B e NF-AT (Fator nuclear de ativação de células T). A região modulatória abriga diversas seqüências alvo para uma variedade de fatores transcricionais celulares como IL-6, CREB, Ets e receptores de hormônios nucleares (Garcia & Gaynor 1994, Kingsman & Kingsman 1996, Pereira et al 2000). Os fatores transcricionais envolvidos na regulação da ativação da LTR atuam tanto pela sua ligação direta às seqüências de DNA, como também indiretamente, via reconhecimento das proteínas já ligadas. O HIV apresenta uma capacidade extraordinária de adaptar suas estratégias transcricionais a diferentes microambientes presentes em diferentes células (van Opijnen et al. 2004b). Além disso, os diferentes compartimentos do hospedeiro já impõem por eles próprios, diversidade ambiental, decorrente da fase de ativação ou desenvolvimento.

O fator transcricional da família multigênica Sp1 modula a transcrição gênica do HIV-1 a partir da ligação direta desses fatores aos sítios específicos localizados adjacentes à seqüência TATA-box. Esses sítios, presentes em número de três, (Sp1I, Sp1II e Sp1III) estão envolvidos de maneira essencial no processo de transcrição do HIV-1. Alguns estudos sugerem que a proteína Sp1 pode servir como uma ancora para a ligação indireta de outros fatores transcricionais (Rohr et al. 1997, Demarchi et al. 1993, Millhouse et al. 1998, McAllister 2000, Rohr et al . 1999b). Isto pode ser observado por exemplo em micróglia e células T Jurkat onde se observa a participação sinérgica de

estímulo à ativação, a partir da ligação de COUP-TF à proteína Sp1 ligada ao seu respectivo sítio (Rohr et al. 1997, Rohr et al. 1999b). Sp-1 também é capaz de interagir com NF-IL-6 repercutindo em inibição da transcrição em células da glia (Schwartz et al. 2000). A interação cooperativa entre os fatores específicos que se ligam aos elementos Sp1 e NF- $\kappa$ B é requerida para uma ativação potencializada ótima do HIV-1 (Perkins et al. 1993). Em qualquer compartimento a interação entre Sp1 e Tat é requerida para uma transativação ótima (Kamine & Chinnadurai 1992, Jeang et al. 1993). O complexo kinase fator b positivo de alongação da transcrição (P-TEFb) é formado por uma ciclina T e a kinase CDK9. P-TEFb é recrutado para a região TAR e se constitui como um componente essencial para o mecanismo de transativação viral mediado por Tat. Tanto a afinidade como a especificidade de ligação da proteína Tat ao RNA TAR são potencialmente ampliadas na presença do P-TEFb. A ação crucial do P-TEFb para a atividade efetiva de transcrição gênica do HIV-1 consta de um evento adicional de fosforilação do domínio carboxi-terminal da RNA polimerase II, que uma vez hiperfosforilado, estimula a leitura plena do provírus graças à manutenção do processo de alongamento transcricional (Dahmus 1995, Mancebo et al. 1997 Zhu et al. 1997). Em alguns promotores Sp1 é capaz de atuar em substituição à Tat, recrutando a subunidade CycT1 do P-TEFb para a LTR e promovendo a transcrição (Yedavalli et al. 2003). Enfim, a atividade de Sp1 parece ter uma importância crucial para a eficiente transcrição gênica do HIV-1. Mutações nos sítios Sp1 da região LTR levam à perda do poder de transativação mediado pela proteína Tat. Em micróglias, na ausência do sítio Sp1, a atividade de Tat é restaurada a partir do recrutamento do receptor nuclear COUP-TF (Rohr et al. 2000).

Mutantes naturais como a cepa de HIV-1 Y2, cuja composição do sítio Sp1III foi drasticamente alterada, replica timidamente em cultura de células T, mas o faz com bastante eficiência em células de origem monocíticas (McAllister et al. 2000). Alguns trabalhos têm demonstrado correlação entre a taxa de evolução para AIDS e a variabilidade genotípica da região correspondente aos sítios de ligação a Sp1 presente nos isolados carregados por esses pacientes (Kirchhoff et al. 1997, Fang et al. 2001, McAllister et al. 2000, Ramírez et al. 2007).

Os fatores nucleares da família  $\kappa$ B estão envolvidos no controle de uma série de processos celulares, tais como: resposta imune, resposta inflamatória,



desenvolvimento, crescimento celular e apoptose. Um grande número de estímulos participam da ativação da via NF- $\kappa$ B. As subunidades p50 e p65 (RelA) compõem o fator NF- $\kappa$ B. O mesmo é um residente citoplasmático que se encontra sob a forma inativa, complexado ao inibidor I $\kappa$ B. Quando sob o efeito de estímulos específicos o NF- $\kappa$ B ativado é translocado para o núcleo da célula onde se ligam aos dois elementos NF- $\kappa$ B presente na LTR (Rabson & Lin 2000). Em células Jurkat estimuladas e micróglia foi verificado que a deleção de dois sítios NF- $\kappa$ B da LTR resultou em uma drástica queda nos níveis de transcrição (Rohr et al. 1999a, Rohr et al 1997). Foi demonstrado também a necessária ligação do heterodímero p50/p65 ao elemento ligador de NF- $\kappa$ B para a atividade transcricional do provírus em células de linhagem monocitóide (Jacque et al. 1996). Já em células T CD4+, LTRs cujas seqüências Sp1 e NF- $\kappa$ B eram mutantes não influenciaram na capacidade de replicação viral (Tsunetsugu-Yokota et al. 2000). Como descrito para Tat e Sp1, NF- $\kappa$ B também apresenta habilidade de recrutar P-TEFb e estimular o passo de alongamento transcricional pela RNA polimerase II (Barboric et al. 2001). A análise molecular da região LTR do HIV demonstra que existem características peculiares nos sítios de ligação a NF- $\kappa$ B entre os diversos subtipos. Enquanto a maioria dos subtipos apresenta normalmente dois sítios ligadores de NF- $\kappa$ B, o subtipo C apresenta um sítio adicional (Roof et al. 2002, Jeeninga et al. 2000). Foi demonstrado um fenômeno de evolução do sítio ligador de NF- $\kappa$ B em uma variante de LTR, com mudança de fator transcricional de ligação para uma proteína da família Ets, GABP, com restauração da capacidade de replicação viral (Verhoef et al 1999).

O fator nuclear de célula T ativada (NF-AT), a exemplo do que ocorre com o fator NF- $\kappa$ B, é translocado para o núcleo após ativação celular. Esta ativação se dá a partir do aumento no nível citoplasmático de cálcio, que ativa a calcineurina fosfatase, responsável pela desfosforilação do NF-AT, que ao ser transportado ao núcleo, liga-se com a proteína 1 ativadora 1 (AP-1) (Crabtree 1999). As proteínas NF-AT se ligam aos sítios NF- $\kappa$ B da região LTR. As duas proteínas, NF-AT1 e NF-AT2/NF-ATc parecem ter efeitos contrários em células diferentes. NF-AT1 atua como um ativador da transcrição em células T CD4+ primárias, principalmente as células T CD4 de memória (Cron 2000, Robichaud et al. 2002). Já em células T Jurkat, NF-AT1 parece modular negativamente a transativação por um processo de competição com NF- $\kappa$ B pelo sítio

respectivo na LTR, reprimindo assim a ativação mediada por Tat (Macian & Rao 1999). NF-AT2/NF-ATc é capaz de induzir um alto estado permissivo de replicação do HIV-1 em células T CD4+ primárias (Kinoshita et al. 1998). Em linfócitos naíve ou em repouso a atividade de expressão gênica do HIV parece reprimida, situação contrária ao observado para linfócitos ativados. Tanto os sítios NF- $\kappa$ B quanto NF-AT presentes na LTR medeiam a ativação transcricional (Mouzaki et al. 2000). De maneira sinérgica, NF-AT2 se liga ao sítio de NF- $\kappa$ B na LTR, interage com as proteínas NF- $\kappa$ B e Tat e garantem a transcrição e replicação viral (Kinoshita et al. 1998).

O fator de ligação potencializador linfóide (LEF-1) e o fator alfa específico de células T (TCF-1alfa) (Waterman & Jones 1990) também estão envolvidos na mediação do processo de ativação da transcrição do HIV-1. Esses fatores reconhecem e se ligam a sítios presentes na LTR do HIV-1 nas posições -122 e -142 em relação à cepa de referência HXB2. Mutações nessas regiões inibem a atividade potencializadora da transcrição em células Jurkat. A atividade desses fatores parece ser dependente de interação com a cromatina (Sheridan et al 1995).

Outro exemplo de modulação da transcrição genômica do HIV-1 relacionada com célula-especificidade é documentado em estudos sobre a família de fatores transcricionais como a proteína potencializadora de ligação a CCAAT (C/EBP) (Henderson et al 1997). Dois sítios de ligação a C/EBP estão presentes na LTR do HIV nas posições -170 e -110. A ligação de NF-IL-6, um dos membros da família C/EBP, à LTR, contribui fortemente para a ativação da transcrição viral em promonócitos U937 e macrófagos primários, mas não em linfócitos T CD4+ (Henderson et al 1996, Tesmer & Bina 1996, Henderson 1997). Os macrófagos infectados se relacionam com células endoteliais vizinhas pelo contato direto ou através dos mediadores inflamatórios. Esses estímulos se constituem como componentes do microambiente que favorecem a replicação compartimental do HIV-1. Nesse contexto foi demonstrada a participação de C/EBPbeta para a eficiência de ativação da LTR (Lee 2001). Em células monocíticas, a ação de C/EBP parece estar relacionada com o recrutamento de co-ativadores como as histonas acetiltransferases para a LTR (Lee 2002). No sistema nervoso central, em células gliais e micróglia, ocorrem duas proteínas membros da família C/EBP, NF-IL-6 e C/EBPgama. Embora NF-IL-6 atue como um potente ativador da transcrição viral, C/EBPgama tem uma ação inibitória sobre NF-IL-6. Durante o curso da infecção essas e

outras citocinas tendem a elevar o seus níveis de expressão e o balanço entre esses níveis parecem ser prejudiciais para a transcrição viral nesse compartimento (Bassuk et al. 1997). NF-IL-6 precisa da necessidade de interação direta com o DNA viral. Sua ação se efetiva a partir de sua associação cooperativa com NF- $\kappa$ B, Sp1, CREB ou com outros membros da maquinaria basal de transcrição celular (Schwartz et al. 2000, Ruocco et al. 1996, Ross et al 2001, Buckner et al. 2002). As taxas de cAMP em pacientes soropositivos são elevadas e a importância desse fenômeno no curso da infecção pelo HIV-1 tem sido bem estabelecida demonstrando sua relação com a proteína CREB (Hofmann et al. 1993). A infecção in vitro de células T de linhagem tumoral e linfócitos T primários leva ao aumento dos níveis de cAMP e este fenômeno funciona como um sinal para disparar o início de uma série de reações em cadeia envolvendo o fator de ativação da transcrição (ATF) e a proteína cinase A que culmina com a fosforilação de CREB, o recrutamento do adaptador de ligação de CREB além de fatores basais de transcrição que levam ao aumento da ativação da região promotora da LTR (Nordheim 1994). Uma sequência de reconhecimento de ligação para a família de CREB/ATF foi identificada a montante e próxima aos sítios de ligação a NF- $\kappa$ B (Krebs et al. 1997). Dois outros sítios de ligação para membros da família CREB/ATF foram identificados nas posições +92 a +102 e +160 a +167 da região LTR-5' (Rabbi 1997). Em células de linhagem monocíticas CREB interage com outros fatores transcripcionais como C/EBP e NF-IL-6, ligados aos seus respectivos sítios na LTR, interferindo na atividade de ativação (Ross et al. 1997). Contrariamente, em células T Jurkat CREB interfere de modo indireto estimulando a transcrição (Rohr et al. 1999b).

A proteína USF estimula a transcrição do HIV-1 através de sua ligação à região LTR, no sítio conhecido como elemento Inr localizado entre as posições -173 a -157 a jusante do sítio de início da transcrição da LTR (Du et al. 1993, d'Adda di Fagagna et al. 1995). O sítio físico de ligação de USF coincide com o sítio de ligação para NF-IL-6, gerando competição (Schwartz 2000, d'Adda di Fagagna et al. 1995, Tesmer 1993). Foram identificados dois sítios de ligação para fatores da família Ets, nas posições 195 a -104 e -140 a -160 da LTR, cujas respectivas associações contribuem para a ativação da transcrição viral (Seth et al. 1993). A interação entre Ets e USF no contexto da LTR é requerida para uma atividade transcricional otimizada em células T (Sieweke et al.

1998). Mutações no sítio de ligação para Ets estão relacionadas com o fenômeno de supressão da infecção em células T (Posada et al. 2000).

Diversos membros da superfamília de hormônios receptores nucleares (tireoidianos, retinóides, esteróides) estão envolvidos na modulação da atividade transcricional do HIV-1 através da LTR, em diferentes células e através de diferentes mecanismos moleculares. O elemento de resposta ao receptor nuclear (NRRE) está localizado na porção distal da LTR, posição -356 a -320 (Orchard et al. 1993, Ladas 1994, Lee et al. 1994, Canonne-Hergaux et al. 1995). Em células de coriocarcinoma e CV1 os receptores de ácido retinóico (RAR e RXR) estimulam a transcrição na presença de seus ligantes respectivos no contexto do NRRE (Ladas 1994, Lee et al. 1994). Em células de oligodendroglioma RAR e RXR ativam a transcrição na ausência de seus ligantes e apresentam comportamento contrário na presença dos mesmos. Esta resposta retinóide é mediada por diferentes interações moleculares durante a infecção pelas cepas LAI e JR-CSF e nenhum efeito significativo foi detectado em micróglias. (Sawaya et al. 1996). Outros fatores como Ra, RARalfa, T3R, PPARalfa, PPARgama, dentre outros têm sido relatados como agentes relacionados com a atividade de ativação da LTR, inclusive em associação com outros fatores transcricionais (Rohr et al 2003).

O elemento de resposta de ativação da proteína Tat (TAR) é capaz de se associar a alguns fatores com efeito repressivo à atividade transcricional. Proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP-1) e a proteína ligadora de DNA TAR (LDP-43) se ligam à região TAR da LTR e bloqueiam a atividade transcricional do HIV-1. LBP-1 inibe a ligação do fator transcricional IID (TFIID) ao elemento TATA (Yoon et al. 1994). TDP-43 por sua vez se liga ao DNA TAR, entre as posições -18 a +80, na presença ou não de Tat, bloqueando a montagem do complexo transcricional (Kato et al 1991, Ou et al. 1995).

O fator de transcrição celular Yin Yang 1 está relacionado com a ativação ou repressão da ativação gênica. No contexto da LTR YY1 coopera com o fator lisofilina para o reconhecimento de um sítio situado na posição -10 a +27 do promotor viral em células de origem linfocitárias ou monocíticas (Margolis et al. 1994, Coull et al. 2000). O mecanismo de repressão é explicado pelo recrutamento de histona deacetilase 1 para a região do nucleossomo 1, interferindo na ativação de Tat.

O supressor de tumor p53 regula o ciclo celular e a transcrição de diversos promotores celulares e virais (Subler et al. 1992). Uma possível ação repressora da ativação gênica do HIV-1 tem sido sugerida a partir da observação da inibição da atividade basal da LTR do HIV em células HeLa com superexpressão de p53 (Subler et al. 1992). Sua atividade parece estar relacionada com a região do core do promotor viral e também a partir de sua ligação à proteína Tat e supressão da transativação. As formas mutantes de p53 não apresentam ação supressora (Duan et al. 1994, Bargonetti et al. 1997, Li et al. 1995, Subler et al. 1994). A função transativadora da proteína Tat requer a presença dos sítios Sp1 e NF- $\kappa$ B, além da interação direta com a proteína Sp1 (Sune & Garcia-Blanco 1995, Kamine & Chinnadurai 1992, Jeang et al. 1993). Além disso, Tat se associa com diversos coativadores como CBP/p300 (110-112), pCAF (Kiernan et al. 1999) e hGCN5 (Col et al. 2001) que ajudam Tat na atividade transcricional. Os tipos de fatores que se associam a Tat dependem do tipo celular envolvido e das características da LTR em questão. Em células microgliciais, Tat interage fisicamente e coopera com COUP-TF para promover a transativação independente de NF- $\kappa$ B e Sp1. Este processo se constitui como uma via alternativa de transativação mediada por Tat quando a cepa viral apresenta mutações que impedem a ligação de Sp1 ou NF- $\kappa$ B à LTR (Rohr et al 2000). O estado de ativação celular e a fase do ciclo celular também influem nos mecanismos de transativação mediados por Tat (Kashanchi 2000). A proteína Tat também está envolvida na estimulação da síntese de diferentes fatores como IFN, NF- $\kappa$ B, TNF-alfa, TNF-beta, IL-2 e IL-6 e alguns desses fatores impõem um processo de retro-alimentação positiva, ampliando as taxas de transativação viral (Siebenlist et al. 1994, Roulston et al. 1995). A ação da proteína Tat se dá não apenas ao nível das células infectadas, mas também nas células não-infectadas, que interagem com a proteína viral secretada (Nicolini et al. 2001).

## 1.9 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS ANTI-HIV/AIDS BASEADAS NOS MECANISMOS DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA VIRAL

Os atuais protocolos terapêuticos anti-HIV/AIDS são baseados no uso de drogas inibidoras do sistemas de transcrição reversa e processamento das poliproteínas virais, conhecidas como inibidoras da transcriptase reversa e protease. Entretanto, outras etapas do ciclo viral do HIV-1 também se constituem como potenciais alvos para o

desenvolvimento de estratégias intervencionistas anti-HIV/AIDS (Baba 1997, De Clercq 2002). A etapa de transcrição viral é uma delas e estratégias com enfoque nos fatores transcripcionais como Sp1 e NF- $\kappa$ B têm sido propostas (Daelemans et al. 1999). Foi demonstrado a ação inibitória da replicação viral a partir de drogas que agem no contexto da transcrição viral como a EGCg e a temacrazina bistriazoloacridone (Yamaguchi et al. 2002, Turpin et al. 1998). Estudos baseados na modificação de fatores transcripcionais com cadeias de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco dirigidas ao sítio de ligação de Sp1 inibiu eficientemente a transativação no contexto da LTR (Reynolds et al. 2003). Um outro alvo de igual importância, por sua importância pivotal no mecanismo de transcrição viral do HIV-1, é certamente a proteína Tat e sua relação com os demais fatores envolvidos no processo de ativação completa do genoma do HIV-1.

## 2 RACIONAL

Os vírus do subtipo B têm sido exaustivamente estudados em seus aspectos genotípicos e fenotípicos, no entanto, ainda existem muitas lacunas no conhecimento dos vírus dos demais subtipos circulantes no Brasil. É possível que em um país com extensões continentais como o Brasil e com mapeamento epidemiológico molecular do HIV ainda incompleto, circule formas virais singulares, e restritas, com padrões biológicos incomuns, demandando, portanto, estudos mais completos da relação entre a variabilidade genotípica, suas características biológicas e possíveis implicações para a adoção de vacinas anti-HIV/AIDS. O subtipo C tem atualmente, um importante papel na pandemia de AIDS, contribuindo com quase 50% do número de casos em todo o mundo, sugerindo alguma característica distinta na capacidade de disseminação. Por outro lado, alguns autores reportam que os vírus do subtipo C não sejam encontrados sobre a forma SI, mais agressivos e relacionados com as fases de avanço da infecção.

O HIV-1 subtipo C tem sido encontrado em muitos países, e tem estabelecido epidemias significantes fora da África. Primeiramente reconhecido na Etiópia, Zâmbia, África do Sul, e Brasil, tem sido também identificado na Índia e Norte da Europa. O número de seqüência de isolados de HIV-1 do Brasil é ainda limitado quando se considera a grande extensão geográfica do país. Os estados do extremo sul do Brasil, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, correspondem à região onde o subtipo C foi primeiramente identificado no país e onde se encontra a maior soroprevalência. Em estudos de prevalência dos subtipos de HIV-1 da região nordeste do Brasil (Estados da Bahia, Sergipe e Fortaleza), têm sido detectados apenas isolados de subtipo B e F. Foi identificada uma única amostra do subtipo C na região Centro Oeste (estado de Goiás). Como descrito na literatura, a maioria dos isolados do subtipo C, foi detectada em pacientes pertencentes ao grupo de risco heterossexual. Estudos *in vitro* da replicação viral do HIV tem fornecido evidências que variantes de clones infecciosos podem conter dois ou três sítios de NF- $\kappa$ B, e aqueles que apresentam três sítios possuem uma cinética de replicação levemente mais rápida em linhagem de células MT-4. Têm sido demonstrado em epidemias na Tailândia, Etiópia e Índia o envolvimento do subtipo C com disseminação explosiva.

Os dados a respeito dos subtipos não B no Brasil, ainda são muito incipientes e necessitam de maiores estudos, inclusive contemplando a caracterização genotípica e

biológica dessas cepas. Maiores conhecimentos em relação à prevalência, características biológicas e genéticas do HIV-1 dos subtipos não B, são imperativos para prevenir uma potencial emergência de sub-epidemias de HIV-1 no Brasil.

A diversidade do HIV-1 pode representar principalmente um fator limitante tanto à efetividade da resposta imune normal do hospedeiro à infecção, quanto à eficácia de vacinas e agentes terapêuticos que venham a ser empregados em programas de controle da epidemia da AIDS. Estudos de caracterização biológica do HIV-1 podem contribuir para respaldar a escolha adequada de métodos profiláticos e terapêuticos da infecção pelo HIV-1.

A ocorrência de subepidemias envolvendo o subtipo C no país aponta para a necessidade de um monitoramento sistemático e contínuo da epidemia já que, como previamente discutido, este subtipo tem grande importância epidemiológica. Estudos envolvendo a análise molecular mais aprofundada dos subtipos virais brasileiros resultarão em um perfil mais aproximado da distribuição e prevalência dos subtipos circulantes no país, o que orientará o Ministério da Saúde na adoção apropriada de campanhas anti-HIV/AIDS, inclusive na escolha adequada de futuros produtos vacinais, na vigilância do impacto da multiterapia continuada sobre a epidemia do HIV-1 no Brasil e no entendimento da dinâmica de evolução dos vírus circulantes.



### 3 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil genotípico do HIV-1, bem como, as propriedades biológicas dos vírus circulantes em área estratégica de importância epidemiológica no território nacional, possibilitando o estudo comparativo dos atributos apresentados por isolados de diferentes subtipos circulantes em diferentes regiões geográficas do Brasil.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência de subtipos de HIV-1 circulantes, a partir da Caracterização dos genes *env*, *gag*, *pol* e LTR-5' de um grupo de pacientes acompanhados pelo setor de medicina interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS e outro do Hospital Universitário Professor Edgard Santos em Salvador – BA.
- Investigar os padrões de ocorrência dos elementos ligadores de fatores transcricionais presentes na região LTR dos isolados de subtipo B e C.
- Estudar a ocorrência de potenciais isolados recombinantes no contexto das regiões genéticas avaliadas.
- Estudar as características biológicas de isolados primários do subtipo C circulante no Brasil.

## 4 MATERIAL

### 4.1 DESENHO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DAS AMOSTRAS

Trata-se de um trabalho descritivo de corte transversal, retrospectivo com amostras de conveniência. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre esclarecido (Anexo 1). Tanto o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre quanto o do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz apreciaram e aprovaram a execução deste projeto. Os critérios de inclusão observados para este estudo foram: comprovação sorológica da infecção por HIV-1, aceite em ceder sangue para o estudo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, preenchimento do Questionário de Pesquisa e ser virgem de tratamento anti-retroviral. Em relação às amostras originárias da cidade de Salvador os critérios de inclusão foram: Disponibilidade de DNA e disponibilidade de informação preliminar sobre a natureza genética dos genes *env* e *gag*, priorizando-se aquelas amostras que foram classificadas como de subtipo F ou BF.

### 4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

O sangue venoso dos pacientes voluntários, previamente diagnosticados através de sorologia para a detecção de anticorpos reativos para HIV-1/2, foi coletado com sistema de extração a vácuo contendo etilenodiamina, a partir de punção da veia da fossa cubital. O volume variou entre 03ml a 20ml. O material foi enviado para o Laboratório Avançado de Saúde Pública – LASP/FIOCRUZ-BA, onde o sangue foi centrifugado e as frações plasmática e celular (creme leucocitário) foram separadas e armazenadas em alíquotas devidamente identificadas.

### 4.3 COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

O estudo clínico e epidemiológico constou da coleta dos dados referentes ao sexo, data de nascimento, naturalidade, estado civil, escolaridade, ocupação, raça/cor, nome da progenitora, renda familiar, endereço, hábitos sexuais, histórico de uso de drogas injetáveis e transfusão sanguínea, data da primeira sorologia anti-HIV-1 reativa, resultados da citometria de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da quantificação do RNA plasmático do HIV-1 (carga viral) e complicações clínicas associadas à infecção pelo HIV-1 (vide Questionário de Pesquisa, Anexo 2).

#### 4.4 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

Uma vez extraído, o DNA foi submetido à reação da polimerase em cadeia, aninhada, com jogos de iniciadores complementares a uma seqüência viral conhecida, com o objetivo de amplificar seqüências-alvo do genoma do HIV-1. Em todas as reações observou-se o cuidado de adição de amostras controles para reação de amplificação, a saber: DNA extraído de células de linhagem tumoral cronicamente infectadas pela cepa HXB2 e das mesmas células não infectadas. Todas as misturas de reação foram preparadas em ambiente apropriado, livre de produtos amplificados, sob cuidadosa observação das técnicas para minimizar a possibilidade de contaminação das amostras. Para amplificação de segmento parcial do gene da polimerase, compreendendo as regiões da protease e da transcriptase reversa, as reações foram conduzidas com 5µl do DNA de cada amostra ou controle, 5µl de tampão Taq 10X, 0,6µl de cada um dos ideoxinucleotídeos 25mM, 5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1µl de cada oligonucleotídeo iniciador 25pM, 33µl de H<sub>2</sub>O e 0,5µl de Ampli Taq polimerase 2,5U. As PCRs foram conduzidas como se segue: As três primeiras ciclagens para desnaturação das fitas de DNA foram realizadas com duração de 3 minutos a 95°C; em seguida um ciclo para o pareamento dos iniciadores compreendendo um período de 60 segundos a 55°C e mais 60 segundos de extensão a 72°C. Foram repetidas 35 ciclagens térmicas, programadas com período de desnaturação de 60 segundos a 95°C, pareamento de 45 segundos a 55°C e extensão de 60 segundos a 72°C. Para garantir uma extensão final dos fragmentos amplificados, foi programado um último ciclo com duração de 10 minutos a 72°C. Para ampliar a sensibilidade, bem como a quantidade de DNA-alvo, a reação da polimerase em cadeia foi conduzida em duas etapas, inicialmente com oligonucleotídeos externos e posteriormente com internos, ou aninhados. Os oligonucleotídeos iniciadores externos foram o DP10, senso, e RT5, anti-senso. Como oligonucleotídeos internos, foram utilizados o DP16, senso, e o RT6, anti-senso (Delwart et al., 1993; Heyndriks et al., 2000). A Figura 4.1 mostra a posição no genoma HXB2 e a extensão dos fragmentos amplificados. A tabela 4.1 relaciona as seqüências 5'-3' dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação. As duas etapas da reação da polimerase em cadeia aninhada foram realizadas em um equipamento termociclador da marca Perkin Elmer® modelo 9600. Após a reação da primeira etapa, 5µl do produto de amplificação foram transferidos para a mistura de reação da segunda etapa, com os oligonucleotídeos iniciadores aninhados. Todas as precauções para

evitar a possibilidade de artefatos foram observadas, incluindo a utilização de controles positivo e negativo, e o uso de ambientes e pipetadores exclusivos para cada etapa do procedimento. A mesma programação de termociclagem utilizada para a reação da primeira etapa foi utilizada também durante a segunda etapa. Ao final desta última, 2ul de produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel a 2% de agarose corado com brometo de etídio, sob voltagem constante de 100 volts durante cerca de 1h, e visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

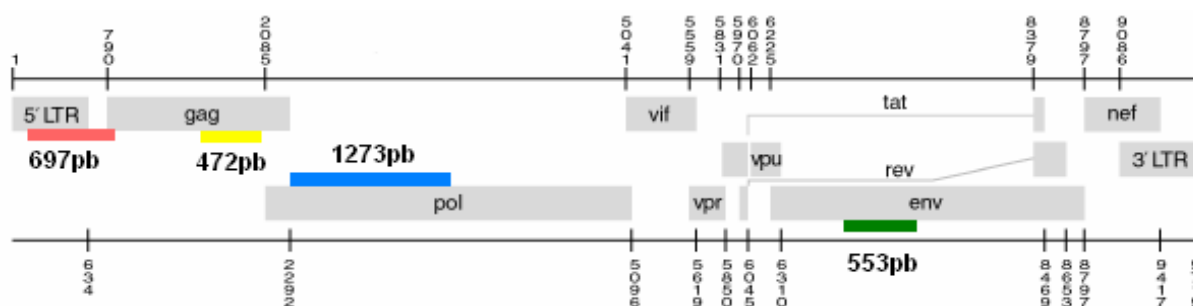


Figura 4.1- Representação esquemática do genoma do HIV-1, com destaque para os fragmentos dos genes amplificados. Adaptado de [www.bioafrica.net/subtypetool/html/](http://www.bioafrica.net/subtypetool/html/).

Tabela 4.1- Iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos e posição relativa à cepa de referência HXB2.

Iniciadores	Gene	Sequência (5'-3')	Posição (HXB2)
LTR1-F	LTR	CACACAAGGCTAYTTCCCTGA	59 - 79
JL-17-R	LTR	CA TTCTGCAGCTTCCTCATTGAT	1402 - 1424
LTR2-R	LTR	TCCYCYTGGCCTTAACCGAAT	844 - 864
LTR3-F	LTR	TGGATG-GTGCTWCAAG-YTAGT	128 - 148
H1G777-F	<i>gag</i>	TCACTA GAAC TTTGAA TGCATGGG	1231 - 1255
H1P202-R	<i>gag</i>	CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT	2418 - 2442
H1Gag1584-F	<i>gag</i>	AAAGATGGATAATCCTGGG	1577 - 1595
G17-R	<i>gag</i>	AAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGA	2017 - 2040
DP10-F	<i>pol</i>	CAACTCCCCCTCAGAA GCAGGAG	2198 - 2220
RT6-R	<i>pol</i>	GGGTGTGATTACTACA TTTT	2876 - 2895
DP16-F	<i>pol</i>	CCTCAGGTCAC TCTTTGGCAAC	2253 - 2274
RT5-R	<i>pol</i>	GTTACCTGTATAGTTTAAAT	8722 - 8741
ED5-F	<i>env</i>	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6557 - 6582
ED12-R	<i>env</i>	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG	7936 - 7968
ED31-F	<i>env</i>	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG	6817 - 6845
ED33-R	<i>env</i>	GAGGGGAATTTTCTACTGTAA	7343 - 7381
ES 7-F	<i>env</i>	TGAAAAACGACGGCCA GTCGTTAAATGGCAGTCTAGC	6983 - 7021
ES 8-R	<i>env</i>	TGAGGGACAATTGGAGAAAGTGGGTCATAGCTGTTTCTCG	7648 - 7686

#### 4.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO FINAL DE AMPLIFICAÇÃO

Os produtos de amplificação das reações da polimerase em cadeia foram purificados através do Kit comercial QIAquick, da empresa QIAGEN, de acordo com as instruções dos fabricantes. Os produtos de amplificação purificados foram conservados sob temperatura de -20°C até o momento da reação de sequenciamento.

#### 4.6 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Os produtos purificados da reação da polimerase em cadeia foram seqüenciados em ambos os sentidos com os oligonucleotídeos iniciadores DP16 e RT6, além de terminadores de extensão de cadeia marcados com radicais fluorescentes (kit Big Dye) e de seqüenciadores automáticos da Applied Biosystems®, modelo 3100 (Foster City, California, USA), observando os protocolos fornecidos pelo fabricante.

#### 4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A qualidade das seqüências geradas por cada oligonucleotídeo iniciador foram inicialmente inspecionadas com o programa Chromas, versão 1.45 (Technelysiun Ltd, Queensland, Austrália), e os *contigs* foram reunidos e editados com o programa SeqMan II, incluído no pacote DNASTAR (Burland 2000) para definição das seqüências-consenso de cada amostra.

A determinação do subtipo viral foi realizada a partir da construção de árvores filogenéticas. As 14 seqüências geradas foram alinhadas com o programa Clustal X (Thompson 1997) juntamente com um conjunto de 32 seqüências de referência, representativas dos subtipos conhecidos do grupo M do HIV-1, selecionadas no banco de dados do Laboratório Nacional de Los Alamos, Estados Unidos (<http://www.hiv.lanl.gov/>). Uma breve edição manual foi realizada a partir do programa BioEdit (Hall 1999), versão 5.09. As inferências filogenéticas foram calculadas no programa PAUP\*, versão 4.0b10 (Swofford 2002), com base em uma matriz de distância de DNA dos diversos taxa do alinhamento (Felsenstein 2004a), através do algoritmo de busca de árvores proposto por Saitou e Nei e conhecido por neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), observando o modelo de substituição nucleotídica F84 (Felsenstein 1984). A robustez das ramificações da árvore filogenética foi avaliada

através de análise de bootstrap (Felsenstein 1985), metodologia de inferência do suporte estatístico da monofilia de um determinado subconjunto de seqüências, com 1000 ciclos de replicação. As árvores filogenéticas foram esquematicamente representadas através do programa Treeview (Page 1996).

Para melhorar a fidelidade de resultados das análises, foi observado o princípio da máxima verossimilhança, que tenta inferir qual árvore maximiza a probabilidade de se observar um determinado conjunto de dados (Felsenstein 1973). O modelo de substituição nucleotídica melhor ajustado ao conjunto de dados foi determinado pelo programa MODELTEST, versão 3.06 (Posada & Crandall 1998). A estratégia de busca de árvores seguiu o algoritmo *branch-swapping* (Felsenstein 2004b). Os alinhamentos foram submetidos à análise do sinal filogenético, com pesquisa de saturação nucleotídica e hipermutação G→A. A presença de homoplasia ou saturação nucleotídica foi pesquisada com o programa DAMBE (Xia & Xie 2001), traçando-se um gráfico das transições e transversões versus a distância genética segundo o modelo F84. As seqüências geradas foram, estudadas para a presença de recombinação intersubtipo através do método de *bootscanning* implementado no programa SIMPLOT, versão 2.5 (Salminen 1995). A análise foi conduzida em uma janela deslizante de 400 nucleotídeos de extensão da seqüência em estudo movendo-se, através de incrementos de 40 bases, frente a um alinhamento de seqüências de referência representativas dos diversos subtipos do grupo M.

As metodologias empregadas para o estudo das regiões LTR-5' e *env* e *gag* estão descritas nos manuscritos I e II (Anexos 3 e 3a).

#### 4.8 ANÁLISE COMPARATIVA DOS POTENCIAIS SÍTIOS LIGADORES DE FATORES TRANSCRICIONAIS COM ASSINATURAS SUBTIPO-ESPECÍFICAS.

O programa MalInspector para identificação de potenciais sítios de ligação aos fatores transcricionais (SLFT), foi concebido a partir da implementação de um banco de dados que reúne as informações publicadas sobre os sítios gênicos de ligação para as proteínas relacionadas com a transcrição gênica em diferentes organismos. Além disso, o programa oferece um filtro de matriz para melhor condução das análises. Este filtro permite que durante as análises sejam identificados apenas os sítios específicos para o tipo celular selecionado (Cartharius et al. 2005). Durante as análises as células consideradas foram aquelas descritas como hospedeiras para o HIV-1: fagócitos,

monócitos, linfócitos e neuroglias. Além dos isolados de Porto Alegre e Salvador, outros vírus de subtipo B, C e F do Brasil e outras regiões do mundo, foram selecionados no GeneBank para compor esta avaliação. Os critérios de inclusão das amostras selecionadas no banco de dados foram: o tamanho do fragmento, que não poderia ser menor do que as seqüências obtidas neste estudo, e a disponibilidade de informação sobre o subtipo viral. As seqüências, no formato Fasta, foram submetidas uma a uma ao programa de identificação dos potenciais SLFT e os resultados foram tratados considerando-se o subtipo viral, a posição do sítio encontrado, além de sua qualidade, quantidade e funcionalidade nas diferentes células humanas hospedeiras. As assinaturas subtipo-específicas dentro dos potenciais SLFT foram identificadas a partir do alinhamento das respectivas seqüências no programa Clustal X. Essas assinaturas constam da presença peculiar de um ou mais nucleotídeos em posições específicas ao longo da seqüência que confere identidade ao subtipo avaliado.

