

**NANCY ALVES DE LIMA GOUVEA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM  
INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO RECENTE**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Microbiologia  
do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do  
título de Mestre em  
Microbiologia.

Orientador:  
Dr. Ricardo Sobhie Diaz

**SÃO PAULO**  
2002



DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

---

.ICB Gouvea, Nancy Alves de Lima.

MM Diversidade genética do HIV-1 em indivíduos com infecção recente / Nancy  
719d Alves de Lima Gouvea. -- São Paulo, 2002.  
.003

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo. Departamento de Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Linha de pesquisa: Diversidade genética do HIV.

Orientador: Diaz, Ricardo Sobhie.

Versão do título para o inglês: Genetic diversity of HIV-1 in individuals with  
recent infection.

Descritores: 1. HIV 2. Diversidade genética do HIV 3. Região V<sub>3</sub> da GP 120

ICB/SBIB/167/2002

---

Candidato(a): Nancy Alves de Lima Gouvêa.

Título da Dissertação: Diversidade genética do HIV-1 em indivíduos com infecção recente.

---

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 26.1.02.03, considerou o(a) candidato(a):

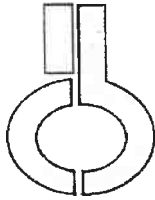
**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

1) Examinador(a)                     D. J. Araújo                    

2) Examinador(a)                     Elisete J. V.                    

3) Presidente                     [Assinatura]                    

---



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Líneu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438  
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

São Paulo, 30 de abril de 2002

**PARECER 281/CEP**

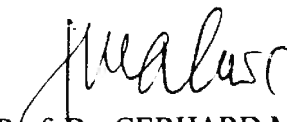
Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua vigésima oitava reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO RECENTE".

Informo que, após análise do projeto, esta comissão resolveu **acatar o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo**".

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. GERHARD MALNIC  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.  
NANCY ALVES DE LIMA GOUVEA  
Departamento de Microbiologia do ICB/USP

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Retrovirologia da Disciplina de Doenças Infecciosas da EPM- UNIFESP e contou com o Apoio Financeiro da Capes-CNPq.**

# **DEDICATÓRIA**

**À minha mãe, exemplo de  
perseverança para vencer os obstáculos.**

**Aos pacientes que colaboraram com o  
único propósito de um futuro melhor.**

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus autor da minha vida, que em todos momentos me sustentou, toda honra, toda glória e todo louvor .**

**Ao Dr. Ricardo Sobhie Diaz, pela confiança depositada, por seu apoio e orientação segura, pelas sugestões e pela sua grande experiência na área, os quais foram fundamentais na realização deste trabalho.**

**Em especial ao meu esposo Celso, presente em todos os momentos desde o início deste trabalho que nunca me deixou desanimar mesmo nos momentos mais difíceis e sempre me incentivou permanecer nesta caminhada. Obrigada pelo seu amor, companheirismo, apoio e compreensão.**

**À Maria Cecília A. Sucupira pelo auxílio e dicas enriquecedoras na elaboração deste trabalho.**

**Ao Dr. José Roberto Feresin Moraes e Dra. Maria Elisa Hue Moraes, pelo apoio durante o processo de minha carreira profissional e pelos primeiros ensinamentos na área de Biologia Molecular.**

**À Dra. Inara Espinelli Lemes da Costa, pela receptividade em seu laboratório e pelas valiosas sugestões importantes no dimensionamento deste trabalho.**

**Ao secretário Charlys, do Laboratório de Retrovirologia, pela constante ajuda durante a execução deste trabalho.**

**Aos funcionários da Biblioteca do ICB II- USP por todo levantamento bibliográfico realizado.**

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1-INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Histórico do HIV-1.....	1
1.2 Estrutura viral.....	3
1.3 Organização genômica.....	5
1.4 Ciclo replicativo.....	8
1.5 Diversidade genética do HIV-1.....	10
<b>2-OBJETIVO</b> .....	16
<b>3-MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1 Casuística.....	17
3.2 Identificação das amostras.....	17
3.3 Extração do ácido nucléico do HIV-1.....	18
3.4 Reação em cadeia pela polimerase(PCR).....	19
3.5 Detecção dos produtos amplificados.....	20
3.6 Purificação dos produtos das PCRs.....	20
3.7 Reação de seqüenciamento.....	20
3.8 Detecção dos fragmentos seqüenciados.....	21