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE HIV-1

##### 4.9.1 Células primárias e tumorais

Macrófagos humanos foram obtidos por aderência em plástico a partir de PBMC de doador normal. Três a  $4 \times 10^6$  PBMC foram dispensadas em poços de placas de 24 poços (Falcon) em 1ml de meio RPMI sem soro e incubadas durante 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . A seguir, as células foram lavadas vigorosamente por 4 vezes com meio RPMI à  $37^\circ\text{C}$ . As células em suspensão foram desprezadas, e os monócitos aderentes foram mantidos em cultura com meio de Dulbecco suplementado com 10% de soro humano AB (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.), HEPES e penicilina-estreptomicina, para diferenciação em macrófagos.

Células de linhagem tumoral T  $\text{CD4}^+$  MT-2, PM-1, SUP-T1 e H9 foram mantidas com RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone), 1% de tampão HEPES (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.) e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.) a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

Células astrocíticas de mega-glioblastoma aderentes (U87MG), transfectadas para expressão de CD4 e cada um dos receptores de alfa e beta-quimiocinas CXCR4 ou CCR5 (U87-CD4-CXCR4 ou U87-CD4-CCR5 respectivamente), foram cultivadas

com 5ml de meio Dulbecco's suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina-estreptomicina em garrafas plásticas de 25cm<sup>2</sup>, mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.9.2 Infecção de macrófagos

Para verificar a capacidade dos isolados virais em replicar em macrófagos, nós infectamos macrófagos humanos com sobrenadante HIV+ de cada isolado. Após 7-10 dias de diferenciação dos monócitos para macrófagos, foi procedida a infecção. As células foram expostas aos sobrenadantes positivos para HIV-1, com concentração entre 5-10ng de Ag p24/ml, em placas de 24 poços durante 8-12 horas, num volume final de 500µl a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas 4 vezes com RPMI a 37°C para retirada do vírus residual, adicionando-se 1ml de meio Dulbecco suplementado com 10% de soro humano AB, HEPES e penicilina-estreptomicina. Sobrenadantes de cada poço foram coletados a cada 7 dias, durante 3 a 4 semanas e estocados a -70°C. A replicação viral foi identificada a partir da visualização por microscopia óptica e pela medida nos sobrenadantes de cultura da detecção dos níveis de Ag p24 através de teste imunoenzimático com "kit" comercial de ELISA (Dupont) de acordo com instruções do fabricante.

#### 4.9.3 Ensaio de formação de sincícios

Com o objetivo de analisar se os isolados virais eram formadores ou não de sincícios em células T tumorais CD4+, as mesmas foram infectadas por sobrenadantes infecciosos. 5x10<sup>4</sup> células foram dispensadas em cada poço de placas de 96 poços, observando-se um volume final de 200µl/poço e uma concentração entre 5-10ng/ml de Ag p24. A formação de sincícios foi examinada por observação microscópica após 2 a 3 dias de infecção. Os isolados Ba-L e MN (trópicos para CCR5 e CXCR4 respectivamente) foram utilizadas como vírus controle para a formação ou não de sincícios.

#### 4.9.4 Uso dos receptores de quimiocinas

Para investigar o tropismo dos isolados virais para os receptores de quimiocinas, células U87MG DC4/CXCR4+ ou CD4/CCR5+. Após remoção e contagem, 10<sup>4</sup> células foram transferidas para placas de 24 poços e mantidas em repouso durante 12 horas.



Em seguida foram adicionados às células, os sobrenadantes infecciosos de cultura, incubando-se durante 8-12 horas. As células foram lavadas para a retirada do vírus residual, adicionando-se em seguida 1ml de meio fresco. O uso dos correceptores foi identificado após 7 a 10 dias de infecção, medindo-se o efeito citopático a partir da observação microscópica nos poços de cultura ou pela medida nos sobrenadantes de cultura da detecção dos níveis de Ag p24 através de teste imunoenzimático com “kit” comercial de ELISA (Dupont) de acordo com instruções do fabricante.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

As informações clínicas, sócio-demográficas dos pacientes selecionados no serviço de Infectologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre estão relacionadas na Tabela 5. Pôde-se observar uma taxa de 1,44 homens para cada mulher infectada. Os pacientes apresentaram idade mínima de 21 anos e máxima de 70 anos, tendo como média etária 36 anos. Em relação ao comportamento sexual observou-se uma taxa de 68% de heterossexuais, 18% de homossexuais e 9% de bissexuais, sendo que um deles não informou. 41% dos voluntários declararam o uso de drogas injetáveis. Os registros apontam o desenvolvimento de doenças oportunistas e/ou contagem de linfócitos T CD4+ < 200cels/mm<sup>3</sup> em 16 pacientes (73%) (Tabela 5.1). Dentro de um intervalo de tempo de até 03 anos, após a coleta, 41% (09) dos pacientes foram a óbito. As manifestações clínicas relatadas foram as seguintes: Criptococose cerebral, toxoplasmose cerebral, linfoma, tuberculose pulmonar, pneumocistose, criptosporidiose, leucoencefalopatia multifocal progressiva, neurosífilis/demência, candidíase oral, sarcoma de Kaposi, pneumocistose, salmonelose, tuberculose ganglionar. Dentre as entidades clínicas mais freqüentes, relatadas para o subgrupo dos pacientes sintomáticos, com ou sem contagem crítica do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estão as seguintes: Toxoplasmose cerebral 43% (06), criptococose cerebral 36% (05), tuberculoses 36% (05) e pneumonias 28,5% (04). Dentre os pacientes com desenvolvimento de doenças oportunistas, foi relatada uma prevalência de 50% (09/14) de doenças relacionadas com o sistema nervoso central. A contagem de linfócitos T CD4+ variou de 32 células/mm<sup>3</sup> a 933 células/mm<sup>3</sup>, entretanto não há registro dessa informação para 10 dos 23 pacientes estudados. Foi relatado que o paciente RS018 já esteve diversas vezes sob tratamento e a genotipagem do gene *pol* apontou para a presença de cepas multiresistentes. Os pacientes RS021 e RS022 são gêmeos.

Tabela 5.1- Dados demográficos e comportamentais dos pacientes de Porto Alegre.

Amostra	Idade (anos)	Gênero	Comportamento Sexual	Uso de drogas injetáveis	Doenças oportunistas	Contagem CD4/mm <sup>3</sup> de sangue
RS001	22	M	Heterossexual	Sim	Sim*(óbito)	Ignorado
RS002	70	F	Heterossexual	Não	Sim (óbito)	63
RS003	41	M	Heterossexual	Não	Não	437
RS004	24	F	Heterossexual	Não	Sim*(óbito)	32
RS005	38	M	Bissexual	Sim	Não	Ignorado
RS006	28	F	Heterossexual	Sim	Sim*(óbito)	Ignorado
RS007	41	M	Homossexual	Sim	Sim (óbito)	32
RS008	43	M	Ignorado	Ignorado	Sim*	Ignorado
RS009	46	F	Heterossexual	Não	Sim*	Ignorado
RS010	38	F	Heterossexual	Sim	Não (óbito)	350
RS011	36	M	Homossexual	Sim	Sim	Ignorado
RS012	53	F	Heterossexual	Não	Não	933
RS013	21	M	Bissexual	Não	Sim*	Ignorado
RS014	42	M	Heterossexual	Não	Não	213
RS015	23	M	Heterossexual	Sim	Sim (óbito)	Ignorado
RS016	39	F	Heterossexual	Não	Sim	Ignorado
RS017	42	M	Homossexual	Não	Não	294
RS018	38	M	Homossexual	Não	Sim*	75
RS019	23	F	Heterossexual	Não	Sim*	Ignorado
RS020	29	F	Heterossexual	Não	Não	371
RS021	22	M	Heterossexual	Sim	Sim (óbito)	322
RS022	22	M	Heterossexual	Sim	Não (óbito)	709

\*Desenvolvimento de doença relacionada com o sistema nervoso central.

Os pacientes de Salvador foram selecionados entre um grupo de 33 pacientes, cujos isolados foram subtipados como F ou BF nos genes gag e env, avaliados em um estudo que totalizava 220 voluntários soropositivos acompanhados no Hospital Universitário Professor Edgard Santos (Tabela 5.2). As amostras sanguíneas foram

coletadas no primeiro semestre do ano de 2002. Os pacientes em estudo foram predominantemente do sexo feminino (04/06), com faixa etária predominante entre 30-40 anos, com exceção do BA184 (07 anos). O modo de transmissão predominante foi o sexual (heterossexual) (04/06), sendo que esse dado foi omitido pelo paciente BA168 e o BA184 foi contaminado de forma vertical. Todos os pacientes apresentaram algum tipo de manifestação clínica relacionada com a AIDS (Tabela 5.3).

Tabela 5.2- Caracterização do grupo completo de pacientes originários do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – Salvador

Gênero		Orientação Sexual			
Masculino	Feminino	Hetero	Homo	Bi	SI
133 (60%)	87 (39%)	54 (24%)	25 (11%)	21 (10%)	120 (56%)
Uso de drogas injetáveis		Faixa etária (anos)			
		11-30	31-40	41-50	51-60
10 (9,6%)		20 (9%)	62 (28%)	46 (21%)	7 (3%)

Tabela 5.3 - Dados dos pacientes originários de Salvador incluídos no estudo

Paciente	Gênero/ Idade <sup>#</sup>	Modo de transmissão	Carga Viral*	CD4 <sup>+</sup> **	1 <sup>a</sup> sorol. reativa	Status clínico
BA023	F/30	Sexual (hetero)	96 (08/1999)	542	11/1996	Sintomático
BA109	F/35	Sexual (hetero)	54 (03/1997)	359	04/1996	Sintomático
BA152	F/38	Sexual (hetero)	36.679 (01/1997)	471	1991	Sintomático
BA168	M/40	Ignorado	73.000 (02/1998)	108	02/1997	Sintomático
BA184	M/07	Vertical	69.000 (12/1997)	683	12/1997	Sintomático
BA500	F/35	Sexual (hetero)	<80 (24/01/2002)	359	07/1998	Sintomático

\*Resultado em cópias por ml<sup>3</sup> de sangue

\*\* Resultado expresso em número de células por ml<sup>3</sup> de sangue

# Idade expressa em anos

## 5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO LTR-5' E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE FATORES TRANSCRICIONAIS.

Estes dados encontram-se detalhados no Anexo 3. A avaliação do cálculo de saturação (Fig. 5.1) para a construção da árvore filogenética para LTR mostrou insustentabilidade. Não se verificou nenhuma discordância entre os marcadores moleculares de cada subtipo com o resultado de subtipagem obtido ou com as amostras de subtipo previamente conhecido. A Figura 5.2 representa a análise filogenética desta região, com a identificação dos subtipos B e C do HIV-1 dentre as amostras analisadas.

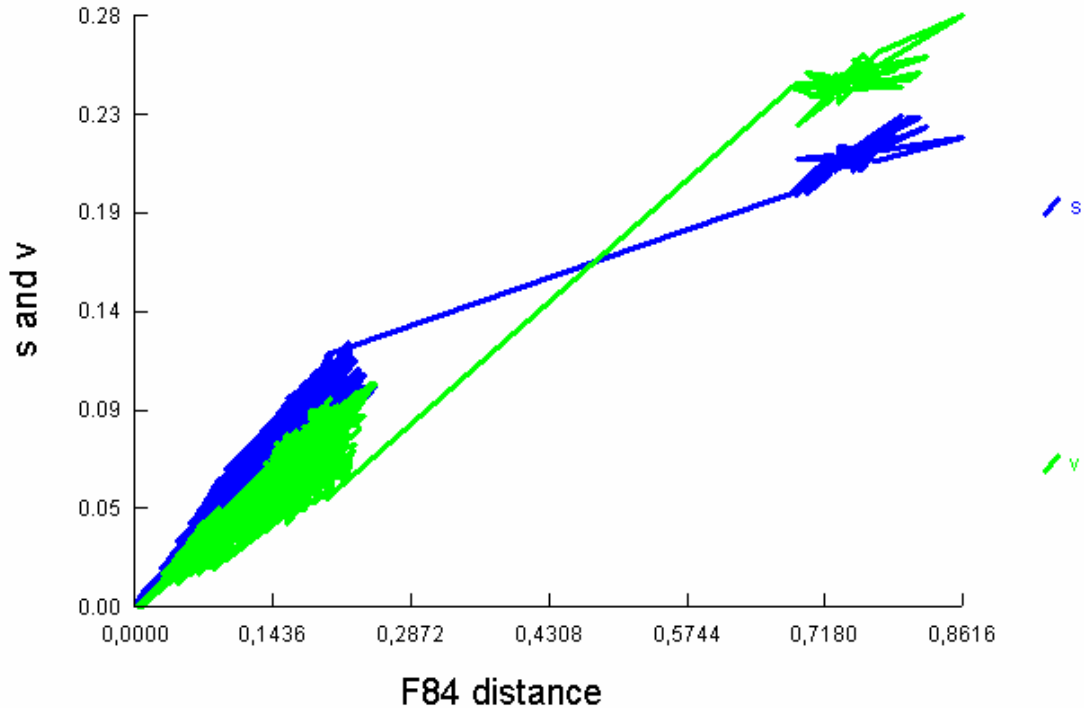


Figura 5.1 - Gráfico do cálculo de saturação para o alinhamento da região genômica LTR-5', obtido no programa DAMBE.

O resultado da utilização do programa de identificação de potenciais sítios de ligação aos fatores transcricionais, MatInspector (Cartharius et al. 2005), mostrou a ocorrência de diversos potenciais SLFT nos diferentes isolados avaliados (Anexo 4). Os dados resultantes da avaliação da fita molde de DNA 3'-5' para os potenciais SLFT foram desprezados devido à inaplicabilidade desses diante dos objetivos propostos. Alguns desses sítios estiveram mais relacionados com os isolados de subtipo C em comparação com a frequência de ocorrência para os isolados de subtipo B como HMG-box, c-Rel, Proteína ativadora 4 (AP-4), Fator celular de transcrição 15 (TCF-15), PRDI, Fator de ligação GATA (GATA), Tal-1alfa, NKX3.1, Pou-factor e neuroginina (ngn1/3), enquanto outros mostraram estar mais relacionados com os isolados do subtipo B em comparação com os isolados de subtipo C como os fatores: Regulador autoimune, fator celular de transcrição 11 e c-Ets1. Alguns sítios foram identificados como de natureza ubíqua, com pequena ou nenhuma diferença na ocorrência entre os subtipos virais avaliados. Os resultados são apresentados de acordo com a ocorrência subtipo-específica dos sítios com correspondente expressão protéica em células de origem neuroglial e não-neuroglial (Figs. 5.3 e 5.4). O potencial SFLT para o fator transcricional

HMG-box (posição nucleotídica 61 a 75 do HXB2) esteve presente em 93% dos isolados de subtipo C e 38% dos isolados de subtipo B, c-Rel (posição nucleotídica -93 a -80 do HXB2) foi identificado exclusivamente em 80% dos isolados de subtipo C. Oitenta e sete por cento dos fragmentos de LTR-5' dos isolados de subtipo C apresentaram pelo menos um potencial SLFT para Pou-factor e 60% desse mesmo grupo de isolados apresentou dois sítios com diferentes assinaturas entre ambos (posições nucleotídicas -207 a -192 e -142 a -130 do HXB2). A presença do potencial SLFT NKX3.1 foi também expressiva para os isolados de subtipo C, com 86.6% de ocorrência (posição nucleotídica -171 a -155 do HXB2). Com uma frequência de 27%, o potencial SLFT ngn1/3 foi exclusivo para os isolados de subtipo C (posição nucleotídica 108 a 120 do HXB2). Tanto o potencial SLFT Pou-factor quanto NKX3.1 foram identificados em apenas 4.25% nos fragmentos LTR-5' dos isolados de subtipo B (Fig. 8). Todos os isolados de subtipo B ou C apresentaram pelo menos um potencial SLFT x-Box (posição nucleotídica 43 a 61 e 121 a 138 do HXB2).

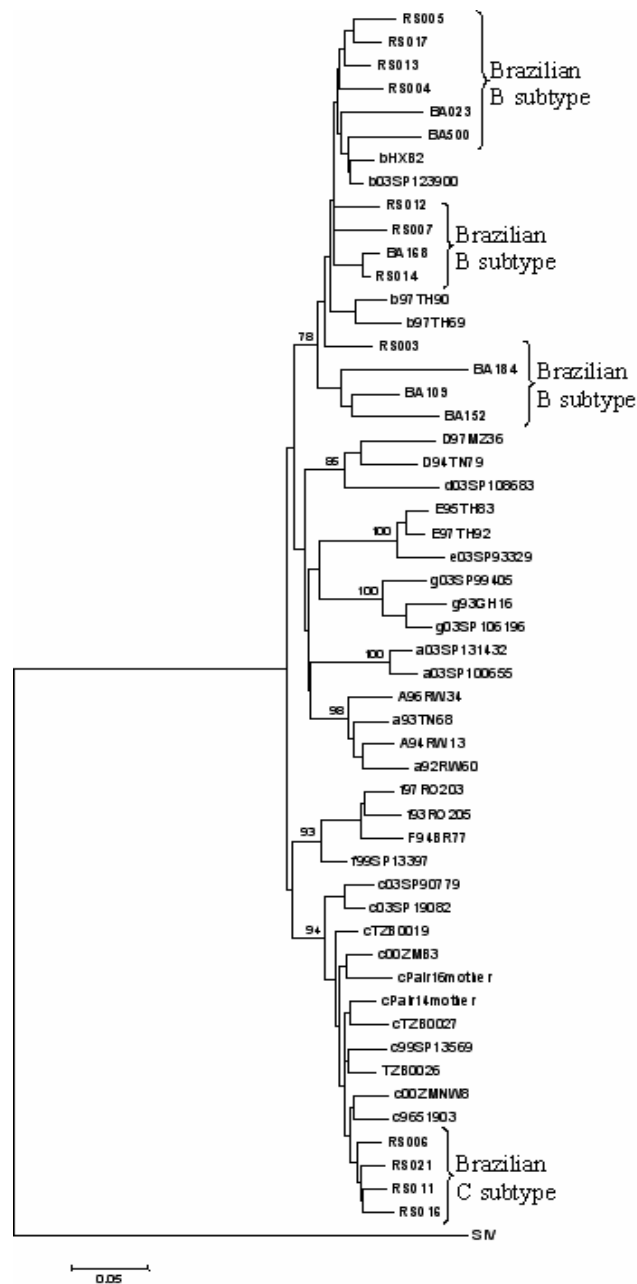


Figura 5.2- Árvore NJ da região LTR (450bp), enraizada com SIVmac para análise filogenética das amostras brasileiras de HIV-1. Os subtipos de referência foram obtidos a partir do GenBank/EMBL. O valor de bootstrap >70% foi considerado significativo. Os isolados brasileiros estão destacados com chaves.



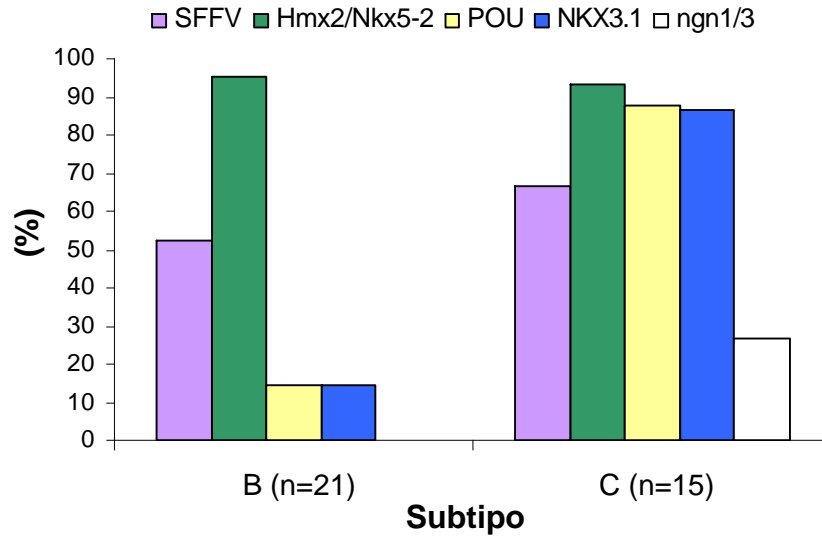


Figura 5.3 - Frequência de ocorrência de potenciais sítios de ligação a fatores transcricionais com atividade em neuroglias.

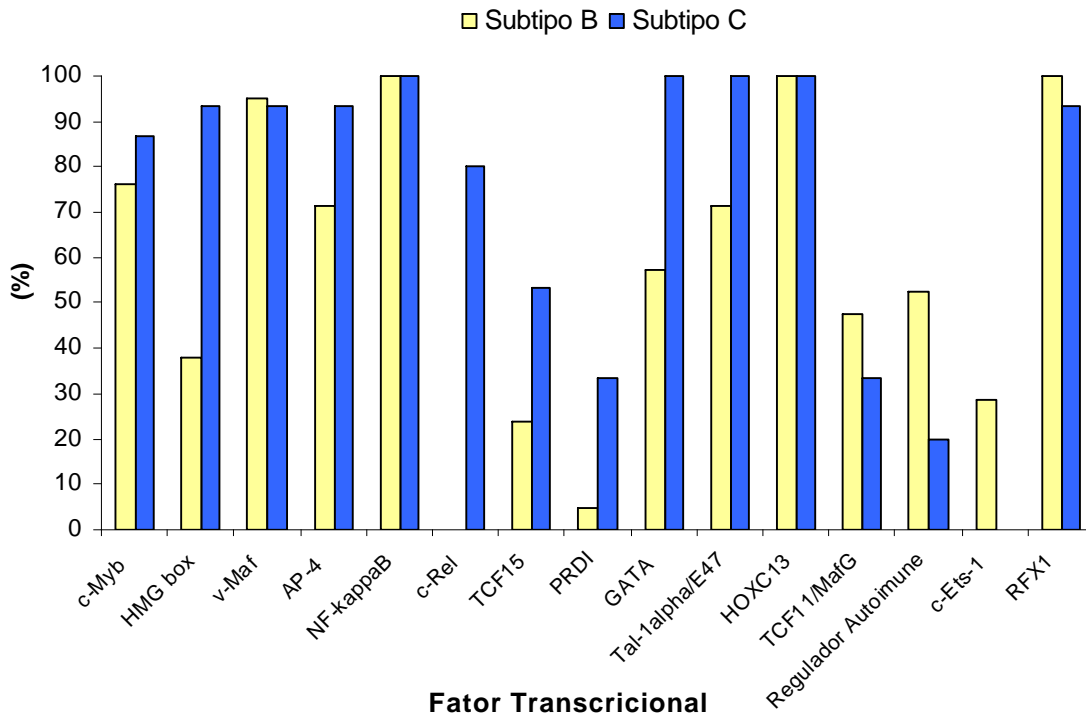


Figura 5.4 - Frequência de ocorrência de potenciais sítios de ligação a fatores transcricionais com atividade em fagócitos, linfócitos e monócitos.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS SUBTIPO-ESPECÍFICAS NOS POTENCIAIS SLFT

A análise dos potenciais SLFT através do alinhamento das seqüências mostrou alguns padrões distintos, específicos para os subtipos B e C. A maioria dos isolados que apresentou potencial sitio de ligação para NKX3.1 foi de subtipo C (13/18) e dentre os 05 restantes, 04 foram isolados B do Brasil. Todos os isolados do subtipo C apresentaram uma substituição de T para C na sexta posição deste sítio. O alinhamento do potencial SLFT para TCF15 mostrou assinaturas subtipo-específicas para ambos os grupos de isolados, subtipo B TTCAT e C GCAGA (Fig. 10). Além disso, a última posição desse sítio também apresenta substituições específicas dos nucleotídios A e C para o subtipo B e C respectivamente. Dos 11 isolados que apresentaram o potencial SLFT para o Regulador Autoimune, 08 foram de subtipo B, incluindo 04 do Brasil, os 03 restantes também eram do subtipo C e originários do Brasil também. Uma mutação de T para G na 21<sup>o</sup> posição do sítio determinou dois padrões relacionados com o subtipo B ou C (Fig. 5.5). A análise do potencial SLFT Tal 1-alfa mostrou dois padrões, um subtipo-específico, incluindo os subtipos C e F e outro sem relação de especificidade com os subtipos (Fig. 5.6). Na última posição da sequencia do potencial SLFT AP-4 foi identificada uma variação nucleotídica com a ocorrência das base T ou C, além disso, variações em outras posições do sítio, mostrou a presença de três padrões relacionados com o subtipo viral. O padrão 1 e o 2 parecem mais conservados e relacionados respectivamente com o subtipo C e B, enquanto o padrão 3 além de degenerado em sua porção terminal 3', não apresenta uma aparente relação específica com o subtipo viral (Fig. 5.6). O alinhamento do potencial SLFT para v-Maf mostrou dois padrões distintos de seqüências com especificidades para o subtipo B e C (Fig. 5.7). Não foi identificado nenhuma outro padrão com especificidade para os subtipos nos demais potenciais SLFT.

Potencial SLFT para TCF15

c00ZMNW8	GCAGACACATGGCCCGC
c9651903	GCAGACACATGGCCCGC
cPair14mot	GCAGACACATGGCCCGC
cTZB0019	GCAGACACATGGCCCGC
RS011	GCAGACACATGGCCCGC
TZB0026	GCAGACACATGGCCCGC
RS021	GTAGACACATGGCCCGC
c99SP13569	ACAGACACATGGCCCGC
b03SP123900	TTCATCACATGGCCCGA
B.FR.83.HXB2	TTCATCACATGGCCCGA
RS012	TTCATCACATGGCCCGA
RS007	TTCATCACATGGCCCGA
BA168LTR	TGCATCACGTGGCTCGA
RS003	TTCACCACATGGCCCGA

Potencial SLFT para Regulador Autoimune

RS014	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
RS012	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
RS017	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
HXB2	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
b03SP123900	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
b97TH69	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
b97TH90	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
BA168	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
cPair16mot	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
c03SP90779	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC
c03SP19082	CCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC

Figura 5.5- Caracterização de assinaturas subtipo-específicas nos potenciais SLFT TCF15 e Regulador Autoimune. Destaque para as assinaturas específicas identificadas para os isolados de subtipo C e B em ambos os sítios. Os sítios identificados na análise do programa MatInspector foram identificados nas seqüência da região LTR correspondente a cada isolado, selecionados e realinhados no Programa Clustal X.

Potencial SLFT Tal 1-alfa

c00ZMNW8	ACCCTCAGATGCTGCAT
c9651903	ACCCTCAGATGCTGCAT
c00ZMB3	ACCCTCAGATGCTGCAT
cPair16mot	ACCCTCAGATGCTGCAT
cTZB0019	ACCCTCAGATGCTGCAT
RS006	ACCCTCAGATGCTGCAT
RS021	ACCCTCAGATGCTGCAT
RS016	ACCCTCAGATGCTGCAT
RS011	ACCCTCAGATGCTGCAT
f97R0203	ACCCTCAGATGCTGCAT
f93R0205	ACCCTCAGATGCTGCAT
F94BR77	ACCCTCAGATGCTGCAT
BA184	CCCCTCAGATGCTGCAT
cPair14mot	GCCCTCAGATGCTGCAT
cTZB0027	GCCCTCAGATGCTGCAT
c99SP13569	GCCCTCAGATGCTGCAT
TZB0026	GCCCTCAGATGCTGCAT
c03SP90779	GCCCTCAGATGCTGCAT
c03SP19082	GCCCTCAGATGCTGCAT
f99SP13397	GCCCTCAGATGCTGCAT
BA109	GCCCTCAGATGCTGCAT
BA168	GCCCTCAGATGCTGCAT
b97TH90	GCCCTCAGATGCTGCAT
b97TH69	GCCCTCAGATGCTGCAT
b03SP123900	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS005	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS013	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS012	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS004	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS007	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS010	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS008	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS018	GCCCTCAGATGCTGCAT
RS014	GCCCTCAGATGCTGCAT

Potencial SLFT AP-4

c00ZMNW8	ATAAGCAGCTGCTTTTC
c9651903	ATAAGCAGCTGCTTTTC
c00ZMB3	ATAAGCAGCTGCTTTTC
cPair14mot	ATAAGCAGCTGCTTTTC
cTZB0027	ATAAGCAGCTGCTTTTC
c99SP13569	ATAAGCAGCTGCTTTTC
TZB0026	ATAAGCAGCTGCTTTTC
cPair16mot	ATAAGCAGCTGCTTTTC
c03SP90779	ATAAGCAGCTGCTTTTC
c03SP19082	ATAAGCAGCTGCTTTTC
cTZB0019	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS006	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS021	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS016	ATAAGCAGCTGCTTTTC
f93R0205	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS014	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS018	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS004	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS017	ATAAGCAGCTGCTTTTC
HXB2	ATAAGCAGCTGCTTTTC
b03SP123900	ATAAGCAGCTGCTTTTC
b97TH69	ATAAGCAGCTGCTTTTC
BA168	ATAAGCAGCTGCTTTTC
BA109	ATAAGCAGCTGCTTTTC
f99SP13397	ATAAGCAGCTGCTTTTC
f97R0203	ATAAGCAGCTGCTTTTC
b97TH90	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS013	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS007	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS012	ATAAGCAGCTGCTTTTC
RS011	ATAAGCAGCTGCTTTTC

Padrão 1

Padrão 2

Padrão 3

Figura 5.6 - Caracterização de assinaturas subtipo-específicas nos potenciais SLFT Tal 1-alfa e AP-4. Destaque para as assinaturas específicas identificadas para os isolados de subtipo C e B em ambos os sítios. Os sítios identificados na análise do programa MatInspector foram identificados nas seqüência da região LTR correspondente a cada isolado, selecionados e realinhados no programa Clustal X.

Potencial SLFT v-Maf	
F94BR77	TGAGACTGCTGACACAGAGATTGCT
f99SP13397	TGAGATTGCTGACACAGAGATTGCT
f97R0203	TAAGACTGCTGACACAGACATTGCT
BA109LTR	TACAACTGCTGACATCGAGCTTTCT
BA184LTR	TACAACTGCTGACATCGAGCTTTCT
RS018a	AAGAACTGCTGACATCGAGCTTTCT
HXB2	AAGAACTGCTGACATCGAGCTTTGCT
SP123900	AAGGACTGCTGACATCGAGCTTTCT
BA500	AAGGACTGCTGACATCGAGATTTCT
RS003	AAGGACTGCTGACATCGAGATTTCT
RS013	TAAGACTGCTGACATCGTGTTCCTA
RS007	TGAGACTGCTGACATCGAGCTTTCT
RS012	AAAGACTGCTGACATCGAGCTTTCT
RS017	AAAGACTGCTGACATCGAGTTTTCT
BA168	AAGGACTGCTGACACCGAGCTTTCT
b97TH90	AAGGACTGCTGACACCGAGCTTTCT
RS002	AAGGACTGCTGACACCGAGCTTTCT
RS010	AAGGACTGCTGACACCGAGCTTTCT
RS008	AAGGACTGCTGACACCGAGCTTTCT
RS014	AAGGACTGCTGACACCGAGCTTTCT
BA023	AAGAACTGCTGACACCGAGTTTTCTA
BA109	AAGGACTGCTGACATCGAGCCTTCT
RS005	AAAGACTGCTGACAGCGAGATTTCTA
c00ZMNW8	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
c9651903	AAGAACTGCTGACACAGAGGGGACT
c00ZMB3	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
cPair14mot	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
cTZB0027	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
c99SP13569	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
TZB0026	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
cPair16mot	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
c03SP90779	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
cTZB0019	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
RS006	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
RS011	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
c03SP19082	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGACT
RS021	AAAGACTGCTGACACAGAGGGGAGT
F94BR77a	AGAGATTGCTGACACAGAGAAATCT
F94BR77b	GGAGGATGATGACAGAGAAGTACTA

Figura 5.7 - Caracterização de assinaturas subtipo-específicas nos potenciais SLFT v-Maf. Destaque para as assinaturas específicas identificadas para os isolados de subtipo C e B em ambos os sítios. Os sítios identificados na análise do programa MatInspector foram identificados nas seqüência da região LTR correspondente a cada isolado, selecionados e realinhados no programa Clustal X.

#### 5.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO GÊNICA TAR

O alinhamento da região TAR das amostras de Porto Alegre estudadas permitiu a identificação de 09 pontos de mutação que contribuem para o polimorfismo desta seqüência (Fig. 5.8). Esta análise foi priorizada para essa população específica para contemplar a inclusão de isolados brasileiros de subtipos B e C. Esses pontos coincidem com as posições G10, U12, C23, U24, U30, A46, A47 e A50, caracterizando 10 mutações diferentes: G10A (06), G10U (05), U12G (04), C23U (02), U24A (05), U30C (04), A46G (02), A47U (04), A47G (07) e A50G (05). O resultado de modelagem molecular do grampo RNA TAR permitiu a identificação da possível repercussão para a estabilidade da estrutura, com a perda de ligações fracas entre as bases (Figuras 5.10 a-m). Os resultados foram comparados com a cepa HXB2 e as seqüências consensos

descritas por Jeeninga e colaboradores (2000), que relacionou os polimorfismos desta região com os subtipos virais, definindo 08 padrões B, A & C2, C1, D, E, F, G e G" (Fig 5.9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>B HXB2</b>	GGGTCTCTCT	GGT	AGACCAGAT	CT	GAGCCT	GGGAGCTCTCT	GGCT	AACTA	GGGAACCC
<b>C RS006</b>	.....	A	G	.....	.....	.....	.....	GT	.....
<b>C RS021</b>	.....	A	G	.....	.....	.....	.....	T	.....
<b>C RS011</b>	.....	A	G	.....	.....	C	.....	T	G
<b>C RS016</b>	.....	A	G	.....	T	.....	.....	T	G
<b>B RS018</b>	.....	A	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....
<b>B RS007</b>	.....	T	.....	.....	A	C	.....	G	.....
<b>B RS003</b>	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....
<b>B RS012</b>	.....	T	.....	.....	A	.....	.....	G	.....
<b>B RS005</b>	.....	T	.....	.....	A	.....	.....	G	.....
<b>B RS017</b>	.....	T	.....	.....	A	.....	.....	G	.....
<b>B RS013</b>	.....	T	.....	.....	A	C	.....	G	G
<b>B RS014</b>	.....	T	.....	.....	A	.....	.....	G	.....
<b>B RS004</b>	.....	A	G	.....	T	.....	.....	G	G

Figura 5.8 - Identificação dos polimorfismos pontuais da região TAR dos isolados de Porto Alegre. Destaque para 09 pontos polimórficos identificados ao longo desta região gênica nos retângulos em vermelho ou azul.

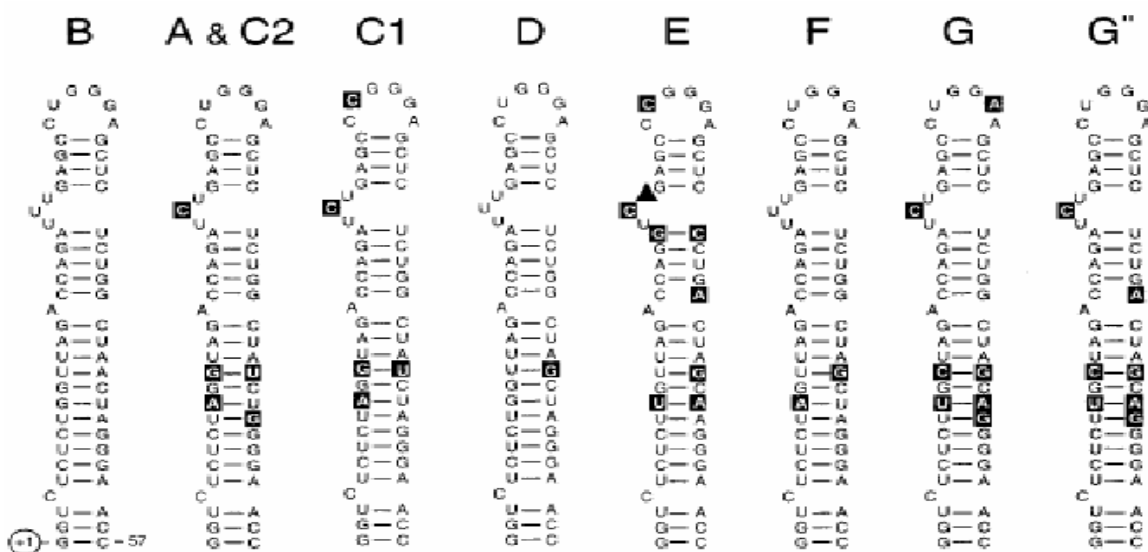
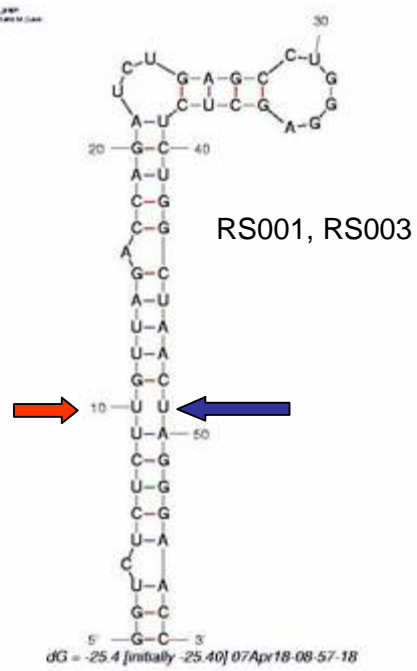
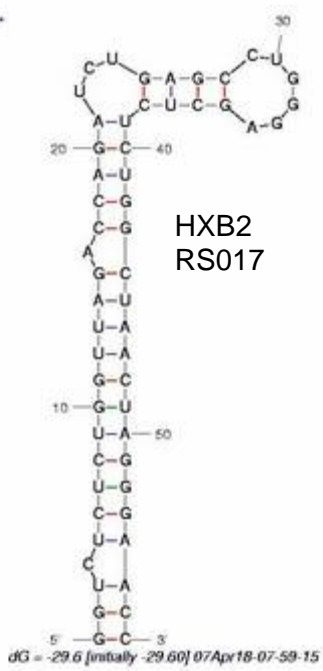
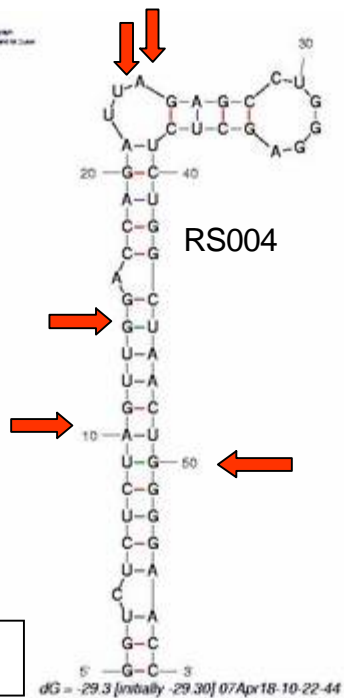
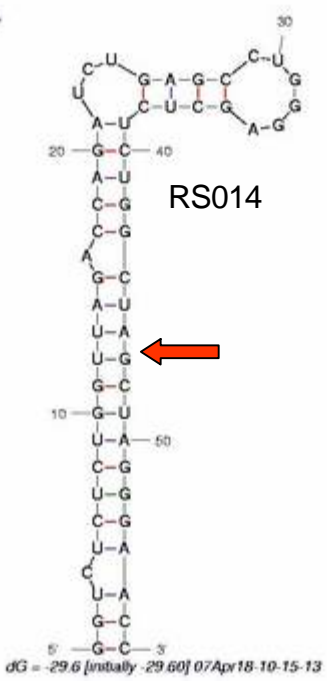


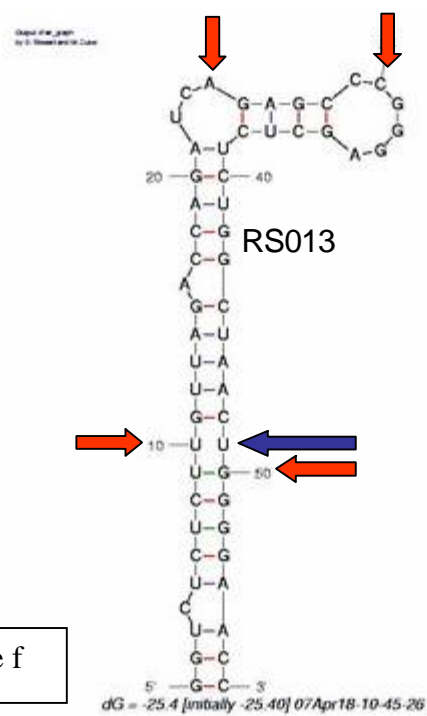
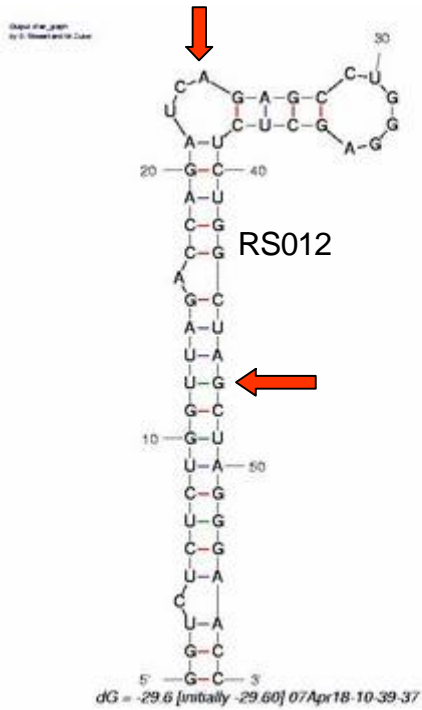
Figura 5.9 - Representação esquemática da estrutura secundária das seqüências consenso descritas por Jeeninga e colaboradores (2000), relacionando os polimorfismos desta região com os subtipos virais, definindo os 08 padrões relacionados. Retirado de Jeeninga et al 2000.



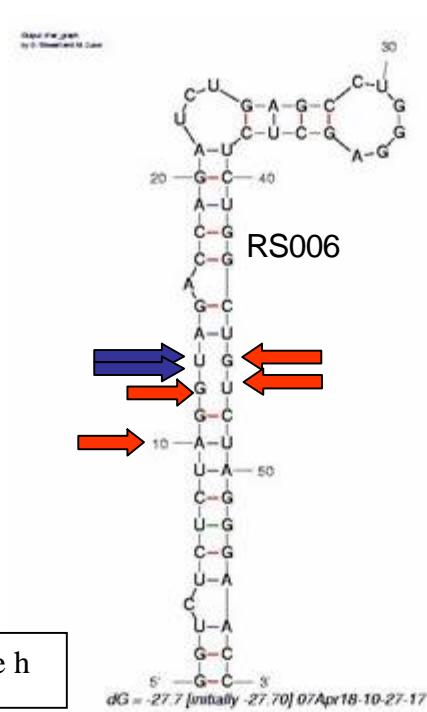
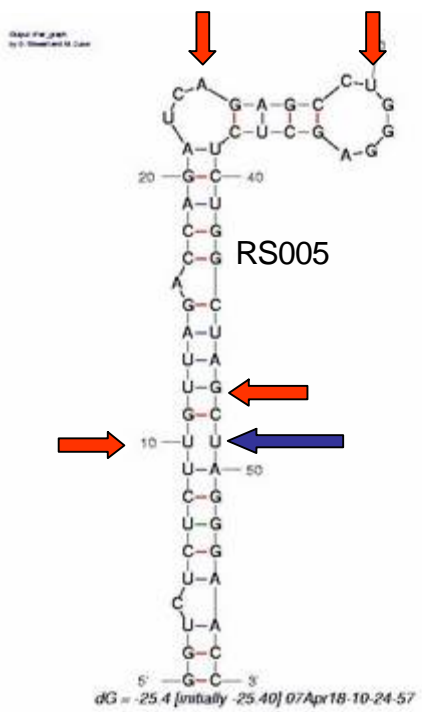
Figuras 15 a e b



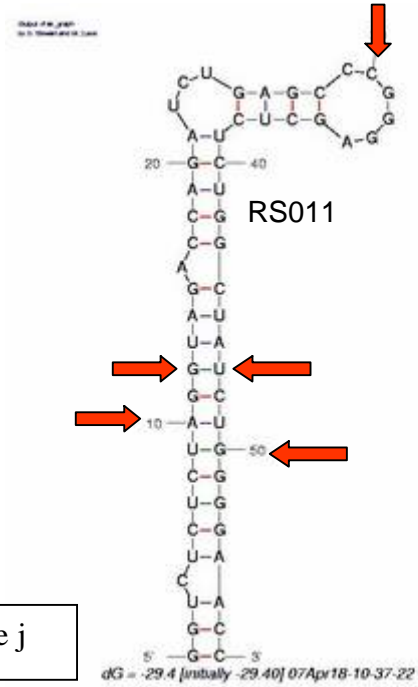
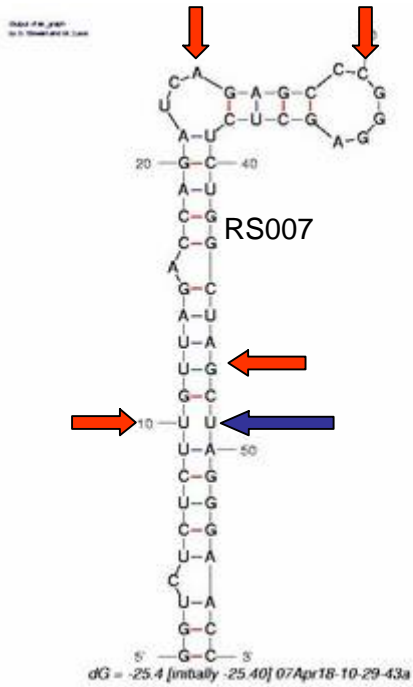
Figuras 15 c e d



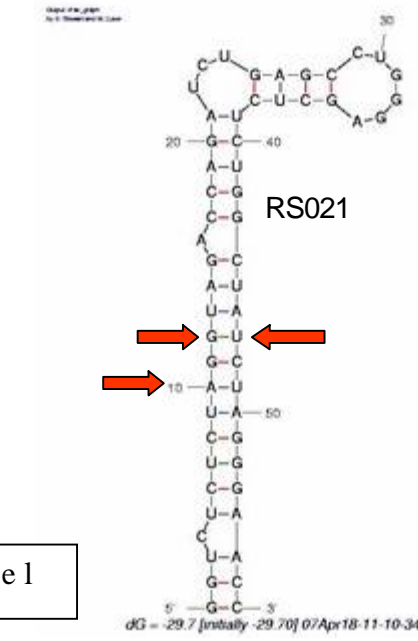
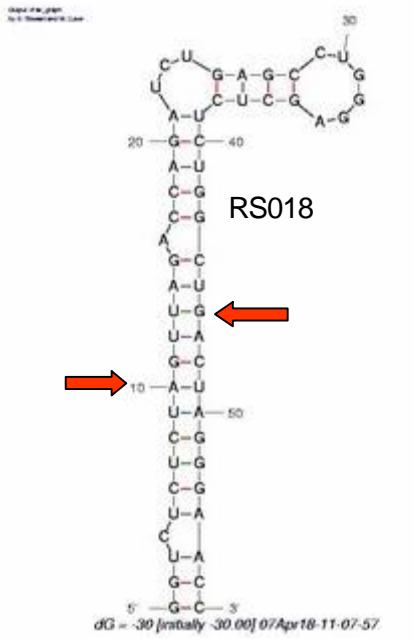
Figuras 15 e e f



Figuras 15 g e h



Figuras 15 i e j



Figuras 15 k e l



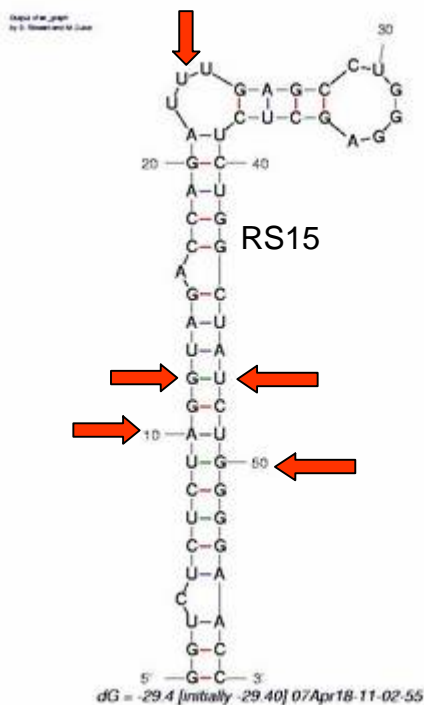


Figura 15 m

Figura 5.10 a-m - Representação esquemática da estrutura secundária do grupo RNA TAR modelado no programa RNA folding. As setas vermelhas indicam as posições nucleotídicas relacionadas com os pontos polimórficos em comparação com a cepa de referência HXB2. As setas azuis apontam para as mutações relacionadas com a perda das ligações entre as bases antiparalelas.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÔMICA DOS ISOLADOS DE PORTO ALEGRE

### 5.5.1 Análise filogenética do gene *pol*

Após o alinhamento dos 14 fragmentos parciais do gene *pol* dos isolados de Porto Alegre, mais as cepas de referencia selecionadas, compreendendo 1150 pb, o LRT revelou que o melhor modelo, de acordo com o padrão de substituição para este grupo de seqüências, foi o transversional (TVM) mais distribuição gama, de acordo com a taxa de heterogeneidade de substituições entre os sítios (alpha parameter = 0.5611). A análise filogenética, empregando os métodos NJ and ML (-lnL =10985.8896: *pol*), mostrou que ambas as árvores apresentaram topologias muito parecidas. A localização dos isolados de Porto Alegre e o agrupamento juntamente com as diferentes cepas de referencia permitiu inferir que 06 desses fragmentos apresentam características filogenética de subtipo B e sete de subtipo C. A posição do isolado RS002 de acordo com a topologia da árvore sugeriu uma análise mais detalhada para avaliar uma possível natureza recombinante deste. (Fig. 5.11). De fato, a análise através da

ferramenta BootScan do programa Simplot para o fragmento *pol* do isolado RS002 mostrou tartar-se de uma estrutura mista com um padrão de ambos os subtipo C e B (Fig. 5.12). Os isolados testados apresentaram-se com 04 padrões gráficos de acordo com a análise da RIP 3.0 (Fig. 5.13).

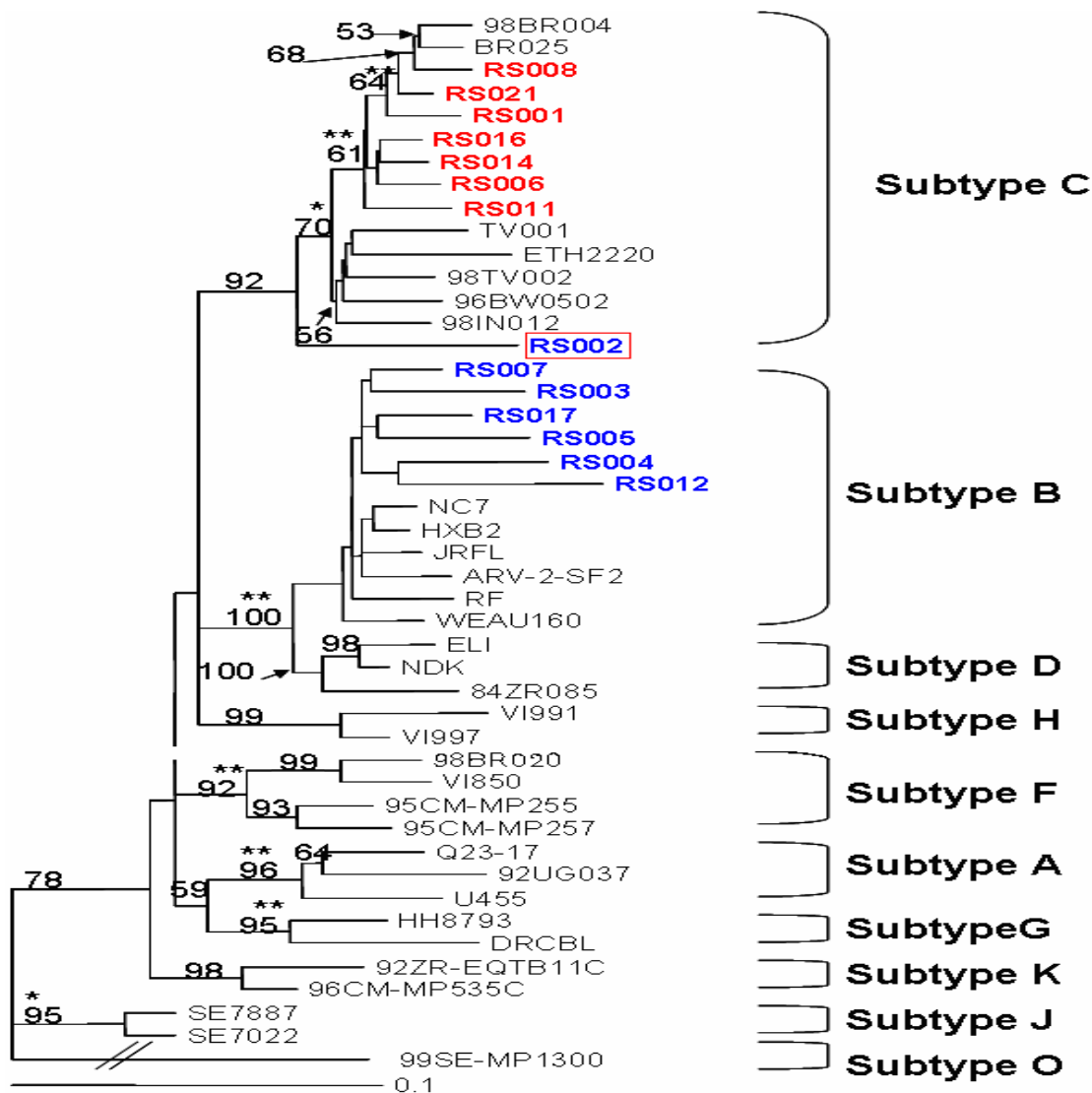


Figura 5.11 - Árvore filogenética neighbor-joining de 46 cepas de HIV-1, com base no fragmento do gene *pol* com 1150-pb. O valor de bootstrap >50% foi considerado como significativo. Os fragmentos do gene *pol* relativos às amostras de Porto Alegre, estão destacados com fonte em azul ou vermelho de acordo com o agrupamento das respectivas seqüências juntamente com outras do subtipo B ou C respectivamente.

\*\*Significância estatística com  $p < 0.001$  e \*Significância estatística com  $p < 0.05$ , através da análise pelo método ML.

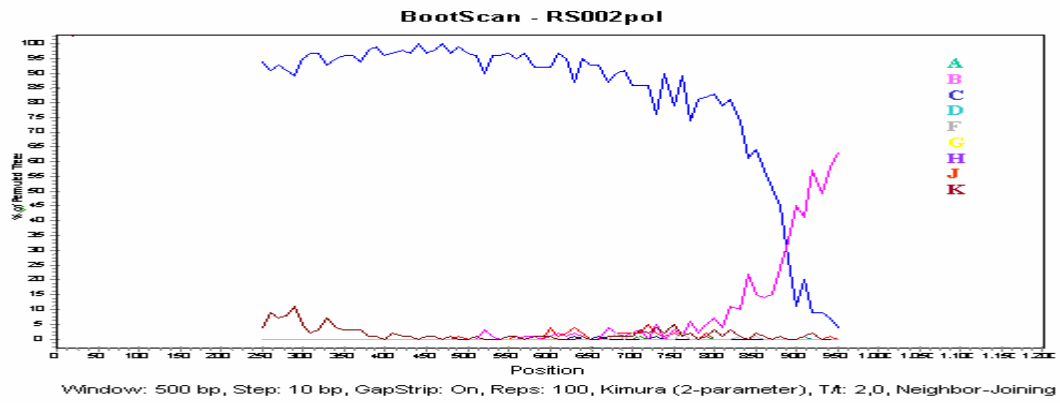


Figura 5.12 - Identificação do padrão recombinante BC. Análise de bootscanning através do programa de bioinformática Simplot mostrando a relação entre o isolado RS002 e os subtipos de referência para o gene *pol*.

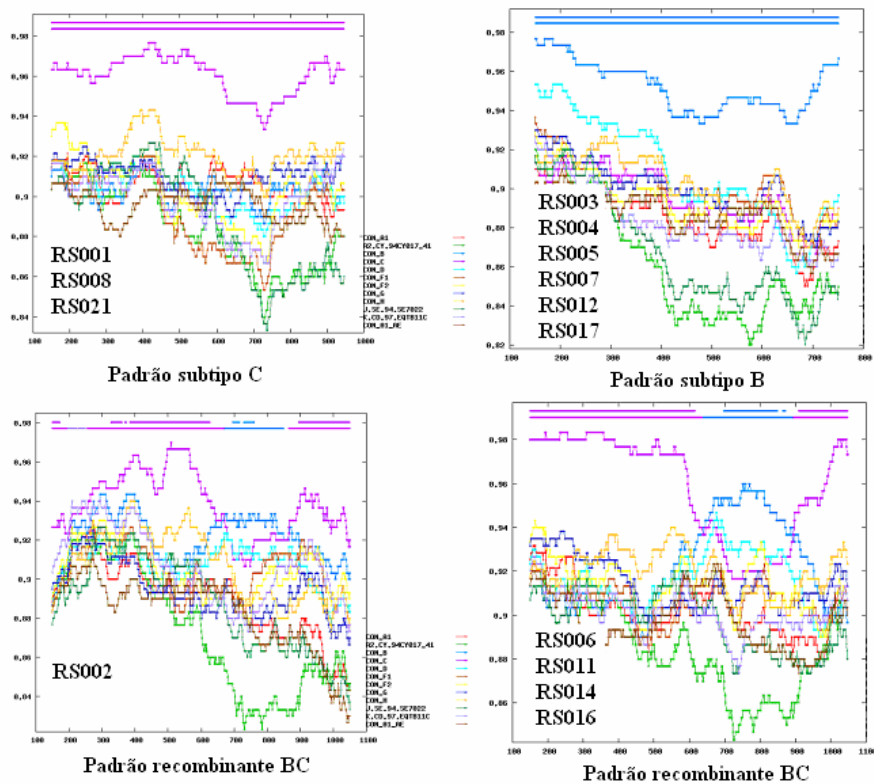


Figura 5.13 - Padrões genéticos do fragmento *pol* dos isolados de Porto Alegre, analisado a partir da investigação de recombinantes através do programa RIP 3.0 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/RIP3/RIP.html>).

### 5.5.2 Análise comparativa das regiões LTR, gag, pol e env do HIV-1

De 88 fragmentos genômicos virais estudados (04 regiões genômicas, LTR, gag, pol e env, de 22 amostras de pacientes de Porto Alegre), foi obtido sucesso em 71 testes (~81%) (Tab. 8; LTR e gag/env detalhados nos Anexos 3 e 3a; pol detalhada no ítem acima). O percentual de 19% de insucesso para a amplificação molecular dos fragmentos genômicos se deveu principalmente ao volume insuficiente de material colhido e sua qualidade. O resultado da análise molecular do genoma desses isolados mostrou ser concordante com outros trabalhos que reportam a ocorrência de vírus dos subtipos B, C e F para a referida região geográfica. Dentre os isolados avaliados, verificou-se a presença de 08 potenciais genomas recombinantes intergênicos (RS002, RS009, RS010, RS013, RS014, RS020, RS021 e RS022) (Tab. 5.4), sendo que 01 desses (RS002) apresentou inclusive uma recombinação intragênica no gene pol. A análise filogenética desse isolado para o gene pol, mostrou uma divergência significativa em relação às demais amostras testadas e às cepas de referência utilizadas durante a análise. A amostra foi submetida a análises com ferramentas específicas de determinação de genes recombinantes para HIV e permitiu a determinação de sua natureza recombinante CB (Fig. 5.12). Em uma análise que levou em consideração os 10 isolados com série completa de genes amplificados e subtipados, observou-se a ocorrência 08 isolados potencialmente não-recombinantes, sendo 05 de subtipo B, 03 de subtipo C, e 02 BC. Em 45% das amostras estudadas não foi possível a determinação do subtipo em pelo menos uma região gênica avaliada. Dentre essas, 23% foram consideradas como subtipo não determinado, pela imprevisibilidade dos resultados para os genes não classificados (Tabela 5.4). A contribuição gênica dos subtipos de HIV-1 para a composição dos isolados de Porto Alegre encontra-se apresentada na Figura 5.14.

Tabela 5.4: Caracterização molecular dos isolados de Porto Alegre e Salvador envolvendo regiões gênicas LTR, gag, pol e env.

**Tabela 8 – Caracterização molecular dos isolados de Porto Alegre e Salvador envolvendo as regiões gênicas LTR, gag, pol e env**

Isolados	Genes subtipados			
	LTR	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
RS001	NR*	C	C	C
<b>RS002</b>	NR	C	CB	C
RS003	B	B	B	B
RS004	B	B	B	B
RS005	B	B	B	B
RS006	C	C	C	C
RS007	B	B	B	B
RS008	NR	C	C	C
RS009	NR	C	NR	B
RS010	NR	C	NR	B
RS011	C	C	C	C
RS012	B	B	B	NR
<b>RS013</b>	B	C	NR	B
<b>RS014</b>	B	C	C	B
RS015	NR	B	NR	NR
RS016	C	C	C	C
RS017	B	B	B	B
RS018	B	B	NR	B
RS019	NR	F	NR	F
RS020	NR	B	NR	F
<b>RS021</b>	C	C	C	B
RS022	NR	C	NR	B
<b>BA023</b>	B	F	NR	F
<b>BA109</b>	B	BF	NR	B"
<b>BA152</b>	B	BF	NR	B
BA168	B	BF	NR	B
<b>BA184</b>	B	BF	NR	B
<b>BA500</b>	B	BF	NR	B

\*Não realizado

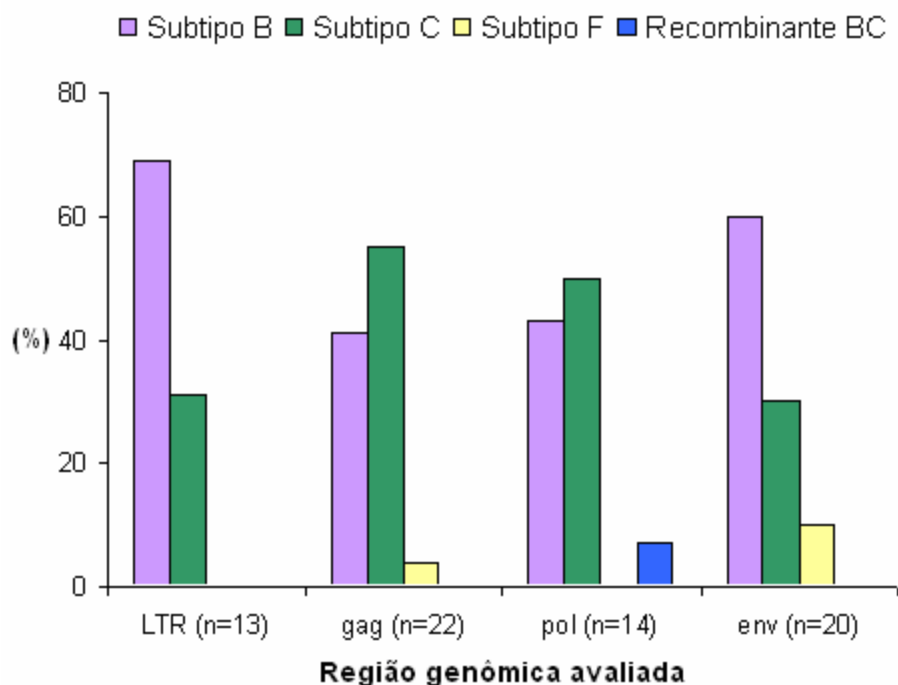


Figura 5.14 - Contribuição gênica dos subtipos de HIV-1 para a composição dos isolados de Porto Alegre.

O resultado da análise filogenética dos isolados de Porto Alegre baseada na concatenação dos 04 fragmentos gênicos avaliados é apresentado na figura 20 mostrando um claro agrupamento dos isolados RS003, RS004, RS005 e RS017 em um mesmo ramo da árvore, que compartilha um mesmo ancestral comum, enquanto o RS007 mostrou estar mais relacionado com o ramo da cepa HXB2. Os demais isolados concatenados, RS002, RS006, RS008, RS0011, RS016, RS014, RS021, agruparam entre os isolados de referência do subtipo C, confirmando o caráter monofilético dos isolados C brasileiros. Dentro deste ramo, ocorre uma bifurcação que separa os isolados RS006, RS011 e RS016 dos demais, apresentando-se de forma muito relacionada entre si. O RS021 apresenta-se disposto de forma intermediária entre os dois sub-ramos que caracterizam a monofilia para os isolados C dos isolados de Porto Alegre (Fig. 5.15).



### 5.5.3 Caracterização biológica dos isolados virais

A caracterização biológica dos vírus de Porto Alegre foi realizada a partir do isolamento das amostras que foram selecionadas preferencialmente para contemplar o subtipo C. A caracterização fenotípica, conduzida a partir da infecção de macrófagos primários e células de linhagens tumorais por sobrenadantes infecciosos dos isolados RS001, RS002, RS006, RS008, RS016, RS021 e RS022, permitiu a confirmação do caráter R5 exibido pelos isolados com envelope típico de subtipo C, independente das características moleculares das demais regiões gênicas avaliadas. Os dois isolados com *env* de subtipo B RS021 e RS022 apresentaram tropismo duplo para os receptores CCR5 e CXCR4. A caracterização dos subtipos virais destes isolados, com base nas regiões, *gag*, *env*, *pol* e LTR do HIV-1, assim como as respectivas caracterizações biológicas *in vitro* encontram-se descritas na Tabela 9.

Tabela 5.5 - Caracterização Fenotípica dos isolados de subtipo C de Porto Alegre.

Isolado	Caracterização Molecular				Caracterização Biológica					
	Gag	<i>env</i>	<i>pol</i>	LTR	Replicação viral em macrófagos	Indução de Sincícios			Uso de Receptores de quimiocinas	
						MT2	SupT1	PM1	CCR5	CXCR4
RS001	C	C	C	C	+	+	+/-	+	+	+
RS002	C	C	C/B	B	+	-	-	+	+	-
RS006	C	C	C	C	+	-	-	+	+	-
RS008	C	C	C	B	+	-	-	+	+	-
RS016	C	C	C	C	+	-	-	+	+	-
RS021	C	B	C	C	+	+	+	+	+	+
RS022	C	B			+	+	+	+	+	+



**6 MANUSCRITO I: GENETIC AND BIOLOGIC CHARACTERIZATION OF HIV TYPE 1 SUBTYPE C ISOLATES FROM SOUTH BRAZIL.**

**ARTIGO PUBLICADO: AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, 2007.**

**GENETIC AND BIOLOGIC CHARACTERIZATION OF HIV TYPE 1 SUBTYPE C ISOLATES FROM SOUTH BRAZIL.**

**JOANA P. MONTEIRO, GERALDO A. FERRARO, TÚLIO OLIVEIRA, LUCIANO Z. GOLDANI, SIMONE KASHIMA, LUIZ C.J. ALCANTARA, MARIZA G. MORGADO, DUMITH CHEQUER BOU-HABIB, BERNARDO GALVÃO-CASTRO.**

# Genetic and Biologic Characterization of HIV Type 1 Subtype C Isolates from South Brazil

JOANA P. MONTEIRO,<sup>1</sup> GERALDO A. FERRARO,<sup>1,2</sup> TÚLIO OLIVEIRA,<sup>3</sup> LUCIANO Z. GOLDANI,<sup>4</sup>  
SIMONE KASHIMA,<sup>5</sup> LUIZ C.J. ALCANTARA,<sup>1,2</sup> MARIZA G. MORGADO,<sup>6</sup>  
DUMITH CHEQUER BOU-HABIB,<sup>7</sup> and BERNARDO GALVÃO-CASTRO<sup>1,2</sup>

## ABSTRACT

The molecular and biological properties of HIV-1 subtype C strains from South Brazil were investigated. We sequenced *gag* and *env* fragments of viruses from 22 HIV-1-infected individuals from Porto Alegre City, which has the highest frequency of subtype C in the country. The sequences were then compared with other subtype B, C, and F strains isolated in Brazil and other countries using phylogenetic methods. Amino acid signatures were identified and correlated with phenotypic characteristics. We identified six strains with subtype C (27.3%), eight subtype B (36.4%), one subtype F (4.5%), six C/B recombinants (27.3%), and one B/F recombinant (4.5%). The Brazilian subtype C sequences formed a unique phylogenetic group and presented 6 and 18 specific amino acid signatures in *gag* and *env*, respectively. Three distinct patterns of C/B recombinants presented characteristic Brazilian amino acid substitutions. Subtype C viruses were predominantly R5 and non-syncytium-inducing, while C/B recombinants were R5/X4 and syncytium-inducing viruses. These findings suggest that subtype C viruses circulating in Brazil are the result of a unique introduction into the country. Recombination events between subtypes B and C have been occurring frequently for more than 10 years in South Brazil. Biological characterization confirms the hypothesis that subtype C is distinct from the others in the evolution of coreceptor utilization.

## INTRODUCTION

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE GENETIC VARIABILITY, biological properties, and pathogenicity of HIV-1 is not well established, in part because the majority of research efforts have focused on subtype B, which is the most prevalent subtype in the western world. However, subtype C is currently the most prevalent genetic form of HIV-1, accounting for more than 56% of all infections worldwide.<sup>1</sup> The rapid spread of subtype C has been related to host, viral, and socioeconomic factors. There is growing evidence that molecular and biological characteristics distinguish subtype C viruses from other subtypes, and that such differences may lead to increased fitness, possibly affecting transmission and pathogenesis.<sup>2–6</sup>

Although the incidence of HIV/AIDS in Brazil began to decline in 1996, infection rates have increased in recent years (<http://www.aids.gov.br>). The HIV/AIDS epidemic in Brazil is characterized by the predominance of subtype B; however, the increased prevalence of non-B subtypes<sup>7,8</sup> has contributed to the emergence of variant viruses that may eventually become resistant and/or undetectable with current diagnostic tests. Therefore, HIV-1 molecular surveillance programs are of paramount importance to systematically monitor the distribution of HIV-1 and document the introduction of new variants.

The subtype C epidemic has been increasing in Brazil since its introduction around 1990,<sup>9</sup> particularly in the South Region, where prevalence varies between 25% and 45%.<sup>10,11</sup> However, the few studies that have characterized subtype C strains cir-

<sup>1</sup>Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>2</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>3</sup>Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK.

<sup>4</sup>Unidade de Medicina Interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/UFRS, Porto Alegre, RS.

<sup>5</sup>Hemocentro de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>6</sup>Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular and <sup>7</sup>Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

culating in Brazil have focused on the *pol* region, so the biological properties of Brazilian subtype C are largely unknown.<sup>12,13</sup> In this work, we assessed HIV-1 subtypes in Porto Alegre, a city in the South Region of Brazil with at least three circulating HIV-1 subtypes and the highest rate of subtype C infection in the country.<sup>10</sup> This study represents the first investigation taking into account the association of molecular and biological features of a panel of subtype C viruses in Brazil and contributes to the understanding of both its evolutionary history in South Brazil and the HIV-1 epidemic in this region.

## MATERIALS AND METHODS

### *Patient population*

In 2003, blood samples were obtained from 22 HIV-1-infected patients followed up at the Hospital de Clínicas in Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). Subjects gave informed consent to participate in the study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) for viral isolation and DNA extraction.

### *Virus isolation and biological characterization*

HIV-1 isolation and expansion were performed according to WHO/UNAIDS guidelines.<sup>14</sup> To investigate each isolate's ability to replicate in monocyte-derived macrophages, these cells were infected with HIV-1-positive cell-free supernatants, as previously described.<sup>15</sup> The preferential coreceptor usage of the primary viruses was assessed by infecting U87 cells transfected with CD4 and chemokine receptors.<sup>15</sup> The isolate's ability to induce syncytium formation was evaluated by infecting MT-2, Sup-T1, and PM-1 CD4<sup>+</sup> T cell lines with these viruses, as described previously.<sup>15</sup> The CCR5-dependent isolate Ba-L and the CXCR4-using virus III-B were used as controls in all assays.