3.9 Análise do seqüenciamento.....	21
3.10 Alinhamento das seqüências.....	21
<b>4-RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>5-DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6-CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>36</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ARV	“AIDS-Associated Retrovirus” ou retrovírus associado à AIDS
bp	pares de base
C1-C5	regiões constantes da glicoproteína gp 120
CCR5	co-receptor. Participa do processo de entrada do vírus na célula hospedeira
cDNA	DNA complementar
CD4	Marcador de superfície de linfócito
CMV	Citomegalovirus
COAS	Centro de testagem e aconselhamento de Santos
CRF	Forma Recombinante Circulante
d	distância
ddI	2’3’- dideoxinosina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	desoxinucleosídeo trifosfato
dS	mutação sinônima
dN	mutação não sinônima
DP	desvio padrão
DV	Diversidade genética
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EBV	Vírus Epstein Bar
Elisa	Ensaio imunoenzimático
<i>env</i>	gene que codifica as proteínas do envelope do HIV
<i>gag</i>	gene que codifica as proteínas estruturais
gp	glicoproteína
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
kb	kilobase
KDa	kilodalton

LTR	“Long terminal repeat” região promotora do HIV
M	Molar
mM	mili molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	mililitro
NC	nucleocapsídeo
NCI	Vírus não indutor de sincício
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Nested-PCR	Reação em cadeia da polimerase em duas etapas
RNA	ácido ribonucléico
RT	Transcriptase reversa
SI	Vírus indutor de sincício
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>tat</i>	Transativador transcricional do HIV-1
TBE	Tris borato EDTA
V3	Região hipervariável 3 da proteína de superfície do HIV-1
V	Volts
Vs	versus
µg	micrograma
µl	microlitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Estrutura simplificada do HIV-1.....	4
<b>Figura 2-</b> Mapa genômico do HIV-1.....	7
<b>Figura 3-</b> Ciclo replicativo do HIV-1.....	9
<b>Figura 4a-</b> Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região V3 da gp120.....	24
<b>Figura 4b-</b> Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região V3 da gp120.....	25
<b>Figura 4c-</b> Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região V3 da gp120.....	26
<b>Figura 5-</b> Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região V3 da gp120.....	27
<b>Figura 6-</b> Esquema representativo da árvore filogenética da região <i>env</i> .....	28

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1-</b> Estimativo das substituições sinônimas e não sinônimas.....	29
<b>Tabela 2-</b> Cálculo da distância entre a matriz.....	29

## RESUMO

O HIV desenvolve grande diversidade genética (DV) como consequência do escape imune. Análise do HIV durante a infecção recente demonstra seqüências relativamente homogêneas genotipicamente e fenotipicamente. O objetivo deste trabalho foi descrever a DV do HIV-1 entre homens vs. mulheres. Foram analisadas cinco amostras de homens e cinco de mulheres, ambos com infecção recente pelo HIV-1. Foi extraído DNA proviral e amplificado por PCR com diluição limitante final para assegurar-se que os amplicons fossem originados de uma única molécula de DNA (clone), sendo obtidos cinco clones de cada amostra. A região V<sub>3</sub> da gp120 foi seqüenciada e as seqüências de nucleotídeos foram alinhadas, traduzidas em aminoácidos e feita filogenia. Foi calculada a DV intra-paciente e estimado o índice de substituições sinônimas e não sinônimas (DS/DN). Foi detectada pequena DV, confirmando a homogeneidade tanto nos homens como nas mulheres (<1%) e o valor da taxa Ds/Dn foi <1. A filogenia demonstrou segregação dos clones em determinados ramos da árvore filogenética. Os dados indicam que não existem importantes diferenças na população de vírus transmitidos entre mulheres e homens com relação à DV do HIV-1 na região V3 de brasileiros infectados pelo HIV-1 clade B.

## ABSTRACT

Molecular studies show that although HIV-1 genetic diversity is very small during primary infection (bottleneck transmission), viruses evolve over time presenting a cumulative genetic diversity of 1%/year. A recent study conducted in Africa suggested that viruses present in primary infection in women are more heterogeneous than in men. The objective of this study was to describe the HIV genetic diversity in recently infected males and females in Brazil. Five samples from each males and females were analysed. Purified DNA were subjected to end point PCR for V3 region and sequenced. The analyzes of the alignment indicated that there was no genetic diversity in sequences during this period of infection, confirming the homogeneity in both male and female samples (<1%), and dS/dN value was <1. Phylogenetic analyzes showed segregation of clones in specific branches of the tree. We concluded that there were no important differences in transmitted viruses present in men and women, and a bottleneck does occur in these clade B infected Brazilian group.