### *DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR), and sequencing*

DNA was extracted using the Qiagen extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA). A nested PCR assay was conducted for individual amplification of the *gag* (~450 bp) and *env* (~550 base pairs) regions using a Perkin Elmer 9600 Thermal Cycle. The *gag* amplification used H1G777/H1P202 and H1Gag1584/G17 as outer and inner primer sets, while the *env* amplification used ED5/ED12 and ED31/ED33, respectively, as outer and inner primers. PCR conditions were as described elsewhere.<sup>16,17</sup> PCR products were purified in Qiagen columns (QIAGEN, Valencia, CA) and sequenced in an ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using a Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the same PCR inner primers. Sequences were assembled using SeqMan software (DNASStar, Madison, WI) and were reported to the GenBank database under accession numbers DQ358756 to DQ358798 and DQ394366.

### *Phylogenetic analysis*

For subtype determination, sequences were aligned with an HIV-1 subtype reference set from the Los Alamos database

(<http://hiv-web.lanl.gov>) in CLUSTAL X<sup>18</sup> and manually edited in GENEDOC.<sup>19</sup> Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method with the TVM + I + G (*env*) and GTR + I + G (*gag*) models of substitution implemented in PAUP\*4.0b2a.<sup>20</sup> The reliability of each cluster was determined using 1000 bootstrap replicates. Trees were drawn with the TreeView program<sup>21</sup> and the subtyping results were confirmed using the REGA HIV-1 subtyping tool.<sup>22</sup>

To examine intrasubtype C relationships, a subset of *gag* and *env* subtype C sequences (including our new Brazilian sequences, previously characterized Brazilian sequences, and multiple subtype C sequences from other countries) was submitted to phylogenetic analysis as described above, using the GTR + I + G model of substitution. Mean genetic distances within and between groups were measured with the Kimura two-parameter model implemented in MEGA 2.0,<sup>23</sup> using 500 bootstrap replicates to calculate the standard deviations. To identify amino acid patterns, nucleotide sequences were translated in GENEDOC, and amino acid sequences were compared to the world consensus subtype C using the BIOEDIT program.<sup>24</sup> Sequences were screened for the presence of biologically important sites with the Prosite database.<sup>25</sup>

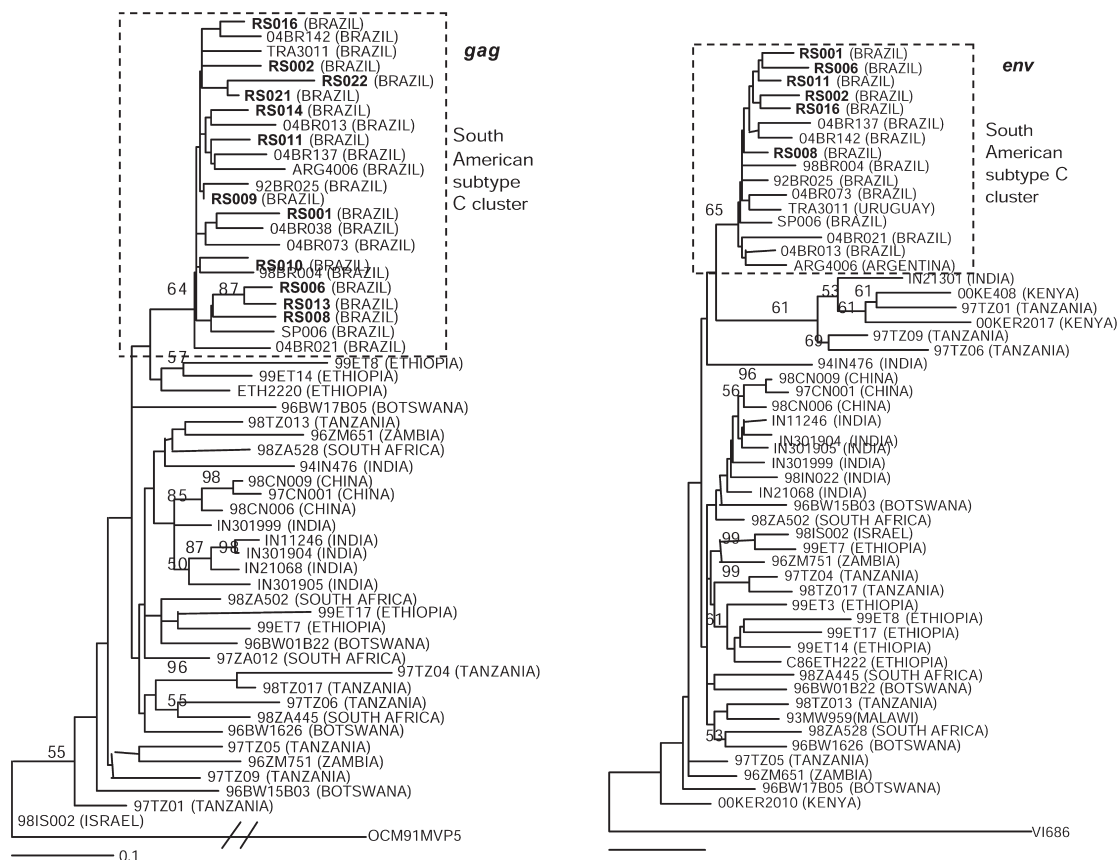
Samples with discordant subtype classifications had their *gag* and *env* sequences attached (1000 bp) and analyzed using the bootscanning method implemented in SIMPLOT software.<sup>26</sup> Based on these 1000 base pair sequences, a phylogenetic tree was constructed using the methodology described above. To further investigate the relationship between mosaic viruses circulating in Brazil, each recombinant 1000-bp fragment was also submitted to bootscanning analysis, using reference strains from subtypes A–K and one of the other Brazilian recombinants.

## RESULTS

Among the 22 HIV-1-infected individuals, 9 (41%) were women (male-to-female ratio of 1.44), 68% reported heterosexual behavior, and 41% were intravenous drug users (IDU). Mean age was 36 years, and mean income was \$293/month. Most of the patients (72.7%) had opportunistic disease and/or CD4 counts typical of AIDS status (Centers for Disease Control and Prevention classification—<http://www.cdc.gov/hiv/pubs/guidelines.htm>). Except for individuals RS021 and RS022, who were twin brothers and IDU, the patients were not epidemiologically related.

Phylogenetic analysis of *env* and *gag* regions showed that 15 specimens (68%) had concordant subtypes in both genomic regions: 8 subtype B (36.4%), 6 subtype C (27.3%), and 1 subtype F (4.5%). Discordant subtypes were observed for 7 (32%) samples, suggesting the possibility of recombinant viruses. Through recombination analysis using bootscanning, we classified 6 (27.3%) of these viruses as subtype C in *gag* and subtype B in *env* and one (4.5%) as subtype B in *gag* and subtype F in *env* (data not shown).

To examine the intrasubtype relationships between subtype C strains, trees were constructed using published C sequences from different countries (Fig. 1). All new and previously described Brazilian subtype C (C<sub>BR</sub>) sequences, including strains from Porto Alegre isolated between 1992 and 2003, as well as one sequence from Argentina and one sequence from Uruguay,



**FIG. 1.** *gag* and *env* phylogenetic relationships among subtype C HIV-1 viruses from different countries. Group O sequences were used as the outgroup. All new and previously described Brazilian subtype C sequences formed a monophyletic group shown within the box. Trees were constructed using the neighbor-joining method and the bootstrap values for 1000 replicates are indicated. Branches highly supported by the ML method are indicated (\*\**p* < 0.001). HIV-1 sequences generated in the present study are indicated in bold and those presenting discordant subtyping are underlined.

grouped as a single monophyletic group in both *gag* and *env* neighbor-joining and maximum-likelihood analyses. Contrasting, sequences from all other countries were widely dispersed across multiple clusters. Concerning the levels of viral diversity within each geographic group (Table 1), C<sub>BR</sub> sequences exhibited lower levels of divergence than those from other countries. Brazilian subtype B presented greater intrasubtype

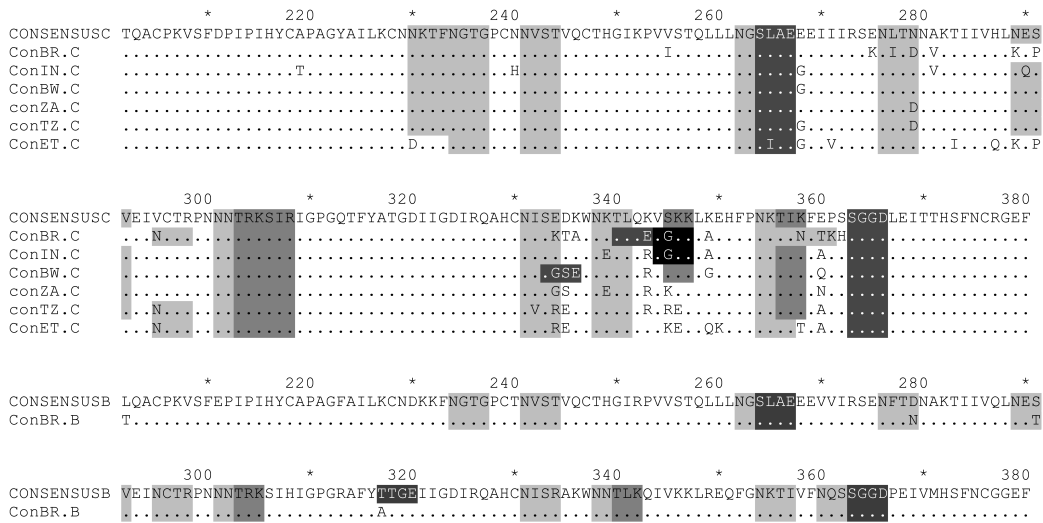
diversity than Brazilian subtype C in both *gag* and *env* regions. No significant differences in the mean distances between groups were observed.

We next investigated whether C<sub>BR</sub> sequences had characteristic amino acid substitutions (Fig. 2). In the 180 amino acid fragment of envelope (positions 202–382 in HXB2), considering only the substitutions with frequency equal to or greater

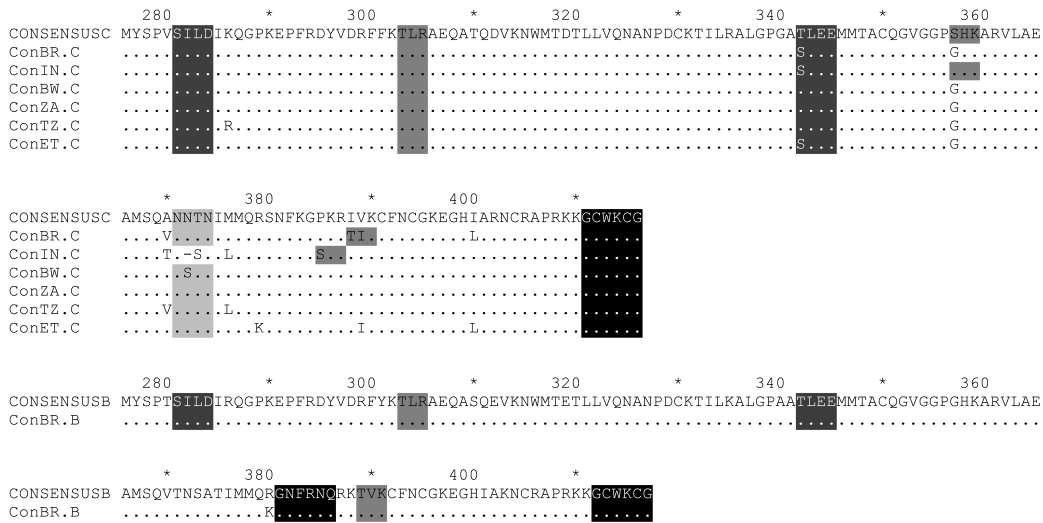
TABLE 1. DNA DISTANCES OF DIFFERENT GEOGRAPHIC GROUPS OF SUBTYPE C SEQUENCES AND BRAZILIAN SUBTYPE B SEQUENCES

Country and ethnic group	Subtype	Mean distance % (no. of viruses) [standard deviation]		
		<i>env</i> (C2–C3)	<i>env</i> V3	<i>gag</i>
Brazil	C	7.6 (14) [0.7]	4.4 (14) [1.2]	3.7 (20) [0.4]
India	C	8.6 (12) [0.7]	6.4 (12) [1.3]	5.0 (14) [0.6]
Botswana	C	12.4 (13) [0.9]	10.5 (13) [1.7]	6.5 (15) [0.6]
South Africa	C	12.1 (15) [0.8]	12.2 (15) [2.0]	5.7 (14) [0.6]
Tanzania	C	15.8 (7) [1.3]	12.8 (7) [2.7]	7.0 (7) [0.8]
Ethiopia	C	12.0 (8) [1.1]	13.1 (8) [2.4]	6.0 (7) [0.7]
Brazil	B	14.4 (14) [1.1]	15.3 (14) [2.3]	8.0 (10) [0.8]

(a) *env*



(b) *gag*



(c) V3 loop

	11	18	25	29	
CONSENSUS C	CTRPNNNTRKSI	RIGPGQT	FYATGDI	IIGDIRQAHC	
CONSENSUS B	.....H.....	RA..T..E.....			
RS001 (C)	.....	.....	E.....	.....	+3 R5/X4 SI MT
RS002 (C)	.....	.....	R.....	.....K.....	+5 R5 NSI MT
RS006 (C)	.....	.....	E.....	.....Y.....	+1 R5 NSI MT
RS008 (C)	.....	.....	.....	.....	+3 R5 NSI MT
RS016 (C)	.....	.....	.....	.....E.....	+2 R5 NSI MT
RS021 (C/B)	.....	P..F.RVL	.....	.....	+4 R5/X4 SI MT
RS022 (C/B)	.....	P..F.RVL	.....K.....	.....	+6 R5/X4 SI MT

**FIG. 2.** Multiple alignment of consensus subtype C amino acid sequences for different geographic groups of *gag* (a) and *env* (b) compared with the world consensus C sequence, and signature patterns for each of these groups. Brazilian subtype B sequences were also aligned against the world consensus B. Functional motifs are shaded differently: N-linked glycosylation (light gray); protein kinase C phosphorylation (medium gray); casein kinase II phosphorylation (dark gray); amidation site (black). (c) Summary of mutations in the V3 region of the seven HIV-1 isolates studied. Amino acid positions above the alignment are numbered according to their positions in the V3 loop. Net charges and the biological properties of each isolate are indicated at the right of the sequences. R5, tropic for CCR5 coreceptor; R5X4, tropic for both CCR5 and CXCR4 coreceptors; NSI, non-syncytium-inducing when exposed to MT-2 and Sup-T1 cell lines; SI, syncytium-inducing when exposed to MT-2 and Sup-T1 cell lines; MT, able to replicate in macrophages.

than 50%, C<sub>BR</sub> sequences ( $n = 12$ ) differed at 18 positions from the world consensus C (consC). Of these, 11 substitutions were exclusive of C<sub>BR</sub> sequences: V255I (50%), E275K (92%), L277I (58%), E334K (58%), D335T (58%), K336A (83%), K343E (75%), K358N (50%), E360T (75%), P361K (58%), and S362H (92%). In *gag*, C<sub>BR</sub> sequences ( $n = 18$ ) showed 6 changes in 141 amino acids (positions 276–417 in HXB2) when compared to the world consensus, one of which (I388T, 83%) represented exclusive substitution of Brazilian sequences.

To evaluate whether the C<sub>BR</sub> amino acid substitutions were restricted to Brazilian subtype C sequences, we looked for these signatures in our set of subtype B (B<sub>BR</sub>) sequences. In *env* ( $n = 13$ ), only the V295N (92%) substitution was present among B<sub>BR</sub> sequences, while in *gag* ( $n = 10$ ), three signatures were also present in subtype B: S357G (80%), A370V (70%), and I388T (50%). When we compared B<sub>BR</sub> with the world consensus subtype B to investigate a possible signature pattern, four significant substitutions were found in *env*: L202T (85%), D279N (61%), S291T (54%), and T317A (77%), and one specific signature (R380K, 50%) was observed in *gag*.

The significance of C<sub>BR</sub> amino acid substitutions was evaluated through their impact on functional motifs. In the consensus C, 9 potential N-linked glycosylation sites were found in the *env* fragment, 8 of which were conserved among C<sub>BR</sub> sequences. Substitutions N289K and S291P were associated with elimination of the N-linked glycosylation site at positions 289–293; however, the V295N amino acid change led to a new adjacent N-linked site (positions 295–298). Another alternative N-linked site (positions 358–361) appeared as a consequence of substitutions K358N, E360T, and P361K. C<sub>BR</sub> substitutions S345G and K358N resulted in the loss of two potential protein kinase C phosphorylation (PKC) sites (positions 345–347 and 356–358, respectively), while K343E and S345G resulted in (respectively) a new casein kinase II phosphorylation motif (positions 340–343) and a new amidation site (positions 344–347). In *gag*, two C<sub>BR</sub> substitutions were associated with changes in functional motifs; S357G resulted in a loss of a PKC site (positions 357–359) and I388T led to the emergence of a new PKC site (positions 388–390).

Since we observed that 27.3% of our samples were potential C/B recombinants, we further characterized the phylogenetic relationships of these viruses. A phylogenetic tree was constructed based on the attachment of *gag* and *env* (1000 bp) sequences (Fig. 3a). All six recombinants clustered as a monophyletic group (bootstrap = 88) that fell between subtype C and subtype B clusters and included a C/B recombinant from Argentina (ARE195FL). Bootscanning analysis (Fig. 3b) showed that all recombinant C sequences (*gag*) were more similar to those of other recombinants than to reference strain sequences, which did not always occur with the recombinant subtype B region (*env*). However, the RS014, RS021, and RS022 isolates were more similar to each other in both regions than to other reference strains. The same was observed for isolates RS009 and RS010. The B region of isolate RS013 was always more similar to a subtype B reference strain than to other Brazilian recombinants. All recombinants presented the six *gag* amino acid substitutions observed in C<sub>BR</sub> sequences, except RS013, which did not have the T342S substitution. Recombinant sequences were found to contain B<sub>BR</sub> *env* substitutions L202T (83%), D279N (67%), and T317A (67%), and the V295N (83%)

substitution characteristic of B<sub>BR</sub> and C<sub>BR</sub> sequences. In addition, RS021 and RS022 were probably epidemiologically linked viruses. Their *gag* sequences presented 13 nucleotide mutations that resulted in five amino acid substitutions (3.1% of nucleotide pairwise distance), while their *env* fragments were characterized by 29 mutations that resulted in 16 amino acid substitutions (5.6% of mean distance).

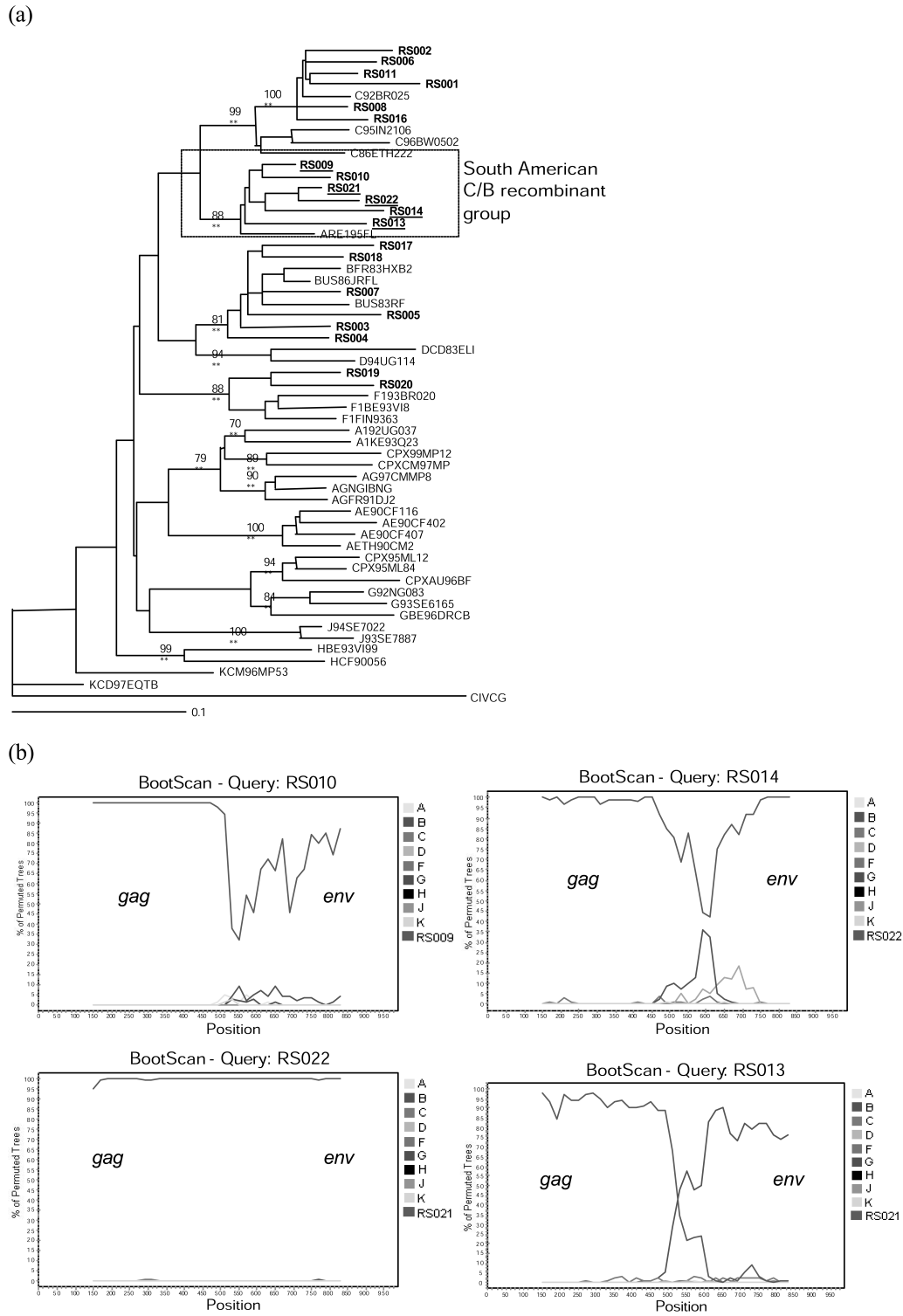
We isolated and investigated the biological properties of seven viruses from our cohort. All isolates were macrophage tropic in culture. Four of the five subtype C strains infected only U87 CCR5<sup>+</sup> cells (R5 viruses), while the fifth (RS001) was also able to use the CXCR4 coreceptor, albeit with lower cytopathogenicity relative to the use of CCR5. Both recombinants were able to use both CCR5 and CXCR4 coreceptors (R5/X4 viruses). The four subtype C R5 isolates did not form syncytium when exposed to MT-2 and Sup-T1 cell lines (NSI viruses), while the three dual tropic viruses induced syncytium in these cells (SI viruses). As expected, all isolates were able to form syncytia in CCR5<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> PM-1 cells.

Since coreceptor and T cell line tropisms are associated with basic amino acids in the V3 loop in subtype B and CRF01\_AE viruses, we characterized the V3 region of our isolates (Fig. 2c). None of the subtype C isolates had positively charged residues at positions 11, 25, and 29. However, isolate RS002 presented positive residues at positions 18 and 32, resulting in an overall charge increase of +5. A neutral serine residue was always present at position 11, while a negatively charged amino acid (either D or E) was present at position 25. The characteristic subtype C GPGQ motif at the tip of the loop was conserved in all but one subtype C isolate (RS002). In contrast, the C/B recombinants had a basic residue at position 18 (arginine, characteristic of B viruses) and RS022 also had another residue at position 25, increasing the overall charge to +6, which is characteristic of SI viruses. The potential N-linked glycosylation site NXT at positions 6–8, highly conserved in most HIV-1 isolates, was present in all of our isolates, and in all other Brazilian sequences except RS014. Overall, C<sub>BR</sub> V3 sequences were three times more conserved than B<sub>BR</sub> sequences (Table 1).

## DISCUSSION

Despite the small number of individuals enrolled in this present study, they presented features similar to the current tendencies of the Brazilian HIV/AIDS epidemic: (1) patients were primarily female (here, the sex ratio was 1.44, whereas a ratio of 4.0 was registered in 1993<sup>27</sup>), (2) there was a marked frequency in reported heterosexual behavior (68.2%), and (3) patients were of low socioeconomic status (on average).

The prevalence of subtype C was 27.3% for both *gag* and *env* genes and 55% when including recombinants involving subtype C. The high proportion (27.3%) of recombinant subtypes B and C viruses in our cohort is similar to that found by a study based on *pol* region analysis (25%).<sup>10</sup> The circulation of BC recombinant strains in Brazil was reported previously; however, the majority of these reports were based on *pol* analysis.<sup>10,11,28</sup> Other studies have found different patterns of BC recombination between different fragments of *gag* and *env*.<sup>29,30</sup> The C/B strains identified here presented a genetic structure similar to



**FIG. 3.** *gag* and *env* C/B recombinant viruses among Brazilian HIV-1 samples. Analyses were performed based on the attachment of *gag* and *env* sequences. (a) NJ tree showing the phylogenetic relationships of the Brazilian C/B recombinant viruses relative to other subtypes in the group M data set. The recombinant cluster is shown in the gray box and the bootstraps for the cluster is indicated. Branches highly supported by the ML method are indicated (\*\* $p < 0.001$ ). (b) Bootscan analysis showing the relationship between the Brazilian C/B recombinant sequences. In this analysis isolates (RS010 and RS009, RS022 and RS021, and RS022 and RS014) are more similar to each other than to reference sequences, while isolate RS013 is more similar to a subtype B reference strain in its *env* region than to other Brazilian recombinants.

an Argentine recombinant.<sup>31</sup> The monophyletic group and the observation of Brazilian signature amino acids in their *gag* and *env* sequences suggest local recombination events. Comparing the six C/B recombinants, we observed at least three distinct patterns of recombination, suggesting that recombination events are very frequent. Furthermore, we could speculate that recombination events between these two subtypes have been occurring for more than 10 years in Brazil, since patients RS021 and RS022 were seropositive in 1998, and the first BC recombinant in Brazil was detected by 1992–1993.<sup>29</sup>

The monophyletic group formed by C<sub>BR</sub> sequences in both *gag* and *env* confirms that this subtype was recently introduced in South Brazil from one or more similar founder strains, as previously suggested by *pol* evaluation.<sup>28</sup> This hypothesis is also supported by the fact that mean distances of C<sub>BR</sub> sequences are lower than those of subtype C viruses from Africa and of Brazilian subtype B viruses, which represent longer duration AIDS epidemics caused by multiple virus introductions.<sup>25,32,33</sup> C<sub>BR</sub> viruses had average distances more similar to those of Indian C viruses, which, as suggested, represent a recent and unique introduction of this subtype.<sup>33</sup> In addition, one virus from Argentina and another from Uruguay clustered inside the Brazilian group. Considering that subtype C was first detected in Argentina by 1999 and in Uruguay by 2001,<sup>34</sup> subtype C probably spread from Brazil.

The close relationship among C<sub>BR</sub> viruses is also supported by a pattern of signature amino acids in both genomic regions. These amino acid sites may have evolutionary, structural, and phenotypic significance. For instance, out of 18 sites differentially conserved in C<sub>BR</sub> sequences, 5 were proposed to be positively selected (positions 281, 291, 335, 336, and 343 of gp120).<sup>35</sup> We could also associate some C<sub>BR</sub>-specific signatures with lost or emergent N-linked glycosylation sites in the envelope. Carbohydrates in the gp120 limit the humoral immune response and help shield the virus from immune recognition.<sup>36,37</sup> Moreover, removal of N-linked glycans enhances CTL responses to HIV-1 *env*.<sup>38</sup> We observed, for instance, that Brazilian C sequences lacked the N-linked site at positions 289–293; however, a new site was found closely adjacent. A similar phenomenon was observed in the V1 region by Reitter *et al.*,<sup>36</sup> indicating a potential strategy for maintenance of these N-linked sites within gp120.

Although the five subtype C isolates were obtained from AIDS patients, these viruses preferentially used CCR5, similar to previous reports demonstrating that this subtype is distinct in the evolution of coreceptor utilization.<sup>39</sup> In association, V3 sequences of subtype C viruses were highly conserved and had lower overall positive charge than subtype B sequences, which is consistent with the NSI phenotype of subtype C viruses, as reported previously.<sup>40</sup> Indeed, none of C<sub>BR</sub> specific amino acid substitutions occurred in this genomic region. However, Brazilian exclusive substitution V295N created a new N-linked glycosylation site at position –1 of the V3 loop that is characteristically absent in most C viruses.<sup>25</sup> The absence of this site was associated with the presence of a serine phosphorylation site at position 11, which could contribute to an efficient use of CCR5 in subtype C viruses.<sup>25</sup> However, C<sub>BR</sub> viruses, which are effective in utilizing CCR5, have both N-linked and phosphorylation sites. Thus, further analysis may reveal the true importance of these sites for viral entry. In addition, the dual tropic

subtype C isolate (RS001) did not present basic amino acids in V3 sequences, and its net charge (+3) was similar to that of NSI viruses. This suggests that other regions of *env* may contribute to X4 tropism, as previously suggested.<sup>41,42</sup>

Among our samples, recombination events always occurred with subtype C in *gag* and subtype B in *env*. Since these patients presented advanced stages of disease, and considering that the R5-to-X4 switch occurs in at least 50% of subtype B-infected individuals,<sup>43</sup> the selection of these variants may be related to biological features of the subtype B envelope. Indeed, the two C/B recombinants were dual tropic and syncytium-inducing viruses, features more frequently observed among subtype B strains.

Our results point to a high genetic diversity of HIV-1 in South Brazil. One contributing factor is the elevated rate of recombinant events over a long period of time. However, since no circulating recombinant forms (CRF) containing Brazilian subtype C viruses have been described, studies involving the complete genome of Brazilian subtype C strains are needed. We also can conclude that subtype C isolates from South of Brazil are phenotypically similar to those in other regions.

## SEQUENCE DATA

The sequences were reported to the GenBank database under accession numbers DQ358756 to DQ358798 and DQ394366.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Hemocenter of Bahia and to Hemotherapy Service of the Hospital Clementino Fraga Filho (Federal University of Rio de Janeiro, RJ) for providing buffy coats from normal donors and to the Bioinformatic Laboratory of the LASP/CPqGM/FIOCRUZ. We thank Mrs. Elisabeth Deliege Vasconcelos and Mr. Craig Milroy for editing and revising this manuscript. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), the Brazilian Ministry of Health STD/AIDS Program, CNPq, and FIOCRUZ.

## REFERENCES

1. Esparza J and Bhamarapravati N: Accelerating the development and future availability of HIV-1 vaccines: Why, when, where, and how? *Lancet* 2000;355:2061–2066.
2. Salminen MO, Johansson B, Sonnerborg A, Ayejunie S, Gotte D, Leinikki P, *et al.*: Full-length sequence of an ethiopian human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate of genetic subtype C. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1996;12:1329–1339.
3. Carr JK, Salminen MO, Koch C, Gotte D, Artenstein AW, Hegerich PA, *et al.*: Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 1996;70:5935–5943.
4. Ndung'u T, Renjifo B, and Essex M: Construction and analysis of an infectious human immunodeficiency virus type 1 subtype C molecular clone. *J Virol* 2001;75:4964–4972.
5. Montano MA, Novitsky VA, Blackard JT, Cho NL, Katzenstein DA, and Essex M: Divergent transcriptional regulation among ex-



- panding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Virol* 1997;71:8657–8665.
6. Blackard JT, Renjifo BR, Mwakagile D, Montano MA, Fawzi WW, and Essex M: Transmission of human immunodeficiency type 1 viruses with intersubtype recombinant long terminal repeat sequences. *Virology* 1999;254:220–225.
  7. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization: HIV-1 diversity in Brazil: Genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;23:184–193.
  8. Morgado MG, Guimarães ML, and Galvão-Castro B: HIV-1 polymorphism: A challenge for vaccine development. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:143–150.
  9. Salemi M, de Oliveira T, Soares MA, Pybus O, Dumans AT, Vandamme AM, *et al.*: Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol* 2005;60:598–605.
  10. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brígido L, *et al.*: Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNET): A survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003;17:1063–1069.
  11. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhacker RD, Paula Ferreira JL, *et al.*: Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2005;116:201–207.
  12. WHO Network for HIV Isolation and Characterization: HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1327–1343.
  13. De Wolf F, Hogervorst E, Goudsmit J, Fenyo EM, Rubsamen-Waigmann H, Holmes H, *et al.*: Syncytium-inducing and non-syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: Phenotypic and genotypic characteristics. WHO Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1387–1400.
  14. Rubsamen-Waigmann H, von Briesen H, Holmes H, Bjorndal A, Korber B, Esser R, *et al.*: Standard conditions of virus isolation reveal biological variability of HIV type 1 in different regions of the world. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;11:1401–1408.
  15. Ferraro GA, Mello MA, Suttmoller F, Van Weyenbergh J, Shindo N, Galvao-Castro B, *et al.*: Biological characterization and chemokine receptor usage of HIV type 1 isolates prevalent in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:1241–1247.
  16. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, *et al.*: Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257–1261.
  17. Heyndriks L, Janssens W, Zekeng L, Musinda R, Anagonou S, Van Der Awerda G, *et al.*: Simplified strategy for detection of recombinant HIV-1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. *J Virol* 2000;74:363–370.
  18. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D: The CLUSTAL\_X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876–4882.
  19. Nicholas KB, Nicholas HBJ, and Deerfield DW in GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation (EMBNEW NEWS 30), 1997.
  20. Swofford D: PAUP 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), 4.0b2a. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1999.
  21. Page RD: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996;12:357–358.
  22. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, *et al.*: An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005;21:3797–3800.
  23. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, and Nei M: MEGA2: Molecular evolutionary genetic analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244–1245.
  24. Hall TA: BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *NAS* 1999;41:95–98.
  25. Gordon G, De Oliveira T, Bishop K, Coovadia HM, Madurai L, Engelbrecht S, *et al.*: Molecular characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C viruses from KwaZulu-Natal, South Africa: Implications for vaccine and antiretroviral control strategies. *J Virol* 2003;77:2587–2599.
  26. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, and McCutchan FE: Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:1423–1425.
  27. MINISTÉRIO DA SAÚDE: AIDS no Brasil: um esforço conjunto governo—sociedade/Coordenação Nacional de DST e AIDS, 1998.
  28. Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brígido L, *et al.*: A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 2003;17:11–21.
  29. Cornelissen M, Kampinga G, Zorgdrager F, Goudsmit J, and UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization: Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. *J Virol* 1996;70:8209–8212.
  30. Guimarães ML, Moreira AS, Loureiro R, Galvão-Castro B, The Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, and Morgado MG: High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1261–1269.
  31. Aulicino PC, Kopka J, Rocco C, Mangano A, and Sen L: Sequence analysis of a South American HIV type 1 BC recombinant. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:894–896.
  32. Brindeiro R, Vanderborght B, Caride E, Correa L, Oravec RM, Berro O, *et al.*: Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from Brazilian untreated individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1674–1680.
  33. Shankarappa R, Chatterjee R, Learn GH, Neogi D, Ding M, Roy P, *et al.*: Human immunodeficiency virus type 1 Env sequences from Calcutta in eastern India: Identification of features that distinguish subtype C sequences in India from other subtype C sequences. *J Virol* 2001;75:10479–10487.
  34. Carrion G, Eyzaguirre L, Montano SM, Laguna-Torres V, Serra M, Aguayo N, *et al.*: Documentation of subtype C HIV type 1 strains in Argentina, Paraguay, and Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:1022–1025.
  35. Yamaguchi-Kabata Y and Gojobori T: Reevaluation of amino acid variability of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 envelope glycoprotein and prediction of new discontinuous epitopes. *J Virol* 2000;74:4335–4350.
  36. Reitter JN, Means RE, and Desrosiers RC: A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat Med* 1998;4:679–684.
  37. Chackerian B, Rudensey LM, and Overbaugh J: Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. *J Virol* 1997;71:7719–7727.
  38. Doe B, Steimer KS, and Walker CM: Induction of HIV-1 envelope (gp120)-specific cytotoxic T lymphocyte responses in mice by recombinant CHO cell-derived gp120 is enhanced by enzymatic removal of N-linked glycans. *Eur J Immunol* 1994;24:2369–2376.
  39. Cecilia D, Kulkarni SS, Tripathy SP, Gangakhedkar RR, Paranjape RS, and Gadkari DA: Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *Virology* 2000;271:253–258.

40. Korber BT, MacInnes K, Smith RF, and Myers G: Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994;68:6730–6744.
41. Carrillo A and Ratner L: Human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-lymphoid cell lines: Role of the V3 loop and C4 envelope determinants. *J Virol* 1996;70:1301–1309.
42. Hu Q, Barry AP, Wang Z, Connolly SM, Peiper SC, and Greenberg ML: Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 envelope during infection reveals molecular corollaries of specificity for coreceptor utilization and AIDS progression. *J Virol* 2000;74:11858–11872.
43. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, and Landau NR: Ccr5 in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997;185:621–628.

Address reprint requests to:

*Bernardo Galvão-Castro*

*LASP/CPqGM/FIOCRUZ*

*Rua Waldemar Falcão 121*

*Candeal, Salvador, Bahia, Brazil 40296-710*

*E-mail: bgalvao@cpqgm.fiocruz.br*

**7 MANUSCRITO II: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LONG TERMINAL REPEAT SEQUENCES FROM BRAZILIAN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1.**

**ARTIGO SUBMETIDO: JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY.**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LONG TERMINAL REPEAT SEQUENCES FROM BRAZILIAN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1. GERALDO A. FERRARO, FLORA FERNANDES, ALINE MOTA-MIRANDA, CARLOS BRITES, LUIZ CARLOS ALCÂNTARA, BERNARDO GALVÃO-CASTRO, MARIZA G. MORGADO.**



**Molecular Characterization of Long Terminal Repeat Sequences from  
Brazilian Human Immunodeficiency Virus Type 1**

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID:	JMV-07-0428
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	24-Jul-2007
Complete List of Authors:	<p>Ferraro, Geraldo; Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)</p> <p>Fernandes, Flora; Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)</p> <p>Monteiro, Joana; Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)</p> <p>Mota-Miranda, Aline; Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)</p> <p>Brites, Carlos; Hospital Universitário Professor Edgard Santos Alcântara, Luiz; Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)</p> <p>Galvao Castro, Bernardo; Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)</p> <p>Morgado, Mariza; Laboratorio de AIDS &amp; Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)</p>
Keywords:	subtype C, phylogeny, Brazil, LTR, HIV

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Molecular Characterization of Long Terminal Repeat Sequences from Brazilian Human Immunodeficiency Virus Type 1

Authors: Geraldo A Ferraro<sup>\*§</sup>, Flora MC Fernandes<sup>\*§</sup>, Joana P Monteiro<sup>\*</sup>, Aline C Mota-Miranda<sup>\*</sup>, Carlos Brites<sup>#</sup>, Luiz C J Alcantara<sup>\*§</sup>, Bernardo Galvão-Castro<sup>\*§</sup>, Mariza G Morgado<sup>‡</sup>.

Author's affiliation: \*Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil; §Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, Bahia, Brasil; #Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brazil; ‡Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding author:

Bernardo Galvão-Castro

LASP/CPqGM/FIOCRUZ. Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil

40296-710. Telephone # 55 71 3176 2213. Fax # 55 71 3176 2300. E-mail:

[bgalvao@cpqgm.fiocruz.br](mailto:bgalvao@cpqgm.fiocruz.br)

*Shortened title:* Molecular study of HIV-1 LTR-5' from Brazil

**ABSTRACT**

HIV-1 provirus activation is under the control of the LTR-5' viral promoter. Genetic polymorphism of HIV-1 is an important obstacle to the development of effective anti-HIV/AIDS strategies. Genetic variation is seen in the LTR region in all HIV-1 subtypes. It is possible that molecular features could be contributing to the unusual epidemic profile of subtype C spread in Brazilian Southern region. In order to characterize the molecular features of the genetic promoter region of Brazilian isolates, we analyzed the HIV-1 *LTR-5'* genes obtained from 28 HIV-1 infected individuals from two cities; Porto Alegre and Salvador. Sequences were compared with subtype B and C reference strains from Brazil and other countries using phylogenetic methods. Subtype determination based on the LTR-5' region was possible for 18 out of 28 samples (78% B and 22% C). Common patterns of transcription factor binding sites (TFBS) in subtypes B and C LTR were confirmed and other potential specific TFBS for subtype C were found. The Brazilian subtype C LTR-5' contained an additional NF-kappaB binding site, as previously described to the majority of C subtype isolates. The high level of HIV-1 LTR polymorphism may be important for viral fitness. Functional studies should be conducted to better understand these molecular features.

Key words: subtype C, phylogeny, Brazil, LTR, TFBS, NF-kappaB, HIV

## INTRODUCTION

The HIV-1 5' Long Terminal Repeat (LTR-5') is related to transport, integration and control of virus transcription. The general structure of the HIV-1 LTR is subdivided in three regions; U3, R and U5. The U3 region harbors important transcription factors binding sites (TFBS) that are related to the promoter, enhancer and modulatory activities [El Kharroubi & Martin, 1996; Pereira et al., 2000]. The core of the promoter and enhancer regions contains binding motifs for Sp1 (Specific protein 1) and NF-kappaB (nuclear factor kappa B) respectively. Both of these are essential for Tat activity. Besides the Tat protein, which binds to the TAR hairpin on R region, the host cell transcription factors (TF) are also involved in the control of HIV-1 transactivation [reviewed in Kingsman and Kingsman, 1996; Battistini et al., 2002; van Lint, 1997; El Kharroubi & Martin, 1996; Krebs et al., 2001; Berkhout et al., 1989; Dingwall et al., 1989]. The enormous level of HIV-1 polymorphism represents an obstacle to drug development and can additionally, be related to HIV-1 pathogenesis [Hiebenthal-Millow et al., 2003; Ramírez et al., 2007; Cao et al., 1995; Krebs et al., 2001; Deacon et al., 1995; Iversen et al., 1995; Michael et al., 1995; Lum et al., 2003]. The diversity of clinical outcome patterns may be related to these numerous variants. HIV-1 tropism specificity is primarily dictated by the CD4 protein and the chemokine receptors expressed on the cell surface [Berger et al., 1999]. Thus, HIV Env glycoproteins play a fundamental role at the virus entry. The intracellular environment is, however, the main determinant of virus fitness. Thus, the role played by Env proteins on virus fitness is important but not crucial to the establishment of a productive infection. Specific TFs sets in each cell type [Ranjbar et al., 2006; Pomerantz et al., 1990; Vicenzi and Poli, 1994] and the respective binding sequences available within the LTR gene promoter can



1  
2  
3 also impact viral fitness. The genetic variation of the LTR is probably under control of  
4  
5 the same processes that drive the diversity of other genetic regions of HIV-1. The rapid  
6  
7 turnover of viral particles [Ho et al., 1995; Wei et al., 1995], the lack of DNA repair  
8  
9 mechanisms during the reverse transcription process and recombination events, are all  
10  
11 important determinant factors in the generation of viral diversity [Preston et al., 1988].  
12  
13 HIV-1 LTR is especially variable and this feature may determine distinct patterns of  
14  
15 virusreplication. Several studies have reported the presence of cis -acting elements (Sp1,  
16  
17 NF-kappaB, c-Rel, C/EBP, NF-AT, Ets-1, GATA, and so on) and their respective  
18  
19 functional trans-regulatory proteins for virus transactivation [Siebenlist et al., 1994;  
20  
21 Thanos & Maniatis, 1995; Battistini et al., 2002; Van Lint, 1997; El Kharroubi &  
22  
23 Martin, 1996]. In the present work we analyzed the molecular features of the LTR-5'  
24  
25 region of B and C HIV-1 subtypes obtained from 18 Brazilian isolates. We describe  
26  
27 here the major sites of the LTR-5' fragment and have identified potential transcription  
28  
29 factor binding sites.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## MATERIALS AND METHODS

### Study population

Blood samples were obtained in 2003 from 22 HIV-1-infected individuals, regularly followed up at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil and from six patients followed up at Hospital Universitário Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brazil. Subjects signed a written consent form for their inclusion in the study. Patients peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Hypaque (Sigma Chem. Co. St Louis, MO) density gradient centrifugation for viral isolation and DNA extraction. The Ethical Boards of both hospitals approved this work.

### DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing

DNA was extracted using the Qiagen extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA). Nested PCR was conducted for individual amplification of LTR-5' (~690 bp) region in a Perkin Elmer 9600 Thermal Cycle. The LTR-5' amplification was performed using LTR1-F/JL17-R and LTR2-R/LTR3-F as outer and inner primer sets [Varas et al.1995]. PCR products were purified in Qiagen columns (QIAGEN, Valencia, CA) and sequenced in an ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Fodter City, CA) using a Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, Fodter City, CA) and the same PCR inner primers. Sequences were assembled using the software SeqMan (DNASar, Madison, WI).

### Phylogenetic Analysis

LTR sequences from this study (n=18) and 33 selected reference strains [Arellano et al., 2005] from the GenBank/EMBL database were aligned with ClustalX [Jeanmougin et. al., 1998] and manually edited using the GeneDoc program. Tree reconstruction was performed by means of Neighbor-Joining (NJ) using Kimura 2-parameters (Mega 4.0 package). The reliability of the NJ trees was assessed by analyzing 1,000 bootstrap

1  
2  
3 pseudo-replicates. The tree topology of LTR was rooted using sequences from  
4  
5 SIVAGM677 present in the literature (Accession M29973). The GenBank accession  
6  
7 numbers of the new HIV-1 fragments are not yet available.  
8  
9

### 10 11 12 **Characterization of potentials TFBS on LTR-5' fragments**

13  
14  
15 In order to identify the potential TFBS, 18 LTR sequences from Brazilian viruses plus  
16  
17 another 19 non-Brazilian sequences from GeneBank were selected. The selection  
18  
19 criterion of the non-Brazilian isolates was based on the phylogeny data and adequate  
20  
21 length sequence availability. The data set was submitted to the MatInspector [Cartharius  
22  
23 et al., 2005] online bioinformatics tool after alignment and edition. This analysis allows  
24  
25 for the identification of potential TFBS within distinct cell lines. The samples were  
26  
27 analyzed in two groups according to the presence of potential TFBS activity in (1) non-  
28  
29 neuroglia and (2) neuroglia cells. Other additional approaches to identify specific  
30  
31 features on the LTR were carried out throughout the motifs aligning related to TFBS as  
32  
33 Sp1, NF-kappaB and TAR region.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

### Phylogenetic Analysis of the Brazilian LTR-5' Sequences

The final data set of the LTR region after edition comprised a total of 450 bp. In the phylogenetic analysis of the LTR region (Fig. 1), the majority of the HIV-1 isolates (14 out of 18) clustered within the subtype B clade with bootstrap of 78%. The remaining four isolates (RS006, RS021, RS016 and RS011) clustered into the subtype C clade (bootstrap 94%).

### Characterization of Potential and Regular Transcription Factors Binding Sites and TAR Region

The results of the analyses of potential LTR binding sites specific to transcriptional factors with activity in neuroglia and non-neuroglia-cell types are depicted in figure 2. The MatInspector analysis showed higher incidence of potential TFBS within the LTR of the C subtype, when compared to B subtype (HMG-box, c-Rel, NKX3.1, Pou-factor and ngn1/3). Several potential TFBS with activity in non-neuroglia cells showed little or no difference in their frequencies between subtypes C and B. On the other hand, differences could be observed in the C subtype LTR: HMG-box (-61 to -75 nt relative to HXB2; 94% for C and 25% for B subtypes) and c-Rel (-93 to -80 nt relative to HXB2; 81% to C subtype and 0% to B subtype). The analysis of the potential TFBS with activity in neuroglia cells showed that 94% of the C subtype LTR isolates presented at least one potential binding site to Pou-factor and 67% of them had a double Pou-factor binding site (-207 to -192 nt and -142 to -130 nt relative to HXB2). The potential TFBS to Pou-factor was only present in 15% of B LTR subtype isolates. The presence of potential TFBS to NKX3.1 (-171 to -155 nt relative to HXB2) was also found in C

1  
2  
3 subtype LTR isolates at 88% and only at 15% among the subtype B isolates. The  
4 presence of the potential ngn1/3 TFBS (108 to 120 nt relative to HXB2) was exclusive  
5 to the C subtype, with a low frequency (25%). All isolates of subtypes B or C contained  
6 at least one X-Box potential binding site at position 43-61 nt and 121-138 nt relative to  
7 the HXB2 reference sequence. Those spanning positions 43 to 61 was less conserved  
8 and usually not recognized as an x-Box site by the MatInspector software. This was  
9 especially for the C subtype isolates. The evaluation of Sp1 tandem binding sites (III, II  
10 and I) downstream of the NF-kappaB binding sites (-81 to -46 nt relative to HXB2) was  
11 done in all Brazilian new sequences and in other 15 isolates selected from Genebank.  
12 The aligned sequences showed two specific signatures of nucleotides for C subtype (A  
13 at fourth position and T at ninth position) in Sp1(III). The Sp1(II) and (I) sites analyzed  
14 were more conserved than Sp1(III). (Fig. 3). All studied isolates presented the TATA-  
15 box binding site on the promoter region with the common sequence CATATAAG at  
16 position -28 to -24 nt relative to HXB2 (data not show). Four B subtype isolates from  
17 Porto Alegre presented an additional TATA-box or a TATA-box-like, as a potential  
18 TFBS downstream from the first one (153 to 160 nt relative to HXB2). Two of them  
19 had a sequence CATATAGT, other one had CATTATAGT with one T insertion and the  
20 last one had GCTATAAG. All isolates contained the canonical NF-kappaB double site  
21 (spanning -109 to -84 nt relative to HXB2) with the GGGACTTCC sequence. None of  
22 the NF-kappaB binding sites II and I had the conserved GGGA core following by  
23 CTTTCC subjacent sequence in subtype B viruses. The Brazilian subtype C viruses  
24 contained a deletion of an A (GGG-) and a substitution of a T to a G (CGTTCC) at the  
25 fourth and sixth position respectively within the second Sp1 tandem site. The additional  
26 NF-kappaB binding site (-119 to -113 nt relative to HXB2) was identified in almost all  
27 C subtype isolates, included the Brazilian strains. Only one C isolate did not have the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

third NF-kappaB binding site (92br025) (Fig. 3). The TAR region alignment showed sites of polymorphisms in the Brazilian HIV-1 B and C isolates from Porto Alegre. At least three subtype C specific mutations were identified throughout the fragment as follows: G to A substitution at the tenth position, T to G at the twelfth position and A to T substitution at position 47<sup>th</sup>. In contrast, A to G substitutions were predominant at this position for the subtype B isolates. The secondary structure of this region in both subtypes lacked some hydrogen bonds (Fig. 4).

For Peer Review

## DISCUSSION

The high polymorphism of HIV-1, especially in the structural genes, and its influence on the HIV/AIDS epidemic prompted us to characterize the molecular features of the LTR genetic region in HIV-1 Brazilian subtypes. Additionally, we analyzed the potential TFBS profiles of the LTR-5' fragments of distinct HIV-1 subtypes circulating in Brazil. Although the LTR region is not usually used for phylogenetic inferences, previous studies conducted by De Arellano et al., [2005] demonstrated the utility of this region for HIV-1 genotyping and molecular epidemiology. Despite the high variability within the LTR region, additional molecular epidemiological investigation should be conducted to further our understanding of this genetic region.

Phylogenetic analyses based on the LTR region are in agreement with previous studies that reported the predominance of subtypes C and B in Southern Brazil using the HIV *pol* gene [Soares et al., 2003; Brindeiro et al., 2003]. In spite of the limited number of samples analyzed, no subtype F LTR region was found in our study. However, additional phylogenetic studies based on the *gag* region (unpublished data) for samples BA023, BA109, BA152, BA184, BA168 and BA500 showed a surprising pattern with all sequences typed as F or BF recombinants, whereas they were typed as B in the LTR region. Indeed, at least two other studies reported B/F recombinant genetic forms from Brazil whose LTR regions were also B [Sa-Filho et al. 2006, Sanabani et al 2006]. These data suggest that subtype F LTR could be less efficient than the subtype B LTR.

Although, in general, cis-elements need conservative structures to effectively bind to their respective transcriptional factors, the most striking feature of the HIV-1 LTR region appears to be its plasticity. This could be an important constraint for HIV-1 fitness. The host environmental milieu of each cell type provides a distinct context that drives the tissue-specificity and modulates the productive virus replication. Based on a

1  
2  
3 functional assay, Verhoef and col. (1999) showed that TFBS on LTR enhancer region in  
4  
5 one viral isolate could render the switch of NF-kappaB to the GABP (GA binding  
6  
7 protein) site and improve virus transactivation.  
8  
9

10  
11 Viral genetic diversity is related to the virus ability to replicate. The maintenance of the  
12  
13 HIV-1 genetic variability is an important virus strategy to facilitate fitness and to  
14  
15 colonize new cell types and spread the infection to different tissues. The different  
16  
17 frequencies of potential TFBS determine typical subtype-specific patterns for B or C  
18  
19 subtype viruses. This could in turn be related to HIV-1 gene regulation control and,  
20  
21 consequently, to the AIDS epidemic profile in regions where these subtypes  
22  
23 predominate.  
24  
25

26  
27 The higher frequency of potential TFBS with activity in neurological cells supports the  
28  
29 hypothesis that C subtype LTR could be related to productive infection in the central  
30  
31 nervous system. This might lead to severe clinical outcomes including dementia in  
32  
33 AIDS patients. Further studies putting together clinical and molecular data will be  
34  
35 necessary to clarify this point. However, the importance of the host environment to the  
36  
37 virus fitness has been demonstrated in different cell lines (van Opijnen et al. 2007,  
38  
39 Goodenow et al. 2003, Rohr et al. 2003). The predominance and frequency of specific  
40  
41 potential TFBS with activity in neuroglia cells in subtype C are strong evidences for  
42  
43 their importance to viral fitness. However functional studies need to be carried out to  
44  
45 assess their real significance. Actually, genetic diversity in the LTR may play a minor  
46  
47 role in the function of this region. Evidence for this assertion could be observed in  
48  
49 different HIV-1 isolates and subtypes [Jeeninga et al., 2000; Verhoef et al., 1999; van  
50  
51 Opijnen et al., 2004]. The four Brazilian subtype C samples from Porto Alegre  
52  
53 contained three NF-kappaB binding sites. This common molecular feature is found in  
54  
55 the majority of C subtype described in the global epidemic. Curiously, one subtype C  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 Brazilian sample, (92BR025), does not contain the extra NF-kappaB binding site, which  
4 could imply multiple introduction events for subtype C in Brazil or a secondarily lost  
5 characteristic.  
6  
7  
8  
9

10 The role of the Sp1 triple site on HIV-1 gene activation has been well described  
11 [Millhouse et al., 1998; Yedavalli et al., 2003]. The presence of this cis-element is  
12 critical to virus viability. A recent study demonstrated the relationship between the  
13 genetic variability of these sites and the clinical features of HIV-1 infected patients  
14 [Ramírez et al., 2007]. The analysis of the Brazilian Sp1 (III, II, I) sites sequences  
15 showed the presence of a well-conserved region in at least half of the samples. The Sp1  
16 (II) and (I) sites were further conserved and a peculiar signature was identified in Sp1  
17 (III) binding site in the Brazilian subtype C samples (Fig. 3). These conserved sites  
18 might be related to the improvement of viral transactivation mechanism and linked to  
19 typical HIV progressor patients (Ramírez et al. 2007). In fact, the majority of the  
20 patients from Porto Alegre presented opportunistic diseases during clinical follow-up  
21 and some of them had already died (data not shown).  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 The sequence alignment of the TAR region of Brazilian strains showed some sites of  
39 polymorphisms similar to the non-Brazilian isolates, including at least two subtype-  
40 specific mutations related to B or C viruses (Fig. 4). The study of the RNA hairpins  
41 using the secondary structure model, showed no drastic change of their architecture.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48 However, some mutations leading to the absence of hydrogen bonds between the anti-  
49 parallel strains, suggest that a more flexible structure could modulate Tat binding.  
50  
51

52 Taken together, the results of the present paper present a systematic characterization of  
53 the LTR-5' region from Brazilian HIV-1 B and C subtypes. Some typical subtype-  
54 specific potential TFBS were identified. We have confirmed the importance of the Sp1,  
55  
56  
57  
58  
59  
60 NF-kappaB, TATA-box motifs and TAR region to virus viability. We also confirmed

1  
2  
3 the occurrence of an additional NF-kappaB site among the Brazilian subtype C isolates.  
4  
5

6 Functional studies should elucidate the role of these LTR polymorphisms.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## REFERENCES

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 Battistini A, Marsili G, Sgarbanti M, Ensoli B, Hiscott J. 2002. IRF regulation of  
8  
9 HIV-1 long terminal repeat activity. *J Interferon Cytokine Res.* 22(1):27-37.  
10  
11  
12  
13 Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1  
14  
15 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 17:657-  
16  
17 700.  
18  
19  
20  
21 Berkhout, BR, Silverman H and KT Jeang. 1989. Tat trans-activates the human  
22  
23 immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59:273-282.  
24  
25  
26  
27 Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC,  
28  
29 Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A; Brazilian Network for Drug Resistance  
30  
31 Surveillance. 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-  
32  
33 BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17(7):1063-9.  
34  
35  
36  
37 Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. 1995. Virologic and immunologic  
38  
39 characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1  
40  
41 infection. *N Engl J Med.* 332(4):201-8  
42  
43  
44  
45 Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M,  
46  
47 Bayerlein M, Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based  
48  
49 on transcription factor binding sites. *Bioinf.* 21(13): 2933-42.  
50  
51  
52  
53 De Arellano ER, Soriano V, Holguin A. 2005. Genetic analysis of regulatory,  
54  
55 promoter, and TAR regions of LTR sequences belonging to HIV type 1 Non-B  
56  
57 subtypes. *21(11):* 949-54.  
58  
59  
60

1  
2  
3 De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. 2006.  
4  
5 Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res*  
6  
7 *Hum Retroviruses* 22(1): 1-13.  
8  
9

10  
11 Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ,  
12  
13 McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A,  
14  
15 Sonza S, Learmont J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J.  
16  
17 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood  
18  
19 transfusion donor and recipients. *Sci.* 270, 988.  
20  
21

22  
23  
24 Dingwall CI, Ernberg MJ, Gait SM, Green S, Heaphy J, Karn AD, Lowe M, Singh  
25  
26 MA, Skinner R, Valerio R. 1989. Human immunodeficiency virus 1 Tat protein  
27  
28 binds trans-activating-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
29  
30 *USA* 86:6925-6929.  
31  
32

33  
34  
35 El Kharroubi A, and Martin M. 1996. cis-acting sequences located downstream of  
36  
37 the human immunodeficiency virus type 1 promoter affect its chromatin structure  
38  
39 and transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* 16(6): 2958–2966.  
40  
41

42  
43 Goodenow MM, Rose SL, Tuttle DL, Sleasman JW. 2003. HIV-1 fitness and  
44  
45 macrophages. *J Leukoc Biol.* 74(5):657-66.  
46  
47

48  
49 Hiebenthal-Millowa K, Greenoughb T, Brettlerc D, Schindlerd M, Wildumd S,  
50  
51 Sullivanb J and Kirchoff F. 2003. Alterations in HIV-1 LTR promoter activity  
52  
53 during AIDS progression. *Virol.* 317: 109-118.  
54  
55

56  
57 Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M.1995.  
58  
59 Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nat.*  
60  
373(6510):123-6.

1  
2  
3 Iversen AK, Shpaer EG, Rodrigo AG, Hirsch MS, Walker BD, Sheppard HW,  
4 Merigan TC, Mullins JJ. 1995. Persistence of attenuated rev genes in a human  
5 immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic individual. *Viol.* 69, 5743.  
6  
7

8  
9  
10  
11 Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. 1998. Multiple  
12 sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23: 403–405.  
13  
14

15  
16  
17 Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, Berkhout  
18 B. 2000. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional  
19 promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J. Virol.*  
20 74:3740–3751.  
21  
22  
23  
24  
25

26  
27  
28 Kingsman SM and Kingsman AJ. 1996. The regulation of human immunodeficiency  
29 virus type 1 gene expression. *Eur. J. Biochem.* 240:491-507.  
30  
31

32  
33  
34 Krebs FC, Hogan TH, Quiterio S, Gartner S, Wigdahl B, Kuiken C, Foley B, Hahn  
35 B, Marx P, McCutchan F. 2001. *HIV sequence compendium 2001*. Los Alamos  
36 (New Mexico): Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National  
37 Laboratory. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease  
38 pathogenesis; pp. 29–70.  
39  
40  
41  
42  
43

44  
45  
46 Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, Weaver JG, Gomez TS, Yao X.J, Lynch D, Pilon AA,  
47 Hawley N, Kim JE, Chen Z, Montpetit M, Sanchez-Dardon J, Cohen EA, Badley  
48 AD. 2003. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection  
49 and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.* 145, 1547.  
50  
51  
52

53  
54  
55  
56 Michael NL, Chang G, d'Arcy LA, Ehrenberg PK, Mariani R, Busch MP, Birx DL,  
57 Schwartz DH, 1995. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus  
58 type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J. Virol.* 69, 4228.  
59  
60

1  
2  
3 Millhouse S, Krebs FC, Yao J, McAllister JJ, Conner J, Ross H, Wigdahl B. 1998.  
4  
5 Sp1 and related factors fail to interact with the NF-kappaB-proximal G/C box in the  
6  
7 LTR of a replication competent, brain-derived strain of HIV-1 (YU-2). J.  
8  
9 Neurovirol. 4:312–323.  
10  
11

12  
13  
14 Pereira L, Bentley K, Peeters A, Churchill M, and Deacon N. 2000. SURVEY AND  
15  
16 SUMMARY A compilation of cellular transcription factor interactions with the  
17  
18 HIV-1 LTR promoter. Nucleic Acids Res. 28(3): 663–668.  
19  
20

21  
22 Pomerantz, RJ, Feinberg MB, Trono D, Baltimore D. 1990. Lipopolysaccharide is a  
23  
24 potent monocyte/macrophage-specific stimulator of human immunodeficiency virus  
25  
26 type 1 expression. J. Exp. Med. 172:253.  
27  
28

29  
30 Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. Sci.  
31  
32 242(4882):1168-71.  
33  
34

35  
36 Ramírez EA, Martín C, Soriano V, Alcamí J, Holguin A. 2007. Genetic analysis of  
37  
38 the long terminal repeat (LTR) promoter region in HIV-1-infected individuals with  
39  
40 different rates of disease progression. Virus Genes 34:111–116.  
41  
42

43  
44 Ranjbar S, Tsytsykova AV, Lee S-K, Rajsbaum R, Falvo JV, Shankar JLP, Goldfeld  
45  
46 AE. 2006. NFAT5 Regulates HIV-1 in Primary Monocytes via a Highly Conserved  
47  
48 Long Terminal Repeat Site. PLoS Pathogens (12):1176-1186.  
49  
50

51  
52 Rohr O, Marban C, Aunis D, Schaeffer E. 2003. Regulation of HIV-1 gene  
53  
54 transcription: from lymphocytes to microglial cells. J Leukoc Biol. 74(5):736-742.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Sanabani S, Neto WK, de Sa Filho DJ, Diaz RS, Munerato P, Janini LM, Sabino  
4 EC. Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype  
5 C in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006 (2):171-6.  
6  
7

8  
9  
10  
11 Siebenlist U, Franzoso G and Brown K. 1994. Structure, regulation and function of  
12 NF- $\kappa$ B. *Annu. Rev. Cell Biol*. 10:405-455.  
13  
14

15  
16  
17 Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, Pires IL,  
18 Morgado MG, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Cassol S, Tanuri A; Brazilian  
19 Network for Drug Resistance Surveillance. 2003. A specific subtype C of human  
20 immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *17(1):11-21*.  
21  
22  
23

24  
25  
26  
27 Thanos D and Maniatis T. 1995. NF- $\kappa$ B: a lesson in family values. *Cell* 80:529-532.  
28  
29

30  
31 Van Lint C, Amella CA, Emiliani S, John M, Jie T, Verdin E. 1997. Transcription  
32 factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1  
33 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol*. 71(8):6113-27.  
34  
35  
36

37  
38  
39 van Opijnen T, de Ronde A, Boerlijst MC, Berkhout B. 2007. Adaptation of HIV-1  
40 Depends on the Host-Cell Environment. *PLoS ONE*. 7;2:e271  
41  
42

43  
44  
45 Van Opijnen T, Kamoschinski J, Jeeninga RE, Berkhout B. 2004. The human  
46 immunodeficiency virus type 1 promoter contains a CATA box instead of a TATA  
47 box for optimal transcription and replication. *J Virol*. 78(13):6883-90.  
48  
49  
50

51  
52  
53 Varas F, Medrano L, Ballester S, Nájera R. 1991. Influence of PCR parameters on  
54 amplifications of HIV-1 DNA: establishment of limiting sensitivity. *Biotec*.  
55 11(3):384-6, 388-91.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Verhoef K, Sanders RW, Fontaine V, Kitajima S, Berkhout B. 1999. Evolution of  
4 the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat promoter by  
5 conversion of an NF-kappaB enhancer element into a GABP binding site. *J Virol.*  
6  
7  
8  
9  
10 73(2):1331-40.  
11

12  
13  
14 Vicenzi, E. & Poli. G. 1994. Regulation of HIV expression by viral genes and  
15 cytokines. *J. Leukocyte Biol.* 56:328.  
16  
17

18  
19  
20 Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD,  
21 Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. 1995. Viral dynamics in human  
22 immunodeficiency virus type 1 infection. *Nat.* 373(6510):117-22.  
23  
24  
25  
26

27  
28 Yedavalli VS, Benkirane M, Jeang KT. 2003. Tat and trans-activation- responsive  
29 (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and  
30 murine cyclin T1 requires Sp1. *J. Biol. Chem.* 278:6404–6410.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Luciano Zulbaran Goldane for the selection of samples from Porto Alegre and David Watkins, Visiting Professor (CAPES-FIOCRUZ) for revising this manuscript. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), the Brazilian Ministry of Health STD/AIDS Program, CNPq and FIOCRUZ.

For Peer Review

## Figures and Legends

Figure 1- Rooted neighbor-joining tree of the LTR region (450bp) of Brazilian HIV-1 samples. HIV-1 subtype reference samples were obtained from the GenBank/EMBL databases. The bootstrap values >70% were considered as significant. Newly sequenced LTR of Brazilian HIV-1 isolates included in this analysis are in bold.

Figure 2- Potential TFBS with activity in neuroglia and non-neuroglia cells identified in the LTR-5' region of subtype B and C HIV-1 isolates. The cis-elements were identified by MatInspector bioinformatics tool. The TF binding is shown in percent value for each HIV-1 subtype.

Figure 3- Alignment of NF-kappaB and Sp1 (I, II, III) binding site regions. On squares, the canonical double NF-kappaB binding site, the additional one and the Sp1 tandem sequences are showed with respect to subtype B, C and F isolates. The HXB2 reference strain was selected as a parameter of comparison.

Figure 4- Schematic representation of some models of secondary structure of hairpin RNA of Brazilian isolates. White and green arrows indicate respectively the most common mutations and the resultant absence of hydrogen bonds.