# 1-INTRODUÇÃO

## 1.1-Histórico do HIV-1

A relação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) com um retrovírus foi observada em 1983 por pesquisadores do Instituto Pasteur (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983), que isolaram um vírus a partir do linfonodo de um homem com linfadenopatia persistente. Como o aumento de linfonodo era comum em várias infecções virais, muitos médicos suspeitavam que essa linfadenopatia fosse resultado da infecção por vírus humanos conhecidos, tais como, o vírus Epstein-Barr (EBV) ou Citomegalovírus (CMV). Ademais, este vírus compartilhava muitas das características com os vírus da leucemia de células T humanas, o HTLV e foi, portanto, classificado entre o grupo de retrovírus (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983).

No início de 1984, foi relatado o isolamento de um retrovírus humano, diferente do HTLV-I e II, denominado HTLV-III (GALLO *et al.*, 1984; POPOVIC *et al.*, 1984; SARNGADHARAN *et al.*, 1984; SCHUPBACH *et al.*, 1984). Este vírus foi isolado de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com AIDS. As propriedades linfotrópicas e citopáticas do vírus foram percebidas e relatou-se a reação cruzada do HTLV-III com algumas proteínas do HTLV-I e HTLV-II, particularmente a proteína do capsídeo p24 (GALLO *et al.*, 1984).

LEVY *et al.* (1984), isolaram um retrovírus, que denominaram ARV (Vírus Associado à AIDS), a partir de pacientes com AIDS pertencentes a diferentes grupos de risco conhecidos, sintomáticos e assintomáticos. A constatação do ARV em indivíduos assintomáticos indicou a existência do estado de portador para o vírus da AIDS. O ARV



mostrava reação cruzada com a cepa LAV (BRU) francesa, em ensaios de imunofluorescência (LEVY *et al.*, 1984) e também replicava em culturas de PBMC, com ação citolítica sobre linfócitos CD4. Portanto, os três retrovírus, isolados quase simultaneamente, tinham características similares. A infecção por estes vírus, como descrito em 1984, não estava limitada a pacientes com AIDS, pois foram isolados também de pacientes com outras condições clínicas, como linfadenopatias.

Em pouco tempo, os três vírus (LAV, HTLV-III e ARV), foram reconhecidos como membros de um mesmo grupo de retrovírus e classificados como lentivírus. Entretanto, em 1986 o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus recomendou que fosse dado ao vírus da AIDS o nome de Vírus da Imunodeficiência Humana- HIV (COFFIN *et al.*, 1986) por este possuir propriedades distintas do HTLV.

O HIV-1 foi subsequenteiramente isolado do sangue de vários pacientes com diversas formas evolutivas da AIDS, bem como, de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sãos. A difusão e transmissão desse agente foram estudadas e sua associação com a AIDS e doenças relacionadas foi comprovada de forma irrefutável (LEVY *et al.* 1985b; SALAHUDDIN *et al.*, 1985).

## 1.2-Estrutura viral

O HIV-1 é classificado de acordo com sua morfologia, organização genômica e caráter patogênico como pertencente à sub-família lentiviridae (COFFIN, 1992).

A estrutura viral de um lentivirus é esférica com diâmetro aproximado de 100µm com nucleocapsídeo cilíndrico no interior do envoltório derivado da membrana celular do hospedeiro. Internamente ao nucleocapsídeo, encontra-se o genoma viral formado por duas fitas simples de RNA , não segmentadas e polaridade positiva. (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1993).

O HIV é um vírus envelopado, como os demais retrovírus, com uma membrana lipídica originária da membrana externa da célula hospedeira, contendo 72 capsômeros formados por (trímeros ou tetrâmeros) de glicoproteínas do envelope. O envelope é formado pelas gp120 e gp41, ambas derivadas da glicoproteína precursora gp160. GELDERBLOM *et al.*, 1988; McCLUNE *et al.*, 1988; OZEL *et al.*, 1988; PINTER *et al.*, 1989; EARL *et al.*, 1990; WEISS *et al.*, 1990). A gp120 é uma glicoproteína de superfície e a gp41 é uma proteína transmembrânica, responsáveis pela ligação do vírus na célula hospedeira CD4 e nos co-receptores, presentes na membrana celular dos linfócitos T auxiliares e macrófagos (DENG *et al.*, 1996).

Internamente à membrana, localiza-se a matriz protéica formada pela proteína p17, essencial para a integridade do vírion (GELDERBOLM *et al.*, 1989; GENDELMAN *et al.*, 1989). A porção externa da gp41 e parte da p17 também reagem com anticorpos neutralizantes (SARIN *et al.*, 1986; CHANH *et al.*, 1986; NAYLOR *et al.*, 1987; DALGLEISH *et al.*, 1988).