Figure 1

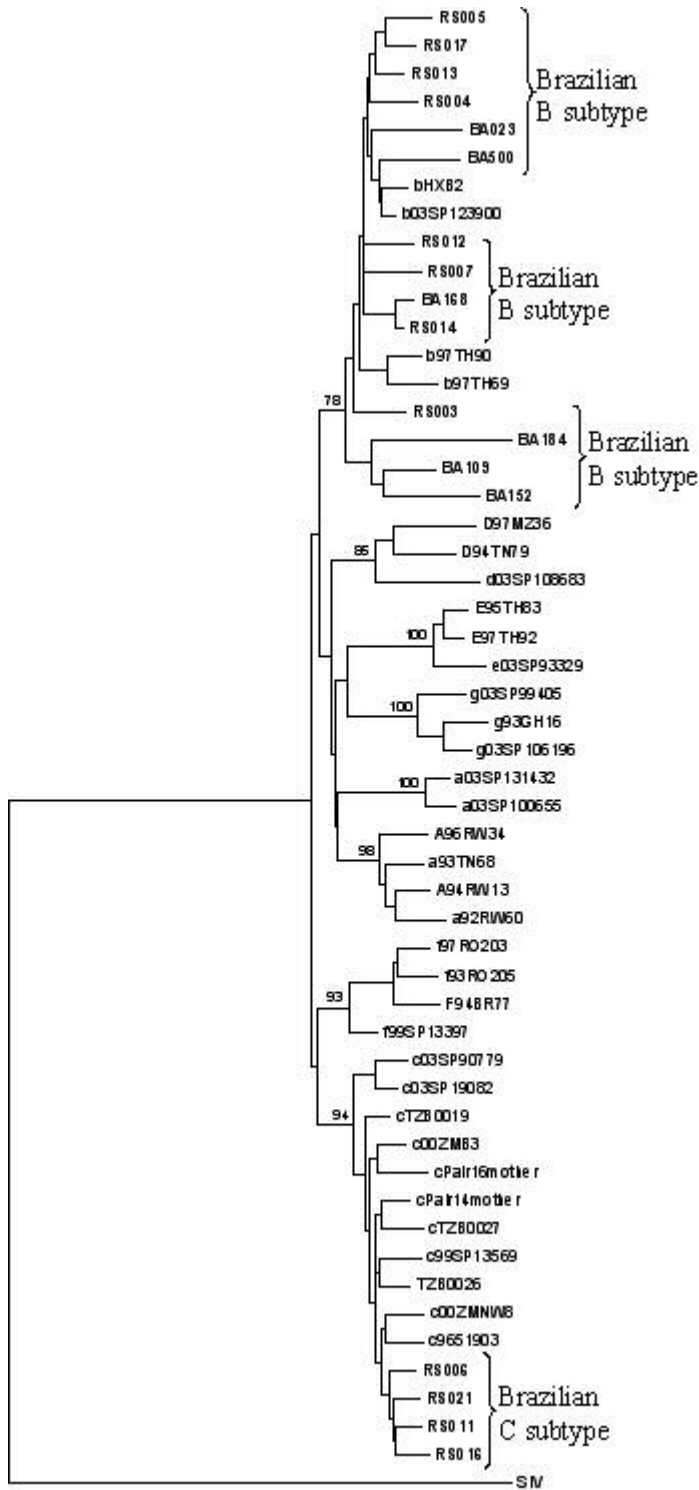


Figure 2

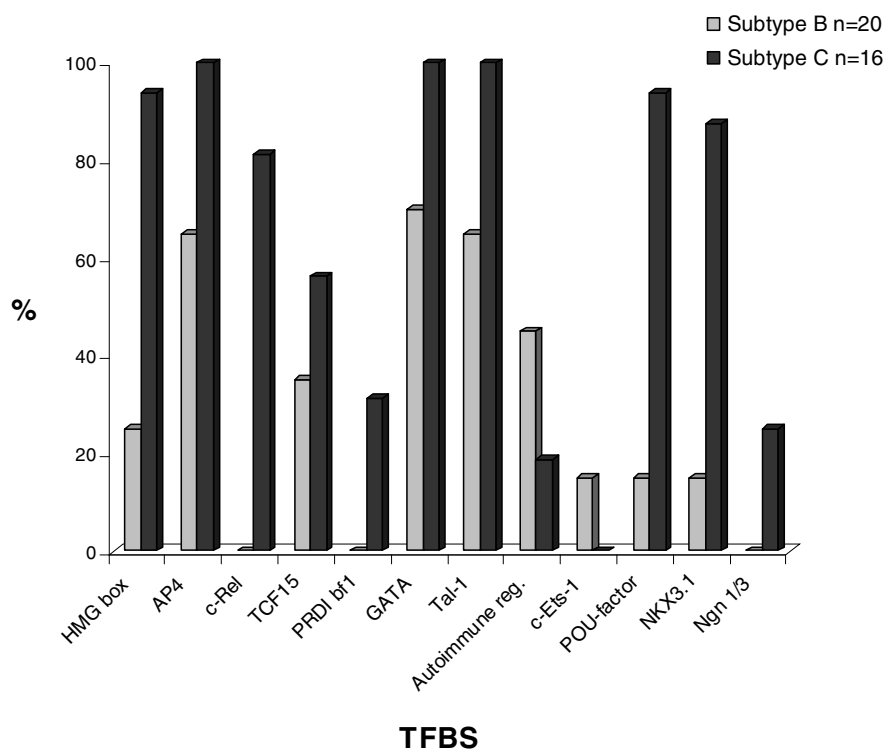
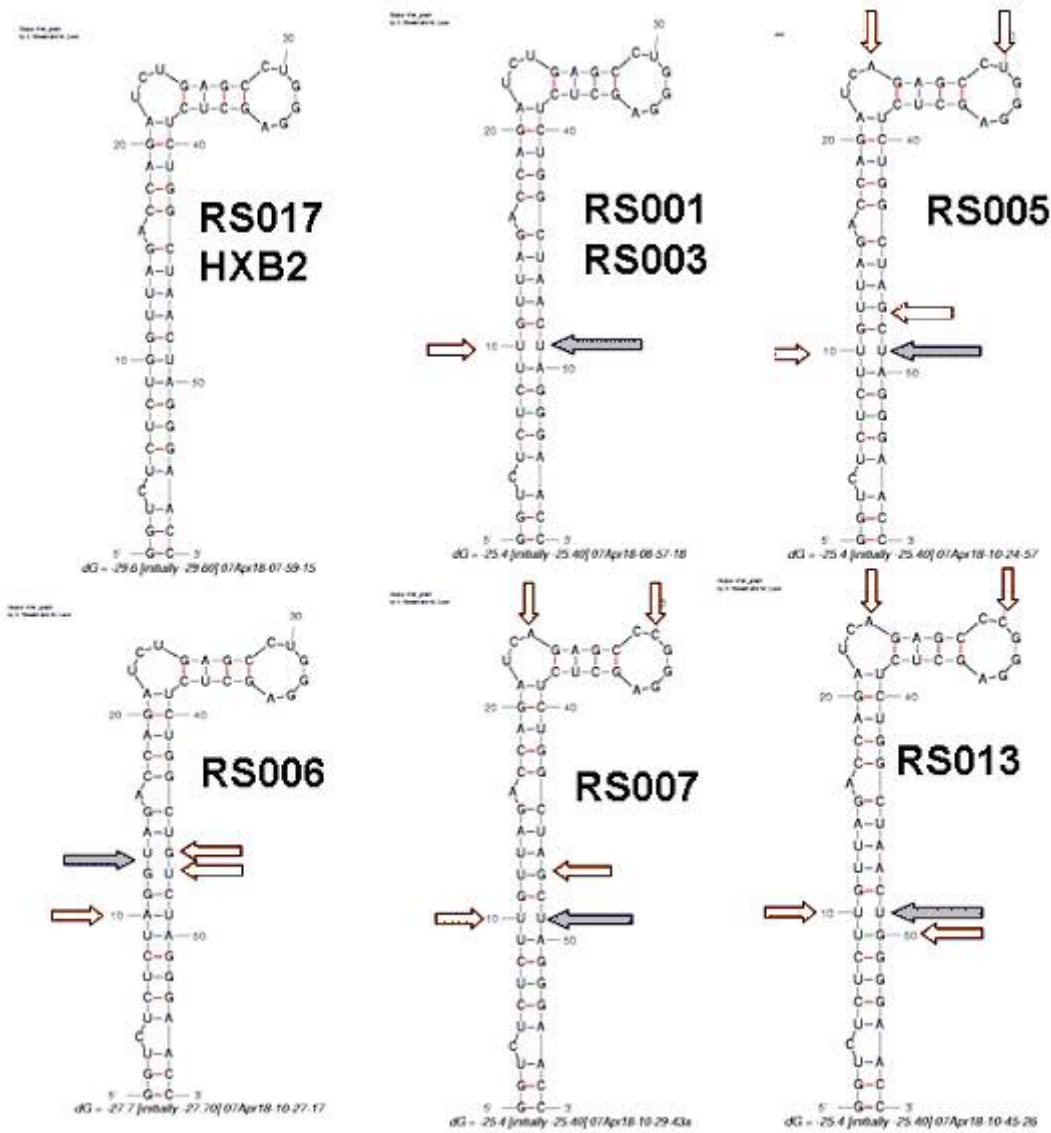


Figure 3

	Additional NFκ-B Binding site	NFκ-B Binding site	NFκ-B Binding site	Spl (III)	Spl (II)	Spl (I)	
<b>bHXB2</b>	-TCGAGCTTGCTACAA	GGGACTTTCC	GCTGGGACTTTCC	AGGGA	GGC-GTGGCC	TGGGCGGGAC	TGGGGAGTGG
<b>bBA109</b>	A.....T.....		.G.....				
<b>bBA152</b>	A----A...T.....				.GA.....		
<b>bBA184</b>	A.....T.....						-
<b>bBA147</b>	AA....T..T.....				GA.GC.G.AA.G.....	A.....	
<b>bBA500</b>	A----.A..T.....			A..A.GC...A.A.....	A.....		
<b>bRS004</b>	---.G.T..T.....				A.GT.....		GT.....
<b>bRS012</b>	A----...T.....				A.GT.....	G.....T..C.....	
<b>bRS007</b>	A----...T.....				A.GT.....		A.....
<b>bRS013</b>	T----G..T.....				GA.GT.....		
<b>bRS005</b>	A----GA..T.....		A.....		GA.GT.....		
<b>bRS017</b>	A----.T..T.....				A.GT.....	G.....	A.....
<b>bRS003</b>	A----.A..T.....				GA.GT.....		C.....
<b>bBA023</b>	A----G..T.....		.G...A.....		GA.GT.....		
<b>bRS014</b>	A----...T.....				A.GC.....		
<b>bBA168</b>	A----...T.....				A.GC.....		
<b>bRS018</b>	A.....T.....			G...A.GT.....			
<b>c03SP90779</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G.G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>c03SP19082</b>	AGG.GA...T.CG..T		A.....G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>c99SP13569</b>	AA.G.GA...T.CG..T		T.....G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>ctZB0026</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G...T...A		A.GA.G..T.....	A.....	
<b>cRS006</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>c00ZMW8</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G.....		GT...T.....		-
<b>c9651903</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G.....		A.GA...T.....		AA.....
<b>cPair14mot</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G.....		A.GA...T.....		
<b>cRS011</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>cRS016</b>	AGGACA...T.CG..TT		A.....G.....		A.GA...T.....		AA.....
<b>cRS021</b>	AA.G.GAG...T.CG..T		A.....G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>ctZB0019</b>	AA.G.GA...T.CG..G		A.....G..A.G		A.GT...T.....		-
<b>ctZB0027</b>	AA.G.GA...T.CG..T		A.....G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>c92br025</b>	AA.GACTGC..AC..G		A.....G.....		A.GA...T.....		C.....
<b>f93br029</b>	A----.T..T.....				A.GT.....		C.....
<b>f93br019</b>	A----.T..T.....				A.GT.....		
<b>f93br020</b>	AA...AGAAT...-		A.....	A.G	G.GCCAGA		
<b>f94BR77</b>	AA...AGAAT...-		.....G.....	A.G	G..CCAGA		

view

Figure 4



NEW

**8 MANUSCRITO III: HIV-1 SEROPREVALENCE IN THE GENERAL POPULATION OF SALVADOR, BAHIA STATE, NORTHEAST BRAZIL.**

**ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO DURANTE O DOUTORADO:  
CADERNOS DE SAÚDE PÚBLICA.**

**HIV-1 SEROPREVALENCE IN THE GENERAL POPULATION OF SALVADOR,  
BAHIA STATE, NORTHEAST BRAZIL.  
INÊS DOURADO, CRAIG A. MILROY, MARCO ANTÔNIO GOMES MELLO,  
GERALDO A FERRARO, HUMBERTO CASTRO-LIMA FILHO, MONICK  
LINDENMEYER GUIMARÃES, MARIZA GONÇALVES MORGADO, MARIA  
GLORIA TEIXEIRA, MAURÍCIO L. BARRETO, BERNARDO GALVÃO-CASTRO.**

## HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil

Seroprevalência do HIV-1 na população geral de Salvador, Bahia, Brasil

Inês Dourado <sup>1</sup>  
 Craig A. Milroy <sup>1</sup>  
 Marco Antônio Gomes Mello <sup>2,3</sup>  
 Geraldo Argolo Ferraro <sup>2,3</sup>  
 Humberto Castro-Lima Filho <sup>2,3</sup>  
 Monick Lindenmeyer Guimarães <sup>4</sup>  
 Mariza Gonçalves Morgado <sup>4</sup>  
 Maria Gloria Teixeira <sup>1</sup>  
 Maurício L. Barreto <sup>1</sup>  
 Bernardo Galvão-Castro <sup>2,3</sup>

### Abstract

*To estimate HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia, Brazil, we conducted a cross-sectional survey of 3,437 residents from 1998 to 2000. Subjects were drawn from 30 sentinel areas representing a wide range of living conditions. Plasma samples were screened for HIV-1 antibodies by ELISA and confirmed by immunofluorescent assay. Subtype determination by HMA was performed after proviral DNA amplification. Phylogenetic analysis using parsimony was performed with the neighbor-joining method. Overall HIV-1 seroprevalence was 0.55% (19/3,446): 0.8% for men and 0.36% for women. Seroprevalence was higher in the 31-45-year age group (1%) and among persons with family income less than twice the minimum wage (0.78%) as compared to 0.33% for the higher income group. Syphilis was detected in 37% of HIV seropositive individuals. Phylogenetic inferences identified 10 samples as subtype B in the env region and 2 samples with Benv/Fgag/Fpol and Fenv/Bgag. Age  $\geq$  30 years, male gender, and income  $\leq$  2 times the minimum wage were identified as risk factors for HIV-1 infection. Extrapolating the proportion of seropositive individuals to Salvador, the number of HIV-1 infected individuals was estimated at 13,750.*

*HIV-1; HIV Seroprevalence; Cross-sectional Studies*

### Introduction

The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and human immunodeficiency virus (HIV) were described and isolated, respectively, in 1981 and 1983 <sup>1,2</sup>. In Brazil, the first AIDS case was retrospectively identified in 1980 in the city of São Paulo, in the Southeast region of the country. Since then, AIDS incidence has increased in all 27 Brazilian States, but AIDS cases are still concentrated mainly in the Southeast. In 2003, AIDS incidence was 18.2 cases per 100,000 inhabitants <sup>3</sup>. Brazil is now one of the most heavily affected Latin American countries, with an estimated 600 thousand people living with HIV/AIDS. The HIV epidemic in Brazil has followed global trends: transmission was initially concentrated in men who have sex with men, then spread to injection drug users (IDU) in a second phase, and is currently marked by increasing spread among heterosexuals, who constituted the majority (57%) of all sexually transmitted AIDS cases reported in 2003. Transmission is also increasing among the impoverished and illiterate segments of society, and is spreading from large urban areas to smaller cities (< 50,000 inhabitants) <sup>4,5,6</sup>. An estimated 16,410 pregnant women (0.429%) aged 15-34 years are infected with HIV <sup>7</sup>.

Salvador, capital of Bahia State (Northeast Brazil), has approximately 2.5 million inhabitants, the majority black or mixed-race (80%). Although AIDS incidence in Bahia is lower than

<sup>1</sup> Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brasil.

<sup>3</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Brasil.

<sup>4</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

#### Correspondence

I. Dourado  
 Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia.  
 Rua Basílio da Gama s/n,  
 Campus do Canela, Salvador,  
 BA 40110-040, Brasil.  
 maines@ufba.br



in the Southeast, the epidemic is an important public health problem in the Northeast. Since the ethnic and socio-demographic characteristics of Salvador are similar to those of large African or Haitian cities, HIV was initially expected to spread mainly through heterosexual contact, but the trend in the epidemiological profile has been similar to that observed in Southeast Brazil<sup>8</sup>.

Although HIV-1 subtypes B, E, A, C, and recombinant B/F and B/C viruses have been identified in Brazil<sup>9</sup>, only subtypes B and F have been described in Salvador<sup>10</sup>. Thus far, HIV prevalence has been estimated through surveys in specific population groups. This study reports the HIV-1 prevalence in a general population sample from Salvador and its association with various socio-demographic variables and describes the HIV subtypes circulating in the city.

## Methods

This research is part of a larger ongoing project to estimate the incidence and prevalence of serological markers of main infectious agents among residents of certain intra-urban spaces called "sentinel areas" in the city of Salvador, Bahia, Northeast Brazil<sup>11</sup>. The strategy was adopted in Salvador to evaluate the population's health vis-à-vis key infectious agents<sup>1</sup>.

The sampling method has been described in detail elsewhere<sup>11</sup>. In short, the study population was drawn from a spatial sample of 30 sentinel areas representing a wide range of living conditions. Each sentinel area, in turn, consisted of two or more adjacent census tracts with similar income levels and basic sanitation coverage. A census in the selected sentinel areas identified an estimated 68,749 residents; 3,446 of whom were surveyed according to a simple random sampling procedure without replacement<sup>12</sup>. Data on income, sanitation, and population density were provided by the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)<sup>13</sup> and data on area of residence, gender, age, income, and schooling were collected from May 1998 to July 2000 by questionnaire.

Other important HIV risk factors were not assessed because the main project addressed environmental and demographic factors relevant to infectious agents in general. After obtaining signed consent, 10ml of blood were obtained from each individual, using ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant. For children, blood was collected after signed consent from the mother or guardian, using appropriate equipment for the child's age. Plasma was separated by centrifugation, and both plasma

and blood cells were stored at -20°C. Samples were anonymized prior to laboratory analysis. HIV prevalence was estimated retrospectively, anonymously, and unlinked. Therefore, it was not possible to collect other important risk factors. The research protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz.

## Laboratory methods

### • Serology

Plasma was screened for HIV antibodies by ELISA (Ortho Diagnostics EIA, Rochester, USA) and confirmed by indirect immunofluorescence (Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil), following the manufacturer's recommendations. *Treponema pallidum* infection was tested by reactivity to nontreponemal cardiolipin using the Venereal Disease Research Laboratory test (Laborclin, Paraná, Brazil) and confirmed by indirect immunofluorescence (FTA, Hoechst/Behring, Germany). Hepatitis C virus antibodies, hepatitis B core antibodies, and hepatitis B surface antigens were detected by ELISA (Roche, Basel, Switzerland).

### • Molecular studies

After DNA extraction and PCR amplification, *env* and *gag* genes were evaluated by heteroduplex mobility assay to determine HIV-1 subtype<sup>14</sup>. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used to identify B and B' HIV-1 subtypes<sup>15</sup>. PCR amplification of *env* and *pol* regions was performed as previously described<sup>16,17</sup>, and the products were direct-sequenced by an automated fluorescent method (ABI DNA Sequencer 310 or 3100). The DNASTAR package was used to edit the sequences, and the alignment of the edited sequences and reference HIV-1 subtypes from the Los Alamos database was obtained by Clustal X<sup>18</sup>. Phylogenetic inferences were based on PAUP4 (neighbor-joining method), and the Kimura two-parameter algorithm was implemented for the estimation of evolutionary distances. The HIV-1 envelope sequences described in this study were assigned GenBank accession numbers (AY928535-AY928548).

## Data analysis

Univariate associations were explored with 2x2 tables, and odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) were used to measure the association between selected variables and HIV-1 infection<sup>19</sup>. Cutoff points were determined by

examining the frequency distribution of each variable. Although four different age strata were initially defined to evaluate age-based prevalence trends, the best single cutoff point was found to be 30 years. The other variables evaluated were: education (< 4 years of schooling); family income ( $\leq 2.0$  times the monthly Brazilian minimum wage, or approximately US\$100 per month at the time of our survey), and gender (male). For preschoolers, we applied the mother's educational level. Multiple logistic regression was subsequently used to compute adjusted odds ratios, and Pearson's goodness-of-fit test and associated  $\chi^2$ , along with profile analysis and both Pearson and deviance residuals, were used to check model specification. The cluster effect of the sample procedure was adjusted in the logistic regression model. Statistical analyses were performed with Epi Info version 6.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) and Stata version 7.0 (Stata Corporation, College Station, USA).

## Results

The study population consisted of 1,491 men (43%) and 1,946 women (56%), ranging from less than 1 to 99 years of age. Overall HIV-1 prevalence was 0.55% (19/3,446; 95%CI: 0.34-0.88). Sixty-three percent of the seropositive individuals were men, and the majority (68%) earned twice the minimum wage or less, including five of the six women with income data (Table 1). No one younger than 9 years and no woman younger than 17 years or older than 50 years was infected. We determined subtypes for 15 of the 19 HIV-1 positive samples: 11 in the *env* region, 8 in *gag*, and 6 in *pol*. Seven samples were subtyped in both the *env* and *gag* regions; 5 of them were subtype B in both regions and 2 presented discordant subtypes (*Benv/Fgag/Fpol* and *Fenv/Bgag*) (Table 1). No sample presented the typical "Brazilian B" pattern in the gp120 V3 loop. Syphilis seroreactivity was positive in 7 of the 19 HIV seropositive subjects (37%). None of the participants was positive for hepatitis antibodies or surface antigens.

Table 1

Socioeconomic and laboratory profiles of the 19 HIV-positive individuals. Salvador, Bahia, Brazil, 1998-2000.

Gender	Age	Monthly income (times the minimum wage)	Schooling (years)	Subtype			Syphilis
				<i>env</i>	<i>gag</i>	<i>pol</i>	
Female	17	$\leq 2$	< 4	**	**	**	Negative
	20	> 2	$\geq 4$	B	B	B	Negative
	30		$\geq 4$	nd	nd	nd	Negative
	33	$\leq 2$	< 4	B	B	**	Negative
	40	$\leq 2$	< 4	nd	nd	nd	Positive
	43	$\leq 2$	< 4	**	**	B	Positive
	45	$\leq 2$	$\geq 4$	B	**	**	Negative
Male	9	$\leq 2$	< 4	nd	nd	nd	Negative
	19	> 2	< 4	nd	nd	nd	Negative
	27	> 2	$\geq 4$	F	B	**	Negative
	29	$\leq 2$	< 4	B	F	F	Negative
	30	$\leq 2$	< 4	B	**	**	Positive
	30	$\leq 2$	$\geq 4$	B	B	B	Positive
	41	$\leq 2$	< 4	B	**	**	Negative
	43	$\leq 2$	< 4	**	**	**	Negative
	45	> 2	$\geq 4$	B	B	B	Positive
	45	> 2	$\geq 4$	**	B	**	Positive
	54	$\leq 2$	$\geq 4$	B	**	**	Negative
	68	$\leq 2$	$\geq 4$	B	B	B	Positive

nd = not done (insufficient sample volume for conducting PCR).

\* One monthly minimum wage at the time of our survey = US\$ 50.00 (approx.).

\*\* Negative (PCR result was negative).

In the univariate analyses, the highest prevalence rates were in the 30-50-year age bracket, lower-income individuals, and men (Table 2). Prevalence rates in the 16-30 and 31-50-year brackets were 6 and 8 times higher, respectively, than in the 0-15-year group. However, the 95% confidence intervals were wide and imprecise. Although prevalence in men (0.81%) was nearly twice that of women (0.36%), the small number of seropositive individuals was insufficient to assess correlation with gender. Infection rates were higher in men of all age groups, increasing from 0.23% to 1.11% up to 51 years old, reaching 1.23% for men over 51 (Figure 1). In contrast, infection rates in women peaked in the 31-50-year group and fell to 0% in the group over 51. Prevalence was similar for both levels of education (Table 2).

Odds ratios for the association between HIV infection and age, gender, and income increased and became more significant when adjusted by multiple logistic regression (Table 3). The multivariate model accounted for a small portion of the overall variance (adjusted pseudo-R<sup>2</sup> = 0.07), but was well-specified (Pearson's  $\chi^2$  = 14.3,  $p$  < 0.22).

## Discussion

This is the first study in Latin America to estimate HIV seroprevalence and characterize HIV subtypes in the general population. We estimated an overall HIV-1 prevalence of 0.55% in our large representative sample of individuals of all ages (6 months to 99 years) from thirty sentinel surveillance areas in Salvador. This profile corresponds to the World Bank criteria<sup>20</sup> for a "low level" epidemic. However, previous identification of prevalence higher than 5% in specific high-risk groups (IDU)<sup>21</sup> suggests that the epidemic should be classified as "concentrated".

The lack of urban cohesiveness and tendency towards unstructured urban growth in many Latin American cities precludes surveillance by traditional means. As a result, several studies in Latin America have monitored health problems in urban "sentinel areas" created and selected according to predefined criteria. This strategy was adopted in Salvador to facilitate the evaluation of population health interventions<sup>11,22</sup>. Results from these studies have demonstrated the strategy's great potential and timeliness, facilitated epidemiological surveillance in the city, enhanced the analysis of public health issues, and stimulated the development of special epidemiological studies.

The estimated prevalence in our general population sample for the 15-49 years age-group

Table 2

Univariate analysis of factors related to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. Salvador, Bahia, Brazil, 1998-2000.

Variable	N	Positive (%)	95%CI	OR	95%CI	p value
Age (years)						
< 1-15	866	0.12	0.006-0.75	1.00		
16-30	1,193	0.67	0.31-1.37	5.98	0.75-129.92	0.051
31-50	927	0.87	0.40-1.77	7.71	0.97-167.56	0.022
≥ 51	439	0.46	0.08-1.83	4.05	0.28-115.11	0.256
Gender						
Female	1,946	0.36	0.16-0.78	1.00		
Male	1,491	0.81	0.44-1.44	2.25	0.81-6.75	0.066
Schooling (years)						
≥ 4	1,530	0.59	0.29-1.16	1.00		
< 4	1,892	0.53	0.27-1.00	0.90	0.33-2.50	0.496
Family income (times minimum wage) *						
> 2.0	1,530	0.33	0.12-0.81	1.00		
≤ 2.0	1,659	0.78	0.44-1.37	2.41	0.80-8.65	0.067

\* Monthly minimum wage at the time of our survey = US\$ 50.00 (approx.).

Figure 1

Seroprevalence of HIV-1 infection (by gender), Salvador, Bahia, Brazil, 1998-2000.

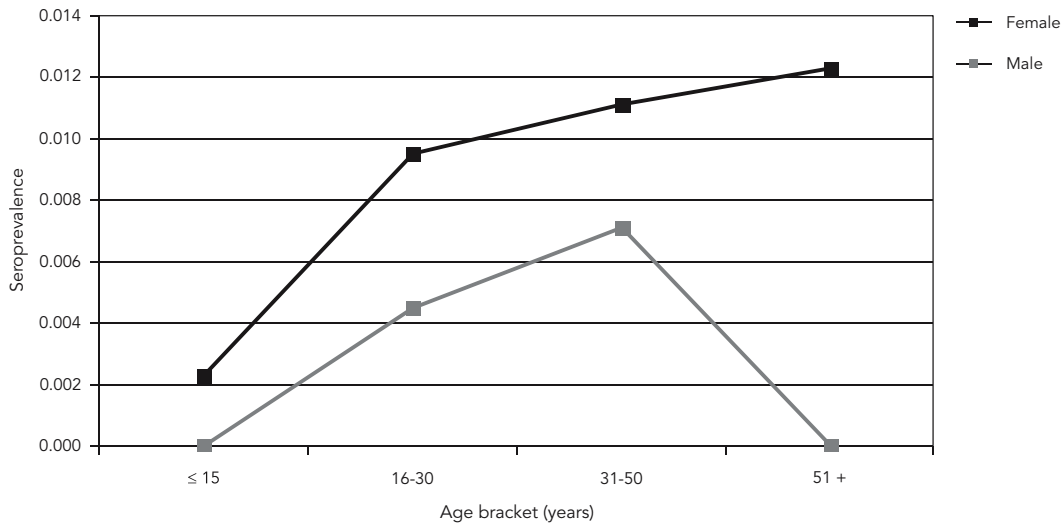


Table 3

Multiple logistic regression analysis of risk factors for human immunodeficiency virus type (HIV-1) infection. Salvador, Bahia, Brazil, 1998-2000.

Variables	OR	95%CI	95%CI *
Age ( $\geq 30$ years)	3.27	1.21-8.81	1.27-8.38
Gender (male)	2.90	1.08-7.81	1.01-8.35
Family income ( $\leq 2.0$ minimum wage) **	2.60	0.92-7.36	0.82-8.18

\* Confidence interval adjusting for the cluster effect of the sample scheme Pearson's chi-square for model goodness-of-fit:  $\chi^2 = 12.83$ ;  $p = 0.005$ ; log likelihood = -104.55; pseudo adjusted  $R^2 = 0.058$ .

\*\* Monthly minimum wage at the time of our survey = US\$ 50.00 (approx.).

(0.8%) was 3.3 times greater than in the same age range in three cross-sectional samples from prenatal clinic attendees in Northeast Brazil in 1998 (0.24% overall; 0.33% for men and 0.15% for women) <sup>7</sup>. However, direct comparisons cannot be made, since the regional estimate represents a weighted average of infection rates for each State in the region, which vary considerably by State. In addition, studies have identified potential biases in inferring general population HIV prevalence from samples of prenatal clinic users <sup>23</sup>, since access to such clinics can vary ac-

ording to several factors likely to be associated with HIV infection, such as age, socioeconomic status, education, parity, and others <sup>24</sup>. Several studies in Africa comparing HIV prevalence rates in prenatal clinics and the general population have shown a tendency for prenatal clinic surveillance samples to underestimate infection rates <sup>25,26</sup>. However, a nine-year study in Tanzania showed similar prevalence in the two samples (prenatal clinic and general population) <sup>27</sup>.

The observed increase in prevalence with age was more marked in men than in women,

probably a combined result of the age effect and the greater risk of infection among men. Another possible explanation would be a combination of a period, cohort, and age effect. Indeed, the higher proportion of infection among older groups might also reflect past infection during times of greater risk (cohort effect) <sup>28</sup>.

At the beginning of the AIDS epidemic in Brazil, most cases had more education. However, since 1995, national AIDS surveillance has identified a tendency towards increased incidence in poorer, less-educated groups, a phenomenon known in Brazil as "pauperization" of the epidemic <sup>4,5,29</sup>. Our study showed higher HIV prevalence among individuals with lower income, in agreement with this recent profile of the AIDS epidemic in the country.

The multiple logistic regression model appeared to be well-specified; however, the low pseudo-R<sup>2</sup> suggests that other known risk factors for HIV-1 infection which were not measured here (e.g. number of sexual partners, history of injecting drug use etc.) could also be important risk factors in this population.

We can speculate that the majority of HIV-positive individuals were infected via sexual

transmission because syphilis seroreactivity was positive in 37%, and because there is evidence of the decreased role of IDU and blood transmission in Brazil, especially among men <sup>3</sup>.

Molecular analysis of the HIV-1 samples isolated in our population indicated that the predominant subtype circulating in Salvador is still B (although recombinant B and F strains were also identified), and that the molecular profile identified here is consistent with previous subtype assessments in Salvador <sup>9,10</sup>.

Extrapolation of our data to the entire city of Salvador would yield an estimated total of approximately 13,750 individuals [i.e. (19/3,446)\*2,500,000] infected with HIV-1. However, this calculation should be viewed with caution, since the sentinel areas represent an approximation of the city of Salvador.

Finally, since Bahia State has the second highest AIDS incidence in Northeast Brazil, it is crucial to continue to monitor the molecular and demographic profile/evolution of the epidemic in order to design, evaluate, and maintain appropriate control measures.

## Resumo

*A seroprevalência do HIV-1 na população geral de Salvador, Bahia, Brasil, foi estimada em estudo de corte transversal com 3.437 indivíduos entre 1998-2000, residentes de 30 áreas sentinelas com ampla variedade de condições de vida. Realizou-se uma triagem para anticorpos anti-HIV-1 por ELISA e confirmados por imunofluorescência. A determinação do subtipo foi realizada por HMA, após amplificação do DNA proviral. As análises filogenéticas foram realizadas com PAUP utilizando os algoritmos neighbor-joining. A seroprevalência do HIV-1 foi de 0,55% (19/3.446): 0,8% para os homens e 0,36% para as mulheres. A seroprevalência foi mais alta no grupo de 31-45 anos (1%) e entre as pessoas com renda familiar inferior a dois salários mínimos (0,78%). A sífilis foi diagnosticada em 37% dos participantes HIV soropositivos. A análise filogenética identificou 10 amostras como subtipo B na região env, e duas amostras Benv/Fgag/Fpol e Fenv/Bgag. Idade ≥ 30 anos, sexo masculino, renda ≤ 2 salários mínimos se comportaram como fatores de riscos para a infecção por HIV-1. Se extrapolarmos a proporção de soropositivos para Salvador, o número de infectados pelo HIV seria 13.750.*

*HIV-1; Soroprevalência de HIV; Estudos Transversais*

## Contributors

I. Dourado and B. Galvão-Castro provided the original idea for the article. M. G. Teixeira and M. L. Barreto were responsible for the study design and data collection. M. A. G. Mello, G. A. Ferraro, M. L. Guimarães, and M. G. Morgado conducted the laboratory tests. C. A. Milroy and H. Castro-Lima Filho contributed with the statistical analyses. All the authors participated in writing and reviewing the article.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Noilson Lázaro de Souza Gonçalves for his technical assistance. The research was partially supported by the National AIDS Program/Brazilian Ministry of Health, Bahia State Research Foundation, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

1. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981; 30:250-2.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-71.
3. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDST 2004; Ano I, n. 1.
4. Fonseca MGP, Szwarcwald CL, Bastos FI. Análise sociodemográfica da epidemia de Aids no Brasil, 1989-1997. *Rev Saúde Pública* 2002; 36:678-85.
5. Fonseca MGP, Travassos C, Bastos FI, Silva NV, Szwarcwald CL. Distribuição social da AIDS no Brasil, segundo participação no mercado de trabalho, ocupação e *status* sócio-econômico dos casos de 1987-1998. *Cad Saúde Pública* 2003; 19:1351-63.
6. Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MAP, Andrade CLT. A disseminação da epidemia de AIDS no Brasil, no período de 1987-1996: uma análise espacial. *Cad Saúde Pública* 2000; 16 Suppl 1:7-19.
7. Szwarcwald CL, Castilho EA. Estimativa do número de pessoas de 15 a 49 anos infectadas pelo HIV, Brasil, 1998. *Cad Saúde Pública* 2000; 16 Suppl 1:135-41.
8. Ivo-dos-Santos J, Couto-Fernandez JC, Santana AJ, Luna TM, Cunha GC, Moreira L, et al. Prevalence of HIV-1 antibodies in selected groups of a Brazilian city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4:448-9.
9. Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:143-50.
10. Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, et al. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 22:288-93.
11. Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Strina A, Martins Jr. D, Prado M. Sentinel areas: a monitoring strategy in public health. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:1189-95.
12. Cochran WG. *Sampling techniques*. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: John Wiley & Sons; 1977.
13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Contagem da população – 1996*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 1997.
14. Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, van der Auwera G, et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J Virol* 2000; 74:363-70.
15. Morgado MG, Guimarães ML, Neves Jr. I, Veloso-dos-Santos VG, Linhares-de-Carvalho MI, Castello-Branco LR, et al. Molecular epidemiology of HIV in Brazil: polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:383-6.
16. Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves Jr. I, Veloso-dos-Santos VG, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18:488-94.
17. Janini LM, Pieniazek D, Peralta JM, Schechter M, Tanuri A, Vicente AC, et al. 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; 13:69-81.
18. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876-82.
19. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstern H. *Epidemiologic research: principles and quantitative methods*. New York: van Nostrand Reinhold Company; 1982.
20. World Bank. *Confronting AIDS: public priorities in a global epidemic*. Washington DC: Oxford University Press; 1997.
21. Andrade TM, Dourado I, Galvão-Castro B. Associations among HTLV-I, HTLV-II and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18:186-7.
22. Prado MS, Barreto ML, Strina A, Faria JAS, Nobre AA, Jesus SR. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na Cidade de Salvador (Bahia, Brasil). *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:99-101.
23. Fylkesnes K, Ndhlovu Z, Kasumba K, Musonda RM, Sichone M. Studying dynamics of the HIV epidemic population-based data compared with sentinel surveillance in Zambia. *AIDS* 1998; 12:1227-34.
24. Glynn JR, Buve A, Carael M, Musonda RM, Kahindo M, Macauley I, et al. Factors influencing the difference in HIV prevalence between antenatal clinic and general population in sub-Saharan Africa. *AIDS* 2001; 15:1717-25.
25. Changalucha J, Grosskurth H, Mwita W, Todd J, Ross D, Mayaud P, et al. Comparison of HIV prevalences in community-based and antenatal clinic survey in rural Mwanza, Tanzania. *AIDS* 2002; 16:661-5.

26. Crampin AC, Glynn JR, Ngwira BM, Mwaungulu FD, Ponnighaus JM, Warndorff DK, et al. Trends and measurement of HIV prevalence in northern Malawi. *AIDS* 2003; 17:1817-25.
27. Kwesigabo G, Killewo JZ, Urassa W, Mbena E, Mhalu F, Lugalla JL, et al. Monitoring of HIV-1 infection prevalence and trends in the general population using pregnant women as a sentinel population: 9 years experience from Kagera region of Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23:410-7.
28. Ueda K, Kusuhara K, Tokugawa K, Miyazaki C, Yoshida C, Tokumura K, et al. Cohort effect on HTLV-I seroprevalence in southern Japan. *Lancet* 1989; 2:979.
29. Grangeiro A. O perfil sócio-econômico dos casos de AIDS da cidade de São Paulo. In: Parker R, Bastos C, Galvão J, Pedrosa JS, organizadores. *Aids no Brasil*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira Interdisciplinar de AIDS/Relume-Dumará; 1994. p. 91-125.

---

Submitted on 22/Nov/2005

Final version resubmitted on 28/Apr/2006

Approved on 19/May/2006

## 9 DISCUSSÃO

### 9.1 ISOLADOS DO SUBTIPO C CIRCULANTES NA CIDADE DE PORTO ALEGRE TAMBÉM O SÍTIO ADICIONAL PARA NF- $\kappa$ B

A identificação do terceiro sítio ligador de NF- $\kappa$ B nos isolados de subtipo C tem sido sugerida como uma possível contribuição para a adaptação viral. Nas amostras brasileiras estudadas o sítio de ligação para NF- $\kappa$ B foi identificado em triplicata exclusivamente nas seqüências classificadas como subtipo C (RS006, RS011, RS016 e RS021) (Anexo 3a), demonstrando que os isolados brasileiros seguem o mesmo padrão de ocorrência de elementos ligadores de NF- $\kappa$ B, com um sítio adicional na posição nucleotídica de -84 a -109 do HXB2. Curiosamente, um isolado originário do Brasil, 92BR025, selecionado no Genbank, obtido a pelo menos 14 anos, apresenta uma seqüência de nucleotídeos discordante na região correspondente ao sítio adicional para NF- $\kappa$ B característico de isolados de subtipo C. A presença do terceiro sítio nos 04 isolados de subtipo C de Porto Alegre obtidos mais recentemente, em comparação com a ausência do mesmo no isolado 92BR025 aponta para a possibilidade de origens distintas de introdução dos vírus de subtipo C no Brasil, ou de processos evolutivos drásticos. Com base no comportamento monofilético apresentado pelos isolados de subtipo C brasileiros, alguns autores defendem a idéia de que está epidemia teria sido originária a partir um limitado número de eventos de introdução no País (Soares et al. 2000, Monteiro et al. 2007). Entretanto essas análises foram baseadas no estudo dos genes *pol* e *env*. Análises filogenéticas mais rigorosas, envolvendo isolados obtidos em diferentes períodos ao longo da epidemia e inclusive envolvendo outras regiões genômicas, devem ser conduzidas para dirimir esta questão. Ainda em concordância com os dados observados para isolados não brasileiros está o fato de que o padrão de ocorrência de apenas dois sítios ligadores de NF- $\kappa$ B foi identificado em todos os isolados classificados como B ou F.

### 9.2 ISOLADOS DE SUBTIPO C APRESENTAM COM EXCLUSIVIDADE O SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA A SUBUNIDADE DO FATOR NUCLEAR $\kappa$ B, CONHECIDO COMO C-REL

A presença de uma assinatura específica no sítio I ligador de NF- $\kappa$ B para os fragmentos classificados como subtipo C analisados, a saber: uma deleção do nt A na



posição -90 e uma mutação T88G (CTGGGG–CGTTCCA) determinou o surgimento de um potencial sítio ligador do fator transcricional c-Rel em superposição com o sítio ligador de NF-κB. C-Rel é descrito como uma subunidade do fator transcricional NF-κB. A ocorrência do elemento ligador de c-Rel em 80% das LTRs dos isolados de subtipo C avaliadas (12/15), incluindo os quatro isolados classificados como C originários dos pacientes de Porto Alegre e mais 11 fragmentos LTRs, selecionados a partir do Genebank, sugere que as mutações relacionadas estão sob pressão seletiva positiva e pode contribuir para o perfil epidemiológico dos vírus de subtipo C. De Arellano e colaboradores (2005), também reportam a ocorrência dessas mesmas trocas nucleotídicas nos isolados de subtipo C. O real impacto dessas modificações para a biologia desses isolados carece de estudos funcionais para maiores conclusões.

### 9.3 OS SÍTIOS SP1 TRAZEM ASSINATURAS SUBTIPO ESPECÍFICAS E SE APRESENTAM COM RELATIVA CONSERVAÇÃO DENTRE AS AMOSTRAS ANALISADAS

McAllister e colaboradores (2000) realizaram uma análise comparativa dos sítios de ligação para Sp1 e demonstraram que há uma gradação no estado de conservação dos três sítios, sendo o I mais conservado e o III mais degenerado. Estes resultados são concordantes com os encontrados por Naghavi e colaboradores (1999). Recentemente, Ramirez e colaboradores (2007), além de confirmarem esse padrão, também demonstraram a relação entre o polimorfismo desses sítios e a evolução de pacientes com diferentes taxas de progressão para a fase de AIDS. Em oposição, Scriba e colaboradores (2002), mostraram, em um estudo de caracterização molecular de isolados africanos do subtipo C, que o sítio Sp1(II) apresentou uma taxa de conservação maior do que a verificada para o sítio Sp1(I). A análise dos isolados de Porto Alegre e Salvador mostrou concordância parcial com o padrão de semi-conservação gradativa descrito por Naghavi e colaboradores (1999). Contudo, mesmo os sítios Sp1 mais degenerados (III e I), parecem mais conservados para o grupo de isolados brasileiros em comparação com os sítios descritos para isolados de outras partes do mundo (Manuscrito II). Pode-se observar que mesmo o sítio Sp1 dos isolados avaliados, incluindo os não-brasileiros, apresentaram grande estado de conservação dentro de uma análise intra-subtipo. Esta conservação intra-subtipo está relacionada

com a ocorrência de uma assinatura específica para os isolados de subtipo C, presente no sítio Sp1(III), caracterizado tanto nos isolados brasileiros quanto nos isolados de outras origens por uma mudança de C para A e outra de C para T. Conforme demonstrado por diversos autores a conservação dos sítios Sp1 está relacionada com uma performance de ativação viral otimizada, mediada por Tat e, frequentemente, definindo um curso normal de evolução clínica para a fase de AIDS (McAllister et al. 2000, Ramirez et al. 2007 e Scriba et al. 2002). De fato, o óbito relacionado com a AIDS de 09 dos 22 pacientes estudados, em até três anos após o isolamento viral, apóia a ideia da ocorrência de isolados com capacidade de infecções produtivas e, portanto, promotores virais eficientes.

#### 9.4 A REGIÃO TATA BOX É CONSTANTE E EXTREMAMENTE CONSERVADA DENTRE OS ISOLADOS BRASILEIROS ESTUDADOS

A região TATA box, faz parte da região nuclear do promotor viral e, como nos demais genes eucarióticos, é reconhecida pelo fator transcricional IID (TFIID), que se liga a esta, dando início à montagem do complexo de transcrição. Todos os isolados brasileiros apresentaram total conservação desse sítio, refletindo sua importância crucial para a primeira fase de ativação da transcrição viral. Além disso, um sítio TATA adicional bem conservado foi identificado a jusante da região potencializadora em quatro isolados de Porto Alegre do subtipo B RS004, RS007, RS013 e RS017. É bastante comum em genes eucarióticos a presença de promotores adicionais para um mesmo gene, contudo essa perspectiva para a LTR do HIV-1 mereceria uma atenção mais cuidadosa e inclusive com a condução de ensaios funcionais.

#### 9.5 A REGIÃO TAR E O GRAMPO RNA-TAR APRESENTAM CARACTERÍSTICAS SUBTIPO-ESPECÍFICAS.

A análise da seqüência TAR dos isolados de Porto Alegre e Salvador mostrou que a grande parte da extensão desta região apresenta grande conservação de sua estrutura, o que condiz com sua correspondente função durante a ativação viral. Entretanto, a identificação de alguns pontos polimorficos aponta para possíveis repercussões no processo adaptativo viral dos diferentes isolados. Dentre as mutações identificadas destacam-se a U24A, presente em 05 isolados do subtipo C e a A46G, presentes tanto em B quanto em C. Ambas as mutações são descritas aqui pela

primeira vez para a seqüência TAR da LTR de isolados de HIV-1. Nenhuma das seqüências avaliadas apresentou um padrão idêntico ao relatado por Jeeninga e colaboradores (2000), embora o isolado RS017 apresente a mesma configuração da cepa, também B, HXB2. Outro isolado de subtipo B, RS014, apresentou um padrão único, diferindo do HXB2 apenas pela presença de uma única mutação adicional, A47G. Outro isolado de subtipo B, RS012 apresentou um perfil similar ao RS014, mas também com uma mutação adicional, U24A. Este ponto de mutação coincide com a região do bojo do grampo RNA e esteve presente também em outros isolados de subtipo B: RS004, RS007, RS005 e RS0013 (Figs. 15 d, g, e e j). A função dessa estrutura em forma de pequeno laço do RNA TAR tem sido relacionada com o encaixe da proteína Tat, mutações nessa região podem contribuir para uma ligação com maior ou menor eficiência de ligação, o que concorreria com o processo de ativação completa da transcrição viral. O polimorfismo caracterizado pela mutação A46G presentes nos isolados RS006 e RS018 (Figs. 15 f e k), também está sendo descrito pela primeira vez em um trabalho de caracterização da região TAR. Outro polimorfismo importante foi identificado no topo da alça da estrutura secundária do grampo, caracterizada pela mutação U30C, presente nos isolados RS007, RS011 e RS013 (Figs. 15 g, h e j). O dobramento das seqüências de cada isolado foi modelado pelo programa RNA Folding (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>) e gerou diferentes estruturas conforme apresentado (Figs 15 a-m). Os polimorfismos encontrados ao longo das seqüências TAR dos isolados RS006, RS007 e RS013 permitiram a identificação da perda de ligações entre as bases antiparalelas, determinadas pelas mutações U10U, e U12G + A47U (Figs. 15 f, g e j). Esta situação sugere a perda da rigidez da estrutura secundária do grampo, podendo concorrer para a modulação da atividade de ativação via ligação da proteína Tat. A comparação entre os padrões subtipos-específicos propostos por Jeeninga e colaboradores (2000) mostrou que poucos isolados brasileiros, dentre os avaliados, acompanham esses padrões, assim mesmo, apenas parcialmente como os isolados RS006, RS016, RS021 (padrão A & C2), além do isolado RS014, de subtipo B cujo padrão parcial identificado descrito por Jeeninga e colaboradores (2000) foi o D ou F. Dentre os 14 isolados brasileiros avaliados apenas um coincidiu totalmente com um dos padrões consensos sugeridos, o RS011, com padrão C1. Os demais isolados não apresentaram

semelhança de polimorfismo com os padrões sugeridos. Isto aponta para uma plasticidade ainda maior do que a prevista por Jeeninga e colaboradores (2000) para a região TAR, sugerindo ainda uma possível evolução subtipo-específica para os isolados de subtipo B e C, já que quatro das 05 seqüências C avaliadas apresentaram, mesmo que parcialmente, características moleculares semelhantes às previstas pelo estudo de Jeeninga e colaboradores (2000), enquanto a maioria dos isolados de subtipo B apresentaram polimorfismos discordantes. Os polimorfismos prevalentes na região TAR (+1 a +46) estão relacionados com as funções do grampo RNA, principalmente nas regiões conhecidas como bojo, onde a proteína Tat encontra uma estrutura de adaptação para sua ligação, e o topo da alça, formado por bases nucleotídicas presentes na região apical do grampo, constituída pela seqüência consenso CUGGGA que está relacionada com a afinidade e especificidade de ligação. A determinação da estrutura secundária dos RNAs TARs dos isolados de Porto Alegre mostrou que apesar dos polimorfismos identificados, a arquitetura dos grampos não foi corrompida, exceto no que diz respeito, ao já comentado, fenômeno de eliminação das pontes de hidrogênio entre algumas das bases mutantes. Outro possível desdobramento desses polimorfismos tem relação com a alteração do grau de identidade entre a estrutura do grampo e a proteína Tat, principalmente na seqüência constituída pelos seis nucleotídeos localizados no ápice do RNA TAR. Os isolados de Porto Alegre apresentaram um polimorfismo na posição 30, conforme descrito por Jeeninga e colaboradores (2000), com a prevalência dos nucleotídeos U ou C. Esta mutação U30C foi identificada em 02 isolados B e 01 C de Porto Alegre e relaciona-se, como descrito, com as regiões TAR consenso dos subtipos C1 ou E (Jeeninga et al. 2000). Conclusões acerca desses fenômenos devem ser emitidas com cautela, pois não se pode descartar a possibilidade de co-evolução da proteína Tat, como resposta adaptativa. Entretanto, é esperado que mutações na região TAR repercutam na qualidade de ligação da proteína Tat, influenciando na montagem do P-TEFb, responsável pelo processo de alongação das fitas de RNAm viral e definitivamente, determinando uma transativação do HIV-1 deficiente.

#### 9.6 A REGIÃO NRE DA LTR-5' APRESENTA SÍTIOS COM CARACTERÍSTICAS SUBTIPO ESPECÍFICAS.

A região do núcleo do elemento resposta negativa – NRE, (posição -163 a -174), está relacionada com a associação a fatores transcricionais como USF, MLTF ou UEF com papel de repressão do mecanismo de transativação na presença ou não da proteína Tat (Garcia et al. 1987, Lu et al. 1989, Lu et al. 1990, Sawadogo et al. 1988, Carthew et al. 1987, Giacca et al. 1992). Tem sido demonstrada a ocorrência de polimorfismo subtipo-específico na região NRE, envolvendo os subtipos C, D, E e J (Naghavi et al. 1999 e De Arellano et al. 2005). Na análise dessa região para os quatro isolados de subtipo C estudados, pôde-se observar a presença de pelo menos dois padrões, sendo que apenas um desses isolados, RS011, segue a assinatura consenso para isolados de subtipo C de origem não brasileira, o – CGCAGACACAT. Os outros três apresentaram uma das duas seqüências: CGTAGACACCT ou CGTAGACACAT. Essas mudanças também podem repercutir para oscilações na eficiência dessa região em ligar os respectivos fatores transcricionais. Interações adaptativas como essas podem solucionar problemas causados por mutações específicas na LTR ou por desafios impostos pela variabilidade dos contextos celulares.

#### 9.7 A IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS RECOMBINANTES E A CONFIRMAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DESSE FENÔMENO COMO ELEMENTO GERADOR DA DIVERSIDADE VIRAL

É muito provável que a contribuição de cada fragmento genômico tenha sua importância para os aspectos adaptativos dos isolados de HIV-1 e que as formas recombinantes sejam o resultado da seleção natural. Dentre os isolados originários de Porto Alegre, com perfis de discordância entre os genes amplificados e com informação disponível de pelo menos duas regiões gênicas, pode-se identificar uma prevalência de pelo menos 36% de formas recombinantes (Tab. 8). Este dado não corrobora o resultado do trabalho de nosso grupo (Monteiro et al 2007), que descreve a prevalência de recombinantes, a partir da avaliação desse mesmo grupo de amostras, mas relacionando apenas os genes *gag* e *env*. Neste trabalho anterior de nosso grupo demonstramos uma prevalência de 27% de isolados recombinantes, resultado este concordante com a taxa descrita por Brindeiro et al. (2003) que demonstraram uma prevalência de 23% para recombinantes intragênicos em *pol*. Diante da nova análise, a taxa de recombinação aumentou significativamente. Esta discordância de resultados apóia a hipótese de que os eventos de recombinação são muito freqüentes em regiões

onde prevalece mais de um subtipo viral e aponta para a necessidade de uma vigilância do polimorfismo molecular do HIV-1 para prevenir a emergência de formas virais aberrantes, com comportamento biológico imprevisível. A análise da contribuição dos subtipos entre os genes virais avaliados mostra uma distribuição de ocorrência em desequilíbrio entre os subtipos B e C, com vantagem para o subtipo B nas regiões LTR e *env* e pequena vantagem para o subtipo C nos genes *gag* e *pol*. Entretanto, ainda não é possível extrapolar esses números para uma avaliação da contribuição adaptativa de cada subtipo devido às limitações experimentais desse estudo. Este resultado, contudo, permite avaliar a imprecisão dos trabalhos de epidemiologia molecular do HIV-1 que utilizam como metodologia de investigação o estudo de um único gene em áreas geográficas com prevalência de mais de um subtipo de HIV-1. Este resultado reforça então a necessidade de que os estudos de caracterização molecular do HIV-1, principalmente aqueles realizados em áreas com circulação de mais de um subtipo, não negligenciem a informação dos genes não avaliados. A expressiva ocorrência de potenciais formas recombinantes na população estudada sugere um intenso fluxo dos subtipos circulantes durante os eventos de exposição. De acordo com os princípios das metodologias de amplificação molecular do DNA proviral, mesmo que uma infinidade de “quasispecies” ocorra em um mesmo organismo, o produto amplificado e seqüenciado é geralmente o mais abundante. Esta interpretação nos permite inferir que a forma viral identificada por expressão molecular através das metodologias empregadas, é a forma selecionada pela pressão ambiental. Sendo assim, pode-se sugerir que as formas recombinantes observadas sejam formas evolutivas e com consistente potencial adaptativo.

Para ampliar a informação sobre a composição do genoma viral dos isolados dos pacientes de Porto Alegre foi realizado sequenciamento e estudo filogenético do gene *pol*. A análise filogenética do gene da polimerase mostrou que seis seqüências foram classificadas como subtipo B: RS003, RS004, RS005, RS007, RS012 e RS017. A topologia da árvore aponta um ancestral comum para esse grupo de isolados dentro do referido clado. As demais oito seqüências analisadas agruparam juntamente com as cepas de referência do subtipo C. Este resultado é apoiado por um alto valor de bootstrap dentro desse clado (92%). A topologia dos ramos indica que as amostras RS008, RS021 e RS001 compartilham um ancestral comum recente, juntamente com

outras duas seqüências de referência do Brasil (98BR004 e 92BR025) (Bootstrap de 64% e  $p < 0.001$ ). As amostras RS016, RS014 e RS006 agruparam em outro clado monofilético. A linhagem do isolado RS002 parece ser mais antiga quando comparada com a posição dos demais isolados de subtipo C, embora esta distância genética não permita uma classificação como outro subtipo (bootstrap de 92%) (Fig. 16). A análise de bootscan do programa Simplot, assim como o RIP 3.0, mostrou que este isolado compartilha fragmentos gênicos de dois subtipos CB. A análise de recombinação do gene *pol* das amostras de Porto Alegre aponta para a ocorrência de um padrão de recombinação para alguns isolados que agruparam juntamente com as cepas de referência do subtipo C, relacionados em um mesmo ramo monofilético: RS006, RS014 e RS016 além de um outro isolado mais ancestral, o RS011, este padrão foi também confirmado através da ferramenta RIP 3.0, sugerindo um padrão de recombinação CB em *pol*. Dois trabalhos independentes reportam a ocorrência de recombinantes CB no Brasil, apontando uma prevalência de 11% (Gomez-Carrillo et al. 2006 e Santos et al. 2006). É possível que, além do RS002 estes isolados RS006, RS011, RS014 e RS016 sejam de fato isolados recombinante e que pelo menos o RS006, RS014 e o RS016 compartilhem um padrão genético muito próximo entre si dentro do gene *pol* e que também se assemelhem aos recombinantes já descritos. Entretanto, para concluir estes achados são necessárias análises adicionais.

#### 9.8 PREDOMÍNIO DOS SUBTIPO B E C NAS REGIÕES LTR DE ISOLADOS BRASILEIROS

Dentre as amostras com resultados discordantes entre os genes subtipados (LTR, gag, *pol* e *env*) (Tab. 8), nota-se a predominância do subtipo B em comparação com o subtipo C e F. Esta análise parece ser mais próxima da realidade no contexto da avaliação adaptativa proporcionada pelas características do gene *env* de diferentes subtipos. A simples taxa de avaliação da qualidade genética dos genes virais, desconsiderando-se a necessária participação de mais de um subtipo genético, num contexto epidemiológico molecular plural, tendo os hospedeiros como unidades ambientais, não permite conclusões sobre o significado das diferentes taxas de prevalência dos subtipos para um dado gene viral. Por outro lado, se em um dado sistema (indivíduo infectado), ocorrem eventos de recombinação, gerando formas virais

com características específicas, que se destacam dentre as demais “quasispecies”, pode-se inferir que as características selecionadas após os ensaios naturais de recombinação estejam concorrendo para o melhor estado adaptativo do vírus. Seguindo essa linha, é sugestivo que os recombinantes com *env* característicos de subtipo B podem ser melhores adaptados dentre os subtipos circulantes nessa região geográfica. A baixa prevalência de isolados de subtipo F na amostragem avaliada era esperada, com base em trabalhos anteriores de caracterização molecular do gene *pol* principalmente. Curiosamente, chama a atenção a coincidente ausência de informação gênica pertinente ao subtipo F nas regiões *pol* e LTR. O tamanho da amostra limita maiores interpretações sobre este fenômeno, entretanto, trabalhos recentes de Sanabani, e colaboradores (2006), e Sá-Filho e colaboradores (2006) e Guimarães (comunicação pessoal, 2007) caracterizaram o genoma em seu comprimento quase total, de respectivamente diversos isolados recombinantes BF, da região Sudeste, mostrando que a LTR-5' desses recombinantes foi sempre classificada como de subtipo não-F. De fato, mesmo com um universo limitado, pode-se verificar uma maior predominância de recombinantes com LTR de subtipo B em detrimento do C ou F nos isolados estudados provenientes de Porto Alegre. Talvez a LTR de subtipo B ofereça maior estabilidade adaptativa às formas recombinantes, mas essa sugestão não se sustenta sem a constatação apoiada por resultados de ensaios funcionais. Mesmo assim, é claramente observado que o fenômeno de recombinação contribui intensamente para a ampliação do polimorfismo do HIV-1 e, associado a isto, as conseqüências decorrentes. Um trabalho de caracterização molecular de isolados recombinantes CB da região Sul do país propõe a identificação de uma nova CRF brasileira, entretanto este trabalho não segue as normas estabelecidas para a determinação das CRFs descrita por Robertson (2000), negligenciando a necessidade de estudo do genoma total para tal, levando em consideração apenas a caracterização dos “breakpoints” presentes na região *pol* (Santos et al 2006). O isolado RS002 também apresentou um perfil recombinante CB para a região do gene *pol*.



## 9.9 AS LTRS DE ISOLADOS DE SUBTIPO C APRESENTAM MAIOR NÚMERO DE SÍTIOS RELACIONADOS COM OS FATORES TRANSCRICIONAIS, INCLUINDO OS COM ATIVIDADE ESPECÍFICA NO SISTEMA NERVOSO, DO QUE OS ISOLADOS DE SUBTIPO B

A regulação gênica diferencial que ocorre em cada célula, dentre outras conseqüências, impõe diferentes variações ambientais, que se constituem como desafios para a adaptabilidade viral. O conjunto de fatores que regulam a transcrição gênica em cada célula poderia se constituir como um sério fator limitante para a evolução da infecção viral, caso a LTR não contasse com um vasto repertório de possibilidades para responder às imposições ambientais específicas de cada tecido. A LTR é relativamente a região menos conservada do genoma do HIV-1, este fenômeno determina o caráter extremamente plástico deste promotor gênico. De fato, a análise dos sítios de ligação para fatores transcripcionais, bem como, aqueles identificados como sítios potenciais, na LTR dos isolados brasileiros mostrou diversas assinaturas e padrões subtipo-específicos e tecido-específicos. Dentre as especificidades de ocorrência e distribuição dos potenciais sítios ligadores de fatores transcripcionais identificados ao longo da região LTR dos isolados brasileiros está a identificação de padrões de distribuição e ocorrência, de alguns dos potenciais fatores transcripcionais, específicos para os subtipos B e C avaliados. Essa constatação foi possível após a análise através do programa MatInspector (Cartharius et al. 2005), que ao comparar as seqüências submetidas com as matrizes de similaridades de sítios de ligação para fatores transcripcionais identificados previamente em estudos independentes, identificou os potenciais sítios de ligação para os fatores transcripcionais, levando em consideração um filtro relacionado com o tipo de célula em que esses fatores ocorrem funcionalmente, a saber: Linfócitos, fagócitos, monócitos e neuroglias. Foram identificadas algumas falhas do programa, desde a denominação incomum do fator ligador ao potencial sítio identificado, até o não reconhecimento de alguns dos sítios de ligação a fatores transcripcionais de importância crucial para a atividade transcional do HIV-1, apesar da informação apresentada pelo programa de atualização recente das matrizes de similaridade aplicadas. Para resolver esta questão, os sítios não subestimados foram identificados manualmente a partir do alinhamento das respectivas seqüências. Esta análise permitiu a observação de algumas características identificadas como possíveis marcadores para uma rápida identificação do subtipo

através do perfil de distribuição dos potenciais sítios ligadores de fatores transcricionais, como: a presença do terceiro sítio de ligação para NF- $\kappa$ B para a maioria dos isolados de subtipo C, a presença de dois potenciais sítios ligadores para o fator POU, também nas LTRs de isolados de subtipo C e a presença do sítio c-Rel na maioria das LTRs de subtipo C. O alinhamento da sequência relacionada com os sítios ligadores de NF- $\kappa$ B mostrou que os isolados de Porto Alegre seguem os mesmos padrões dos relatados para outras regiões geográficas, com um sítio adicional presente nos isolados de subtipo C (Anexo 3). Não foram identificadas características exclusivas para o subtipo B relacionadas com a distribuição e ocorrência dos potenciais sítios ligadores de fatores transcricionais. Este distinto repertório de potenciais sítios ligadores de fatores transcricionais, com diferentes ocorrências e/ou frequências sugere a existência de diferentes possibilidades de modelos regulatórios de ativação gênica subtipo-específico envolvendo diferentes conjuntos de fatores transcricionais. O resultado da determinação da predominância dos potenciais sítios ligadores de fatores transcricionais, cujas proteínas relacionadas, como NKX3.1, fator Pou, NKX5-2 e neurogenina, que apresentam atividade exclusiva em células neurogliais, sugere a possibilidade de uma regulação tecido-específica, em que os isolados do subtipo C estariam mais relacionados do que os isolados de subtipo B. Em virtude da falta de experimentos funcionais ou dados clínicos precisos, pode-se concluir que parece existir um “background” genético de resposta a esses fatores que fazem parte do contexto celular neuroglial. Dessa forma, apenas após testes funcionais se poderá responder se há vantagem adaptativa ou não para os isolados de subtipo C no ambiente celular nervoso. Salemi e colaboradores (2005) demonstraram a existência de cepas virais divergentes, obtidas a partir de diferentes compartimentos do sistema nervoso central de um mesmo indivíduo com demência causada pela infecção por HIV-1. A análise filogenética e o estudo de relógio molecular demonstraram que essas variantes virais evoluíam com velocidade entre 30 e 100 vezes mais que as cepas de outros compartimentos. Entretanto, este estudo, além de não avaliar o papel dos subtipos virais, credita à ação dos macrófagos, em sua atividade inflamatória e tecido-dispersora da infecção viral, como principal responsável pelo fenômeno. Provavelmente os macrófagos também se constituam como um componente adicional para a instalação de quadros de neuropatogenese em pacientes com AIDS, entretanto, não parece

prudente negligenciar a provável ação do ambiente nuclear das células nervosas, que concorrem para a modulação da qualidade da atividade transativadora viral. A análise de identificação dos potenciais sítios ligadores de fatores transcricionais no contexto dos compartimentos não-neurológicos, mostra haver diferenças substanciais apenas na ocorrência dos potenciais sítios de ligação a c-Rel, HMG, Box, e fator GATA (Fig. 9). As assinaturas específicas, tanto nos sítios ligadores de fatores transcricionais, como nos potenciais elementos de resposta presentes nas LTRs dos isolados de subtipo B e C estudados (Figs. 10-12), bem como a identificação dos diferentes potenciais sítios e seus polimorfismos, sugerem a possibilidade da existência de composições alternativas, subtipo-específicas, durante o processo de ativação gênica do HIV-1. É bastante provável que a variabilidade intersubtipo dos sítios relacionados com a atividade transcricional do HIV-1 esteja associada à qualidade da produção dos transcritos virais.

#### 9.10 OS ISOLADOS DE SUBTIPO C BRASILEIROS APRESENTAM COMPORTAMENTO BIOLÓGICO TÍPICO

A caracterização fenotípica dos isolados de Porto Alegre, permitiu a confirmação do caráter R5 exibido pelos isolados com envelope típico de subtipo C, independente das características moleculares das demais regiões gênicas avaliadas. Os dois isolados com *env* de subtipo B RS021 e RS022 apresentaram tropismo duplo para os receptores CCR5 e CXCR4. O caráter X4 ou R5X4 é previsto para pelo menos 50% dos isolados originários de pacientes com AIDS, infectados por vírus de subtipo B. O isolado RS001 que também apresentou tropismo duplo, constitui-se como uma exceção a um consenso na literatura que aponta como característica fenotípica dos isolados de subtipo C, a preferência pelo receptor CCR5. Ugoline e colaboradores (1999), discutem a possibilidade de que a clássica mudança de fenótipos, de R5 para vírus isolados de pacientes em fases iniciais da infecção para os fenótipos R5X4 e X4 associados à fase tardia da infecção durante a fase de AIDS, estaria relacionada com o processo de seleção natural das formas X4, que estariam mais adaptadas para as condições ambientais da fase tardia da infecção, onde haveria maior disponibilidade de células-alvo ativadas e com maior expressão do receptor CXCR4. Fouchier e colaboradores (1992), descreveram a relação entre a soma das cargas dos resíduos de

aminoácidos da alça V3 da gp120 como marcador preditivo para a utilização desses isolados para os diferentes receptores de quimiocinas (Anexo 3a). O exame desse parâmetro para os isolados avaliados em suas características fenotípicas foram concordantes com os critérios descritos por Fouchier e colaboradores (1992). Nenhuma relação foi identificada entre as características moleculares das demais regiões gênicas, LTR, gag e pol, e o comportamento biológico definido. Ferraro e colaboradores (2001) demonstraram que o comportamento biológico de isolados brasileiros, com gene env característico de subtipo B e F, também apresentam comportamento biológico similar aos isolados circulantes em outras partes do mundo.

#### 9.11 A CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS E A ADAPTABILIDADE VIRAL

As respectivas conclusões sobre os resultados de caracterização biológica descritos devem ser vistas com a devida cautela. A artificialidade dos modelos utilizados nessas experimentações limitam interpretações minimalistas sobre as características genotípicas e o comportamento biológico do HIV-1. Trabalhos conduzidos pelo grupo coordenado pela equipe do Dr. Eric J. Arts, (Morozsan et al. 2005, Ariën et al. 2005), defendem a importância do envelope viral para a adaptabilidade do HIV-1. Entretanto, as características genotípicas de outras importantes regiões do genoma viral são negligenciadas. A adaptabilidade de uma dada cepa viral deve resultar do balanço entre as características que conferem vantagens ou desvantagens, frente aos desafios de um particular ambiente. Apenas o reconhecimento e ligação das proteínas do envelope viral aos fatores da superfície das células hospedeiras não é suficiente para levar a cabo uma infecção produtiva. Esta é a principal característica avaliada nos estudos de adaptabilidade do HIV-1, a velocidade e quantidade de partículas virais produzidas em um dado intervalo de tempo, que em resumo caracteriza uma infecção produtiva. Curiosamente, as medidas de adaptabilidade não fazem sentido sem parâmetros comparativos, porque obviamente, a resultante vantagem ou desvantagem de uma dada estrutura celular, célula, microorganismo, organismo ou população só existirá quando relativada com uma outra unidade competidora. Cepas virais dotadas de envelopes com adaptabilidade ótima não serão bem sucedidas em produzir partículas virais, caso outras estruturas do HIV-1 apresentem algum comprometimento que concorra para uma adaptação deficiente. Isto

pode ocorrer durante qualquer etapa do ciclo viral pós-entrada do vírus na célula hospedeira, como transcrição reversa, transporte nuclear, integração do provírus, ativação da transcrição e transporte para o citoplasma, tradução, processamento das poliproteínas e até durante a montagem e brotamento das partículas virais. Essa idéia é corroborada pelo uso das principais estratégias de controle da infecção pelas drogas inibidoras da transcriptase reversa e protease, que interferem na qualidade da produção de partículas virais em detrimento da ação dessas substâncias nas etapas de transcrição reversa e do processamento das proteínas virais. A mesma linha de raciocínio é válida para a natureza da LTR viral e sua contribuição para a adaptabilidade do HIV-1. A LTR deve ser dotada de atributos genotípicos que a qualifiquem a responder adequadamente ao microambiente celular, principalmente o nucleoplasmal, específicos de cada tecido. Obviamente, a primeira etapa de entrada do vírus na célula, respaldada por proteínas competentes do envelope é uma condição indispensável para que um promotor LTR ou das demais estruturas funcionais do HIV-1 desempenhem suas funções e exerçam sua qualidade adaptativa. O desenvolvimento dos inibidores de entrada como o Maraviroc, antagonista do receptor CCR5, pode vir a ser uma boa estratégia terapêutica em populações expostas a vírus de subtipo C, em detrimento de seu comportamento biológico peculiar, relativo ao uso preferencial do receptor CCR5 em detrimento do CXCR4.

## 9.12 IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO LTR EM PERSPECTIVAS PRÁTICAS

Os estudos de caracterização molecular são fundamentais para a instrumentalização de iniciativas experimentais em contextos funcionais, e para a avaliação e desenvolvimento de estratégias terapêuticas, além da atualização dos reagentes para diagnóstico e entendimento da biologia do HIV. As propostas de intervenção terapêutica com enfoque na etapa transcricional são bastante factíveis, mas merecem a devida cautela. Foi descrito recentemente que a ação do {2-amino-6[2-(ciclopropilmetoxi)-6-hidroxifenil]-4-i1-nicotinonitrili} – (AHP), inibe a replicação do HIV-1 *in vitro*, através da inibição da ativação da LTR mediada por NF- $\kappa$ B (Victoriano et al. 2006), outros autores também já propuseram abordagens semelhantes envolvendo o próprio NF- $\kappa$ B, além de Sp1, dentre outros, conforme contextualização vista na

introdução (Baba 1997, De Clercq 2002, Daelemans et al. 1999, Yamaguchi et al. 2002, Turpin et al. 1998, Reynolds et al. 2003). Reconhecendo-se os mecanismos de regulação gênica como genéricos, viral ou humano, as estratégias com enfoque no bloqueio da transcrição viral a partir de fatores transcricionais, sem a devida especificidade, fatalmente repercutirá nos mecanismos fisiológicos de regulação da transcrição dos genes humanos. Intuitivamente, a solução seria empregar alguma abordagem com base nas estruturas virais, e.g. a identificação de sítios de ligação específicos, reconhecidos por fatores ligantes inequívocos e com capacidade de bloqueio do processo, a identificação de fatores antagonistas da ação de Tat e Rev, a tecnologia do RNA de interferência, dificultando o dobramento do grampo RNA-TAR, impedindo a ligação de Tat e a ativação plena do mecanismo, e alvos específicos na região LTR de acetil-transferases e deacetilases, responsáveis pela alteração do estado de condensação da cromatina (Marzio & Giacca 1999, Van Lint 2000). Contudo, essas abordagens ainda podem oferecer riscos para o equilíbrio homeostático. O conhecimento sobre os mecanismos celulares envolvidos nos diversos processos responsáveis pela manutenção do organismo ainda é reduzido e limita a proposição de modelos intervencionistas anti-HIV/AIDS baseados na manipulação molecular da etapa transcricional do ciclo viral.

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Comparando os resultados em um espectro mais amplo de regiões genômicas, LTR-5', *gag*, *pol* e *env* [Monteiro et al. 2007], a taxa de prevalência dos diferentes subtipos mostra ocorrências variáveis. A identificação dos potenciais SLFT na LTR-5' dos isolados, variou tanto em ocorrência, quanto na qualidade dos sítios entre os subtipos representados. A partir dessas diferenças foi possível a identificação de padrões de ocorrência dos potenciais SLFT e assinaturas subtipo específicas, apontando, dessa forma, a uma dinâmica evolutiva independente entre os subtipos virais avaliados. Esta característica pode estar relacionada com a modulação do controle da regulação gênica dos diferentes subtipos e sua possível influência para o perfil epidemiológico do HIV-1. Ainda não existem estudos conclusivos sobre o papel do polimorfismo viral do HIV e sua relação com os marcadores de imunopatogenicidade, dispersão e distribuição dos subtipos nas diferentes regiões geográficas. Um estudo mais robusto com o objetivo de avaliar a contribuição dos diferentes subtipos para a região LTR em isolados recombinantes pode melhorar a compreensão desse fenômeno. Os resultados desse trabalho destacam a urgência da retomada de ações governamentais de apoio sistemático ou condução de estudos continuados da epidemiologia molecular das cepas virais de HIV-1 circulantes no Brasil e no mundo, com enfoque para diferentes regiões genômicas do vírus. A rápida evolução dos subtipos virais e suas diferentes cepas, que refletem-se na intensa variabilidade do HIV-1 continua sendo um desafio para o controle da epidemia de HIV/AIDS no Brasil e no mundo. A identificação de características particulares na região genômica responsável pela regulação da expressão gênica viral em diferentes subtipos reforça a idéia de que o processo evolutivo do HIV-1 pode contribuir para a emergência de cepas com maior potencial virulento e talvez, com a perspectiva de potencial colonizador de compartimentos, órgãos e tecidos que contribuam para a ampliação do processo de escape viral das defesas naturais do organismo, bem como das drogas componentes dos retrovirais atualmente em uso. A proposta de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, inclusive com base nas características da região LTR, justificam a necessidade de caracterização molecular e fenotípica do vírus. O pequeno volume de informações acerca das características moleculares da região LTR de isolados dos diferentes subtipos e de diferentes regiões do mundo, dificultam algumas das

conclusões possíveis acerca dos mecanismos relacionados com este fragmento genômico, contudo, as novas descobertas da última década sobre a função e importância do promotor gênico viral para a infecção e a evolução para a AIDS, têm repercutido para a sensibilização da comunidade científica especializada sobre a importância desses estudos e sua possível contribuição para o entendimento da biologia do vírus, a patogenia e o desenvolvimento terapêutico.



## 11 CONCLUSÕES

Os resultados de subtipagem dos isolados de Porto Alegre e Salvador confirmam o freqüente fenômeno de recombinação como um mecanismo de amplificação da diversidade genômica do HIV-1, além da confirmação da circulação de isolados de subtipo B, C e F na cidade de Porto Alegre e B e F em Salvador.

- Os isolados provenientes de Porto Alegre com perfis de discordância entre os genes amplificados e com informação disponível de pelo menos duas regiões gênicas, apontam para uma prevalência de pelo menos 36% de formas recombinantes. Dentre as amostras com resultados discordantes entre os genes subtipados (LTR, *gag*, *pol* e *env*), nota-se a predominância do subtipo B em comparação com o subtipo C e F.
- O padrão de triplo sítio de ligação para o fator transcricional NF- $\kappa$ B, peculiar dos isolados de subtipo C de outras regiões geográficas do mundo, foi confirmado para os isolados de Porto Alegre.
- A qualidade dos sítios de ligação Sp1 é concordante com a idéia de melhor replicação viral, coincidindo com o óbito relacionado com o desenvolvimento de AIDS de 09 dos 22 pacientes de Porto Alegre estudados.
- Foram descritas pela primeira vez duas mutações na seqüência TAR da LTR de isolados de HIV-1 para os vírus originários de Porto Alegre: a U24A, presente em 05 isolados do subtipo C e a A46G, presentes tanto em B quanto em C. Outro polimorfismo importante foi identificado no topo da alça da estrutura secundária do grampo, caracterizada pela mutação U30C, presente nos isolados RS007, RS011 e RS013.
- A predominância dos potenciais sítios ligadores de fatores transcricionais, cujas proteínas relacionadas apresentam atividade exclusiva em células neurogлияis, sugere a possibilidade de uma regulação tecido-específica, em que os isolados do subtipo C estariam mais relacionados do que os de subtipo B.
- O comportamento biológico dos isolados de subtipo C de Porto Alegre foi concordante com a relação fenótipo x subtipo, descrita. Nenhuma relação foi identificada entre as características moleculares das demais regiões gênicas, LTR, *gag* e *pol*, e o comportamento biológico definido.

## 12 REFERÊNCIAS

- An SF, Groves M, Gray F, Scaravilli F. 1999. Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58(11):1156-62.
- Baba, M. 1997. Cellular factors as alternative targets for inhibition of HIV-1. *Antiviral Res.* 33:141–152.
- Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., Peterlin, B. M. 2001. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 8:327–337.
- Bargonetti, J., Chicas, A., White, D., Prives, C. 1997 p53 represses Sp1 DNA binding and HIV-LTR directed transcription. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* 43:935–949.
- Bassuk, A. G., Anandappa, R. T., Leiden, J. M. 1997. Physical inter-actions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *J. Virol.* 71:3563–3573.
- Berger EA, Murphy PM and Farber JM, 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Ann Rev Immunol* 17:657-700.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A. 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci.* 4(7):702-10.
- Bhattacharyya D, Brooks BR, Callahan L. 1996. Positioning of positively charged residues in the V3 loop correlates with HIV type 1 syncytium-inducing phenotype. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 12(2):83-90.
- Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T. 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med.* 3(3):252-3.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17: 1063-9.
- Brown AJL & Richman DD, 1997. HIV-1: Gambling on the evolution of drug resistance. *Nature Med* 3:268-271.
- Buckner, A. E., Tesmer, V. M., Bina, M. 2002. Regulation of HIV-1 transcription by NF-IL6 in activated Jurkat T cells. *Virus Res.* 89:53–63.
- Burland TG. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol;* 132:71-91.

- Canonne-Hergaux, F., Aunis, D., Schaeffer, E. 1995 Interactions of the transcription factor AP-1 with the long terminal repeat of different human immunodeficiency virus type 1 strains in Jurkat, glial, and neuronal cells. *J. Virol.* 69:6634–6642.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 21(13):2933-42.
- Carthew RW, Chodosh LA, Sharp PA. 1987. The major late transcription factor binds to and activates the mouse metallothionein I promoter. *Genes Dev.* 1(9):973-80.
- Chan DC, Chutkowski CT, Kim PS. 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15613-7.
- Coffin JM. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 267(5197):483-9.
- Col E, Caron C, Seigneurin-Berny D, Gracia J, Favier A, Khochbin S. 2001. The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J Biol Chem.* 276(30):28179-84.
- Collman R, Balliet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson N, Srinivasan A. 1992. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 66(12):7517-21
- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Shue S, Landau NR, 1997: Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals. *J Exp Med;* 185:621-628.
- Cosenza MA, Zhao ML, Si Q, Lee SC. 2002. Human brain parenchymal microglia express CD14 and CD45 and are productively infected by HIV-1 in HIV-1 encephalitis. *Brain Pathol.* 12(4):442-55.
- Coull, J. J., Romerio, F., Sun, J. M., Volker, J. L., Galvin, K. M., Davie, J. R., Shi, Y., Hansen, U., Margolis, D. M. 2000. The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J. Virol.* 74:6790–6799.
- Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, Duarte G & Machado AA, 1998. High frequency of GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. *J AIDS and Hum Retrovirology* 19:74-79.
- Crabtree, G. R. 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96:611–614.
- Cron, R. Q., Bartz, S. R., Clausell, A., Bort, S. J., Klebanoff, S. J., Lewis, D. B. 2000. NFAT1 enhances HIV-1 gene expression in primary human CD4 T cells. *Clin. Immunol.* 94:179–191.

Cullen BR. 1998. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology*. 249(2):203-10.

Cunningham AL, Naif H, Saksena N, Lynch G, Chang J, Li S, Jozwiak R, Alali M, Wang B, Fear W, Sloane A, Pemberton L, Brew B. 1997. HIV infection of macrophages and pathogenesis of AIDS dementia complex: interaction of the host cell and viral genotype. *J Leukoc Biol*. 62(1):117-25.

d'Adda di Fagagna, F., Marzio, G., Gutierrez, M. I., Kang, L. Y., Falaschi, A., Giacca, M. 1995. Molecular and functional interactions of transcription factor USF with the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 69: 2765-2775.

Daelemans, D., Vandamme, A. M., De Clercq, E. 1999. Human immunodeficiency virus gene regulation as a target for antiviral chemotherapy. *Antivir. Chem. Chemother*. 10:1-14.

De Arellano ER, Soriano V, Holguin A. 2005. Genetic analysis of regulatory, promoter, and TAR regions of LTR sequences belonging to HIV type 1 Non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 21(11):949-54.

De Clercq, E. (2002) New anti-HIV agents and targets. *Med. Res. Rev*. 22:531-565.

de Jong JJ, Goudsmit J, Keulen W, Klaver B, Krone W, Tersmette M, de Ronde A. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol*. 66(2):757-65.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. Sep 27;273(5283):1856-62. Erratum in: *Science* 274(5290):1069.

Doms RW, Peiper SC. 1997. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*. 235(2):179-90.

Du, H., Roy, A. L., Roeder, R. G. 1993. Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator elements of the HIV-1 and the Ad-ML promoters. *EMBO J*. 12:501-511.

Duan, L., Ozaki, I., Oakes, J. W., Taylor, J. P., Khalili, K., Pomerantz, R. J. 1994. The tumor suppressor protein p53 strongly alters human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol*. 68:4302-4313.

Ellis RJ, Moore DJ, Childers ME, Letendre S, McCutchan JA, Wolfson T, Spector SA, Hsia K, Heaton RK, Grant I. 2002. Progression to neuropsychological impairment in human immunodeficiency virus infection predicted by elevated cerebrospinal fluid levels of human immunodeficiency virus RNA. *Arch Neurol*. 59(6):923-8.

Enting RH, Hoetelmans RM, Lange JM, Burger DM, Beijnen JH, Portegies P. 1998.

Eugen-Olsen J, Iversen AK, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, Sorensen AM, Katzenstein T, Dickmeiss E, Gerstoft J, Skinhoj P, Svejgaard A, Nielsen JO, Hofmann B. 1997. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS*. 11(3):305-10.

Fang, G., Burger, H., Chappey, C., Rowland-Jones, S., Viskosy, A., Chen, C. H., Moran, T., Townsend, L., Murray, M., Weiser, B. 2001. Analysis of transition from long-term nonprogressive to progressive infection identifies sequences that may attenuate HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17:1395–1404.

Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. 1996. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*. 124(7):654-63.

Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-91.

Ferraro GA, Mello MA, Suttmoller F, Van Weyenbergh J, Shindo N, Galvao-Castro B, Bou-Habib DC; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. Biological characterization and chemokine receptor usage of HIV type 1 isolates prevalent in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Sep 1;17(13):1241-7.

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

Garcia JA & Gaynor RB. 1994 The human immunodeficiency virus type-1 long terminal repeat and its role in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*.49:157-96.

Garcia JA & Gaynor RB. 1994. The human immunodeficiency virus type-1 long terminal repeat and its role in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 49: 157-96.

Garcia JA, Wu FK, Mitsuyasu R, Gaynor RB. 1987. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J*. 6(12):3761-70.

Giacca M, Gutierrez MI, Menzo S, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A. 1992. A human binding site for transcription factor USF/MLTF mimics the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. 186(1):133-47.

Gomez-Carrillo M, Pampuro S, Duran A, Losso M, Harris DR, Read JS, Duarte G, De Souza R, Soto-Ramirez L, Salomón H. 2006. NISDI Perinatal Study Group. Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 22(11):1186-91.

- Grossman Z, Feinberg M, Kuznetsov V, Dimitrov D, Paul W. 1998. HIV infection: how effective is drug combination treatment? *Immunol Today*. 19(11):528-32.
- Günthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Guatelli JC, Riggs NL, Havlir DV and Richman DD, 1998. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol* 72:2422-2428.
- Gurtler LG, Zekeng L, Tsague JM, van Brunn A, Afane Ze E, Eberle J, Kaptue L. 1996. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl.*;11:195-202.
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20:W13-23.
- Henderson, A. J., Calame, K. L. 1997. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macro-phages but not CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8714– 8719.
- Henderson, A. J., Connor, R. I., Calame, K. L. 1996. C/EBP activators are required for HIV-1 replication and proviral induction in monocytic cell lines. *Immunity* 5:91–101.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 373(6510):123-6.
- Hofmann, B., Nishanian, P., Nguyen, T., Liu, M., Fahey, J. L. 1993. Restoration of T-cell function in HIV infection by reduction of intracellular cAMP levels with adenosine analogues. *AIDS* 7:659–664.
- Jacque, J. M., Fernandez, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thomas, D., Baleux, F., Virelizier, J. L., Bachelier, F. 1996. Permanent occupancy of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer by NF-kappa B is needed for persistent viral replication in monocytes. *J. Virol.* 70: 2930–2938.
- Jeang, K. T., Chun, R., Lin, N. H., Gagnol, A., Glabe, C. G., Fan, H. 1993. In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J. Virol.* 67:6224–6233.
- Jeeninga, R. E., Hoogenkamp, M., Armand-Ugon, M., de Baar, M., Verhoef, K., Berkhout, B. 2000. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J. Virol.* 74:3740–3751.

- Kamine, J., Chinnadurai, G. 1992. Synergistic activation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the viral Tat protein and cellular transcription factor Sp1. *J. Virol.* 66:3932–3936.
- Karn J. 1999 Tackling Tat. *J Mol Biol* 22;293(2):235-54.
- Kashanchi, F., Agbottah, E. T., Pise-Masison, C. A., Mahieux, R., Duvall, J., Kumar, A., Brady, J. N. 2000. Cell cycle-regulated transcription by the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator. *J. Virol.* 74:652–660.
- Kato, H., Horikoshi, M., Roeder, R. G. 1991. Repression of HIV-1 transcription by a cellular protein. *Science* 251:1476–1479.
- Kiernan RE, Vanhulle C, Schiltz L, Adam E, Xiao H, Maudoux F, Calomme C, Burny A, Nakatani Y, Jeang KT, Benkirane M, Van Lint C. 1999. HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.* 18(21):6106-18.
- Kingsman SM & Kingsman AJ 1996. The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur J Biochem* 240(3):491-507.
- Kinoshita, S., Chen, B. K., Kaneshima, H., Nolan, G. P. 1998. Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell* 95:595–604.
- Kinter A, Catanzaro A, Monaco J, Ruiz M, Justement J, Moir S, Arthos J, Oliva A, Ehler L, Mizell S, Jackson R, Ostrowski M, Hoxie J, Offord R, Fauci AS. 1998. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(20):11880-5.
- Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Hamacher, M., Sullivan, J. L., Desrosiers, R. C. 1997. Activity of human immunodeficiency virus type 1 promoter/TAR regions and tat1 genes derived from individuals with different rates of disease progression. *Virology* 232:319–331.
- Krebs, F. C., Goodenow, M. M., Wigdahl, B. 1997. Neuroglial ATF/ CREB factors interact with the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Neurovirol.* 3 (Suppl. 1), S28–S32.
- Kuiken CL, de Jong JJ, Baan E, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. 1992. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype. *J Virol.* 66(9):5704.
- Ladias, J. A. 1994. Convergence of multiple nuclear receptor signaling pathways onto the long terminal repeat of human immunodeficiency virus-1. *J. Biol. Chem.* 269:5944–5951.
- Lee, E. S., Sarma, D., Zhou, H., Henderson, A. J. 2002. CCAAT/ enhancer binding proteins are not required for HIV-1 entry but regulate proviral transcription by recruiting coactivators to the long-terminal repeat in monocytic cells. *Virology* 299:20–31.

Lee, E. S., Zhou, H., Henderson, A. J. 2001. Endothelial cells enhance human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages through a C/EBP-dependent mechanism. *J. Virol.* 75:9703–9712.

Li, C. J., Wang, C., Friedman, D. J., Pardee, A. B. 1995. Reciprocal modulations between p53 and Tat of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5461–5464.

Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS. 1994. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 10(5):561-7.

Lu Y, Stenzel M, Sodroski JG, Haseltine WA. 1989. Effects of long terminal repeat mutations on human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol.* 63(9):4115-9.

Lu YC, Touzjian N, Stenzel M, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. 1990. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 64(10):5226-9.

Macian, F., Rao, A. 1999. Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol. Cell. Biol.* 19:3645–3653.

Mancebo HS, Lee G, Flygare J, Tomassini J, Luu P, Zhu Y, Peng J, Blau C, Hazuda D, Price D, Flores O. 1997. P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev.* 11(20):2633-44.

Marciniak RA, Sharp PA. 1991 HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *EMBO J.* 10(13):4189-96.

Marciniak RA, Sharp PA. 1991. HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *EMBO J.* 10(13):4189-96.

Margolis LB, Glushakova S, Grivel JC, Murphy PM. 1998. Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines. *J Clin Invest.* 101(9):1876-80.

Margolis, D. M., Somasundaran, M., Green, M. R. 1994. Human transcription factor YY1 represses human immunodeficiency virus type 1 transcription and virion production. *J. Virol.* 68:905–910.

Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, et al. 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science.* 265(5178):1587-90.

Marozsan, Andre J., Moore, Dawn M., Lobritz, Michael A., Fraundorf, Erika, Abraha, Awet, Reeves, Jacqueline D., Arts, Eric J. 2005. Differences in the Fitness of Two Diverse Wild-Type Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates Are Related to the Efficiency of Cell Binding and Entry. *J. Virol.* 79: 7121-7134



- Marzio G, Giacca M. 1999. Chromatin control of HIV-1 gene expression. *Genetica*. 106 (1-2):125-30.
- McAllister, J. J., Phillips, D., Millhouse, S., Conner, J., Hogan, T., Ross, H. L., Wigdahl, B. 2000. Analysis of the HIV-1 LTR NF-kappaB-proximal Sp site III: evidence for cell type-specific gene regulation and viral replication. *Virology* 274:262–277.
- Millhouse, S., Krebs, F. C., Yao, J., McAllister, J. J., Conner, J., Ross, H., Wigdahl, B. 1998. Sp1 and related factors fail to interact with the NF-kappaB-proximal G/C box in the LTR of a replication competent, brain-derived strain of HIV-1 (YU-2). *J. Neurovirol.* 4:312–323.
- Monteiro JP, Ferraro GA, Oliveira T, Goldani LZ, Kashima S, Alcantara LC, Morgado MG, Bou-Habib DC, Galvao-Castro B. 2007. Genetic and biologic characterization of HIV type 1 subtype C isolates from south Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23(1):135-43.
- Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves Jr I, Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvão-Castro B, Bongertz V, and the Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group, 1998. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J AIDS and Hum Retrovirology* 18:488-494.
- Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Neves Junior I, Costa CI, dos Santos VG, Linhares-de-Carvalho MI, Galvao-Castro B, Bongertz V. 1996. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. May-Jun;91(3):339-42.
- Morgado MG, Sabino E, Sphaer E, Bongertz V, Brigido L, Guimarães MDC, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JI, Hendry RM, Mayer A, 1994. Polymorphism in the V3 region on the envelope protein of HIV-1 in Brazil: divergence from prevalent North American/European subtype B strains and identification of newly described F subtype. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:569-76.
- Mouzaki, A., Doucet, A., Mavroidis, E., Muster, L., Rungger, D. 2000. A repression-derepression mechanism regulating the transcription of human immunodeficiency virus type 1 in primary T cells. *Mol. Med.* 6:377–390.
- Nabel G, Baltimore D. 1990. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*. Apr 16-22;326(6114):711-3. Erratum in: *Nature* 344(6262):178.
- Naghavi MH, Schwartz S, Sonnerborg A, Vahlne A. 1999. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 15(14):1293-303.

- Nicolini, A., Ajmone-Cat, M. A., Bernardo, A., Levi, G., Minghetti, L. 2001. Human immunodeficiency virus type-1 Tat protein induces nuclear factor (NF)-kappaB activation and oxidative stress in microglial cultures by independent mechanisms. *J. Neurochem.* 79:713–716.
- Nordheim, A. 1994. Transcription factors. CREB takes CBP to tango. *Nature* 370:177–178.
- O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael NL, White GC 2nd. 1997. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet.* 349(9060):1219.
- Orchard, K., Lang, G., Harris, J., Collins, M., Latchman, D. 1993. A palindromic element in the human immunodeficiency virus long terminal repeat binds retinoic acid receptors and can confer retinoic acid responsiveness on a heterologous promoter. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6:440–445.
- Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., Garcia-Martinez, L. F., Gaynor, R. B. 1995. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.* 69:3584–3596.
- Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl* Palella JF, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD and The HIV Outpatient Study Investigators, 1998. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med* 338: 853-860.
- Pantaleo G & Fauci AS, 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol* 13: 487-512.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 362(6418):355-8.
- Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, Daucher MB, Cohen OJ, Denis F, Biddison WE, Sekaly RP, Fauci AS. 1997. Accumulation of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes away from the predominant site of virus replication during primary infection. *Eur J Immunol.* 27(12):3166-73.
- Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res.* 28(3):663-8.
- Perelson AS, Essunger P, Ho DD. 1997. Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *AIDS.* 11 Suppl A:S17-24.

- Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ. 1993. A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* 12(9):3551-8
- Perrin L & Telenti A, 1998. HIV treatment failure: testing for HIV resistance in clinical practice. *Science* 280:1871-1873.
- Persidsky Y, Gendelman HE. 2003. Mononuclear phagocyte immunity and the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol.* 74(5):691-701.
- Phan KO, Callahan ME, Vanichseni S, Hu DJ, Raktham S, Young N, Choopanya K, Mastro TD, Subbarao S, 2000. A comparison of full-length glycoprotein 120 from incident HIV type 1 subtype E and B infections in Bangkok injecting drug users with prototype E and B strains that are components of a candidate vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20;16(14):1445-50.
- Poluektova L, Gorantla S, Faraci J, Birusingh K, Dou H, Gendelman HE. 2004. Neuroregulatory events follow adaptive immune-mediated elimination of HIV-1-infected macrophages: studies in a murine model of viral encephalitis. *J Immunol.* 172(12):7610-7.
- Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817Y818.
- Posada, R., Pettoello-Mantovani, M., Sieweke, M., Graf, T., Goldstein, H. 2000. Suppression of HIV type 1 replication by a dominant-negative Ets-1 mutant. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:1981–1989.
- Potts K, Kalish M, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves C, Badaró R, Suleiman J, Ferreira O, Schochetman G, Jonhson CY, Ho J. 1993. Genetic heterogeneity of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 7:1191-1197.
- Rabbi, M. F., Saifuddin, M., Gu, D. S., Kagnoff, M. F., Roebuck, K. A. 1997. U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat contains TRE-like cAMP-responsive elements that bind both AP-1 and CREB/ATF proteins. *Virology* 233:235–245.
- Rabson, A. B., Lin, H. C. 2000. NF-kappa B and HIV: linking viral and immune activation. *Adv. Pharmacol.* 48:161–207.
- Ramirez AE, Martin C, Soriano V, Alcamí J, Holguin A. 2007 Genetic analysis of the long terminal repeat (LTR) promoter region in HIV-1-infected individuals with different rates of disease progression. *Virus Genes.* 34(2):111-6.
- Reddy RT, Achim CL, Sirko DA, Tehranchi S, Kraus FG, Wong-Staal F, Wiley CA. 1996. Sequence analysis of the V3 loop in brain and spleen of patients with HIV encephalitis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 12(6):477-82.

- Reynolds, L., Ullman, C., Moore, M., Isalan, M., West, M. J., Clapham, P., Klug, A., Choo, Y. (2003) Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1615–1620.
- Richman DD, Havlir D, Corbeil J, Looney D, Ignacio C, Spector SA, Sullivan J, Cheeseman S, Barringer K, Pauletti D, et al. 1994. Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J Virol.*68(3):1660-6.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 288(5463):55-6.
- Robichaud, G. A., Barbeau, B., Fortin, J. F., Rothstein, D. M., Tremblay, M. J. 2002. Nuclear factor of activated T cells is a driving force for preferential productive HIV-1 infection of CD45RO-expressing CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* 277:23733–23741.
- Rohr O, Aunis D, Schaeffer E. 1997. COUP-TF and Sp1 interact and cooperate in the transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human microglial cells. *J Biol Chem.* 272(49):31149-55.
- Rohr O, Marban C, Aunis D, Schaeffer E. 2003. Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *J Leukoc Biol.* 74(5):736-49. Epub 2003 Aug 11.
- Rohr, O., Sawaya, B. E., Lecestre, D., Aunis, D., Schaeffer, E. 1999a Dopamine stimulates expression of the human immunodeficiency virus type 1 via NF-kappaB in cells of the immune system. *Nucleic Acids Res.* 27:3291–3299.
- Rohr, O., Schwartz, C., Aunis, D., Schaeffer, E. 1999b. CREB and COUP-TF mediate transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 genome in Jurkat T cells in response to cyclic AMP and dopamine. *J. Cell. Biochem.* 75:404–413.
- Rohr, O., Schwartz, C., Hery, C., Aunis, D., Tardieu, M., Schaeffer, E. 2000. The nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor interacts with HIV-1 Tat and stimulates viral replication in human microglial cells. *J. Biol. Chem.* 275:2654–2660.
- Roof, P., Ricci, M., Genin, P., Montano, M. A., Essex, M., Wainberg, M. A., Gagnon, A., Hiscott, J. 2002. Differential regulation of HIV-1 clade-specific B, C, and E long terminal repeats by NF-kappaB and the Tat transactivator. *Virology* 296:77–83.
- Ross HL, Gartner S, McArthur JC, Corboy JR, McAllister JJ, Millhouse S, Wigdahl B. 2001. HIV-1 LTR C/EBP binding site sequence configurations preferentially encountered in brain lead to enhanced C/EBP factor binding and increased LTR-specific activity. *J Neuroviro.* 7(3):235-49.

Roulston, A., Lin, R., Beauparlant, P., Wainberg, M. A., Hiscott, J. 1995. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 and cytokine gene expression in myeloid cells by NF-kappa B/Rel transcription factors. *Microbiol. Rev.* 59:481–505.

Ruocco, M. R., Chen, X., Ambrosino, C., Dragonetti, E., Liu, W., Mallardo, M., De Falco, G., Palmieri, C., Franzoso, G., Quinto, I., Venuta, S., Scala, G. 1996. Regulation of HIV-1 long terminal repeats by interaction of C/EBP(NF-IL6) and NF-kappaB/Rel transcription factors. *J. Biol. Chem.* 271:22479–22486.

Sabino E, Sphaer E, Morgado MG, Borber BT, Dias RS, Bongertz V, Cavalante S, Galvão-Castro B, Mullins JI, Mayer A, 1994. Identification of an HIV-1 proviral genome recombinant between subtype B and F in PBMCs obtained from an individual in Brazil. *J Virol* 68:6340-6346.

Sá-Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, Janini LM. 2005. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 21(2):145-51.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406Y425

Salemi M, Lamers SL, Yu S, de Oliveira T, Fitch WM, McGrath MS. 2005. Phylodynamic analysis of human immunodeficiency virus type 1 in distinct brain compartments provides a model for the neuropathogenesis of AIDS. *J Virol.* 79(17):11343-52.

Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1423-5.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382(6593):722-5.

Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC. 2006. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol.* 6(5):368-77. Epub 2006 Mar 7.

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

Sawadogo M. 1988. Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J Biol Chem.* 263(24):11994-2001.

Sawaya, B. E., Rohr, O., Aunis, D., Schaeffer, E. 1996 Regulation of human immunodeficiency virus type 1 gene transcription by nuclear receptors in human brain cells. *J. Biol. Chem.* 271:22895–22900.

Schmidtayerova H, Alfano M, Nuovo G, Bukrinsky M. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level. *J Virol.* 72(6):4633-42.

Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus population. *J Virol.* 66(3):1354-60.

Schwartz C, Catez P, Rohr O, Lecestre D, Aunis D, Schaeffer E. Functional Interactions between C/EBP, Sp1, and COUP-TF Regulate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Transcription in Human Brain Cells. *J. Virol.* 2000 74: 65-73.

Scriba TJ, de Villiers T, Treurnicht FK, zur Megede J, Barnett SW, Engelbrecht S, van Rensburg EJ. 2002. Characterization of the South African HIV type 1 subtype C complete 5' long terminal repeat, *nef*, and regulatory genes. *AIDS Res Hum Retroviruses*18(2):149-59.

Seth, A., Hodge, D. R., Thompson, D. M., Robinson, L., Panayiotakis, A., Watson, D. K., Papas, T. S. 1993. ETS family proteins activate transcription from HIV-1 long terminal repeat. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:1017–1023.

Shaffer N, Chuachoowong R, Mock PA, Bhadrakom C, Siriwasin W, Young NL, Chotpitayasunondh T, Chearskul S, Roongpisuthipong A, Chinayon P, Karon J, Mastro TD, Simonds RJ. 1999. Short-course zidovudine for perinatal HIV-1 transmission in Bangkok, Thailand: a randomised controlled trial. Bangkok Collaborative Perinatal HIV Transmission Study Group. *Lancet.* 353(9155):773-80.

Sheridan PL, Mayall TP, Verdin E, Jones KA. 1997. Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro *Genes Dev.* 15;11(24):3327-40.

Sheridan, P. L., Sheline, C. T., Cannon, K., Voz, M. L., Pazin, M. J., Kadonaga, J. T., Jones, K. A. 1995. Activation of the HIV-1 enhancer by the LEF-1 HMG protein on nucleosome-assembled DNA in vitro. *Genes Dev.* 9:2090–2104.

Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, K. 1994. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:405–455.

- Sieweke, M. H., Tekotte, H., Jarosch, U., Graf, T. 1998. Cooperative interaction of ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J.* 17:1728–1739.
- Simmonds P, Balfe P, Ludem CA, Bishop JO, Leigh-Brown AJ, 1990. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* 64: 5840-5850.
- Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragost S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F & Brun-Vézinet F, 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Med* 4:1032-1037.
- Smit TK, Brew BJ, Tourtellotte W, Morgello S, Gelman BB, Saksena NK. 2004. Independent evolution of human immunodeficiency virus (HIV) drug resistance mutations in diverse areas of the brain in HIV-infected patients, with and without dementia, on antiretroviral treatment. *J Virol.* Sep;78(18):10133-48.
- Sodroski JG, Goh WC, Rosen CA, Salahuddin SZ, Aldovini A, Franchini G, Wong-Staal F, Gallo RC, Sugamura K, Hinuma Y, et al. 1985. Trans-Activation of the human T-cell leukemia virus long terminal repeat correlates with expression of the x-lor protein. *J Virol* 55(3):831-5.
- Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, Wasi C, Vithayasai V, Apichartpiyakul C, Auewarakul P, Pena Cruz V, Chui D-S, Osathanondh R, Mayer K, Lee TH, Essex M. 1996. HIV-1 Langerhans'cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 271:1291-1293.
- Subler, M. A., Martin, D. W., Deb, S. 1992. Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J. Virol.* 66:4757–4762.
- Subler, M. A., Martin, D. W., Deb, S. 1994. Activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by transforming mutants of human p53. *J. Virol.* 68:103–110.
- Sune C, Garcia-Blanco MA. 1995. Sp1 transcription factor is required for in vitro basal and Tat-activated transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol.* 69(10):6572-6.
- Takeuchi Y, Akutsu M, Murayama K, Shimizu N, Hoshino H. 1991. Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the *env* gene. *J Virol.* 65(4):1710-8.
- Tesmer, V. M., Bina, M. 1996. Regulation of HIV-1 gene expression by NF-IL6. *J. Mol. Biol.* 262:327–335.
- Tesmer, V. M., Rajadhyaksha, A., Babin, J., Bina, M. 1993. NF-IL6- mediated transcriptional activation of the long terminal repeat of the human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7298–7302.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

Thomson MM, Delgado E, Herrero I, Villahermosa ML, Vazquez-de Parga E, Cuevas MT, Carmona R, Medrano L, Perez-Alvarez L, Cuevas L, Najera R. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 2002a; 83:107-19.

Thomson MM, Villahermosa ML, Vazquez-de-Parga E, Cuevas MT, Delgado E, Manjon N, Medrano L, Perez-Alvarez L, Contreras G, Carrillo MG, Salomon H, Najera R. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 2000; 14:897-9.

Trillo-Pazos G, Diamanturos A, Rislove L, Menza T, Chao W, Belem P, Sadiq S, Morgello S, Sharer L, Volsky DJ. 2003. Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain Pathol.* 13(2):144-54.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Kato, T., Yasuda, S., Matsuda, Z., Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Akagawa, K., Cho, M. W., Takemori, T. 2000. Transcriptional regulation of HIV-1 LTR during antigen-dependent activation of primary T cells by dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 67:432-440.

Turchan J, Pocernich CB, Gairola C, Chauhan A, Schifitto G, Butterfield DA, Buch S, Narayan O, Sinai A, Geiger J, Berger JR, Elford H, Nath A. 2003. Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants. *Neurology.* 60(2):307-14.

Turpin, J. A., Buckheit Jr., R. W., Derse, D., Hollingshead, M., Williamson, K., Palamone, C., Osterling, M. C., Hill, S. A., Graham, L., Schaeffer, C. A., Bu, M., Huang, M., Cholody, W. M., Michejda, C. J., Rice, W. G. 1998. Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:487-494.

Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ. 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol.* 7(4):144-9.

Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, Pavlakis GN. 1998. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(15):8886-91.

Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E. 1996. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J.* 15(5):1112-20.



Van Lint C. 2000. Role of chromatin in HIV-1 transcriptional regulation. *Adv Pharmacol.* 48:121-60.

van Opijnen T, Jeeninga RE, Boerlijst MC, Pollakis GP, Zetterberg V, Salminen M, Berkhout B. 2004b. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes have a distinct long terminal repeat that determines the replication rate in a host-cell-specific manner. *J Virol* 78(7):3675-83.

van Opijnen T, Kamoschinski J, Jeeninga RE, Berkhout B. 2004a. The human immunodeficiency virus type 1 promoter contains a CATA box instead of a TATA box for optimal transcription and replication. *J Virol.* 78(13):6883-90.

Verhoef K, Sanders RW, Fontaine V, Kitajima S, Berkhout B. 1999. Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat promoter by conversion of an NF-kappaB enhancer element into a GABP binding site. *J Virol*73(2):1331-40.

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

Virelizier JL. 1998. Alternative, cytokine-mediated host defense mechanisms against HIV infection: the concept of self-limitation of HIV replication. *AIDS.*;12 Suppl A:S141-6.

Waterman, M. L., Jones, K. A. 1990. Purification of TCF-1 alpha, a T-cell-specific transcription factor that activates the T-cell receptor C alpha gene enhancer in a context-dependent manner. *New Biol.* 2:621-636.

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 12;373(6510):117-22.

Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrit JT. 1996. Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science.* 272(5261):537-42.

Xia X, Xie Z 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92: 371-3.

Xiao L, Rudolph DL, Owen SM, Spira TJ, Lal RB. 1998. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXC-chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. *AIDS.* 12(13):F137-43.

Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T. 2002. Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Res.* 53:19-34.

Yedavalli, V. S., Benkirane, M., Jeang, K. T. 2003. Tat and trans-activation- responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *J. Biol. Chem.* 278:6404-6410.

Yoon JB, Li G, Roeder RG. 1994. Characterization of a family of related cellular transcription factors which can modulate human immunodeficiency virus type 1 transcription in vitro. *Mol Cell Biol.* 14(3):1776-85.

York-Higgins D, Cheng-Mayer C, Bauer D, Levy JA, Dina D. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 cellular host range, replication, and cytopathicity are linked to the envelope region of the viral genome. *J Virol.* 64(8):4016-20.

Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H. 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med.* 3(12):1369-75.

Zeichner SL. 1994. The molecular biology of HIV. Insights into pathogenesis and targets for therapy. *Clin Perinatol.* 21(1):39-73.

Zheng J, Ghorpade A, Niemann D, Cotter RL, Thylin MR, Epstein L, Swartz JM, Shepard RB, Liu X, Nukuna A, Gendelman HE. 1999. Lymphotropic virions affect chemokine receptor-mediated neural signaling and apoptosis: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia. *J Virol.* 73(10):8256-67.

Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection.

Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB, Price DH. 1997. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* 11(20):2622-32.

Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. 1997. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med.* 3(1):23-36.

# ANEXOS

## **ANEXO 1**

# **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



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

## Termo de Consentimento Informado

Os Pesquisadores, Geraldo Argolo Ferraro, Luciano Zubaram Goldani, Mariza Gonçalves Morgado e Bernardo Galvão Castro da Fundação Oswaldo Cruz e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, estão desenvolvendo uma pesquisa para caracterizar o HIV (vírus que causa AIDS) do subtipo C no Brasil.

Estes estudos podem fornecer informações valiosas para o melhor combate da epidemia de AIDS, e sua colaboração será muito importante para este objetivo. Para este estudo será necessário a coleta de 20 ml de sangue através de punção venosa, utilizando seringas e agulhas estéreis e descartáveis.

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

- 1- Um dos pesquisadores irá fazer uma breve entrevista, e perguntará alguns aspectos da sua vida pessoal. Estes dados serão anotados de forma confidencial, garantindo a preservação de sua identidade. Mesmo participando, você poderá se recusar a fornecer algumas informações solicitadas.
- 2- Serão coletados 20ml de sangue do seu braço, o equivalente ao volume de aproximadamente 03 (três) colheres de sopa.

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

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

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

Nome:

Local:

Data:

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Telefone dos pesquisadores responsáveis: Luciano Zubaran Goldani: 051-33168676, Geraldo Ferraro e Bernardo Galvão Castro: 071-3568822 R 213, Mariza Morgado: 021-25984327.

## **ANEXO 2**

# **QUESTIONÁRIO DE PESQUISA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS**



Questionário de pesquisa Sequenciamento do HIV-1 do subtipo C, análise comparativa do papel dos elementos de transcrição da região LTR e comportamento biológico dos subtipos não B prevalentes no Brasil	Número de registro
--	--------------------

Nome do Paciente	Data de nascimento
------------------	--------------------

<b>Idade</b>	<b>Sexo</b> M-masculino F-Feminino I- Ignorado	<b>Raça/Cor</b> 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 6- Ignorada	<b>Escolaridade (anos de estudo)</b> 1-Nenhuma; 2-de 1 a 3; 3-4 a 7; 4-8 a 11; 5-12 ou mais; 6-não se aplica; 9- ignorado
--------------	--	---	---

Nome da mãe	Idade
-------------	-------

Endereço: Lograduouro(Rua, Avenida, Bairro...)	Nº
--	----

Complemento: (apto, casa...)	CEP
------------------------------	-----

Telefones	Ponto de referência
-----------	---------------------

Município de residência	Código do IBGE	Naturalidade
-------------------------	----------------	--------------

Ocupação/Ramo de Atividade Econômica
--------------------------------------

Grau de Instrução 1- 1º Grau incompleto 2- 1º Grau completo 3- 2º Grau incompleto 4- 3º Grau
--

Renda Familiar
----------------

Relações Sexuais 1- Só com homens 2-Só com mulheres 3- Com homens e mulheres 4- Não se aplica 9- Ignorado	Relações sexuais com indivíduo sabidamente HIV+/AIDS. 1-sim 2-não 3-não se aplica 9-ignorado
---	--

Sobre a parceria sexual 1-sim 2-não 9-ignorado	
( ) Múltiplos parceiros	( ) Parceiro(a) com múltiplos parceiros
( ) Parceiro(a) heterossexual	( ) Parceiro(a) usuário de drogas injetáveis
( ) Parceiro(a) bissexual	( ) Parceiro(a) recebeu transfusão de sangue
( ) Parceiro(a) homossexual	

Usuário de drogas 1-sim 2-não 9-ignorado injetáveis	História de transfusão de sangue/derivados 1-sim 2-não 9-ignorado
--	---

No caso de haver história de transfusão de sangue/derivados		
Data da transfusão	Instituição/Endereço	UF

Teste laboratorial de infecção para HIV 1-sim 2-não 3-não se aplica	Data	Contagem de linfócitos T CD4+
		Data da contagem

Desenvolvimento de doenças oportunistas

Unidade de Saúde onde realiza o tratamento

Médico responsável

Local e Data da entrevista

Assinatura do entrevistado

Observações

Assinatura do entrevistador



# 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](#)