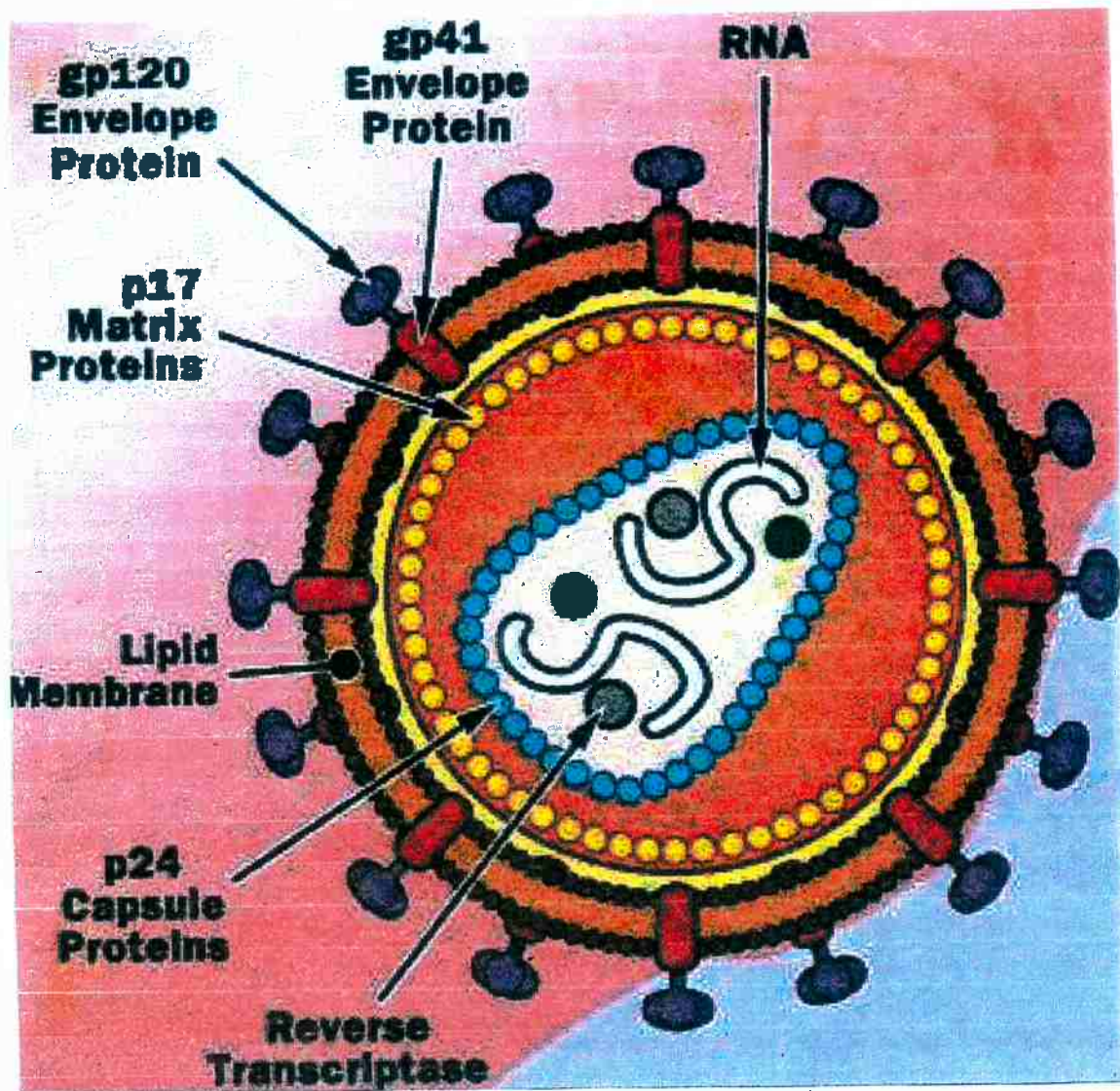


Figura 1- Estrutura simplificada do HIV.

### 1.3- Organização Genômica

O gene *gag* codifica a proteína p55 precursora da proteína que forma o capsídeo viral p24, a proteína de matriz p17 e outras que compõem o nucleocapsídeo viral p6/p9 (RATNER *et al.*; 1985). Uma vez no sítio de formação da partícula viral, o precursor *gag* facilita o empacotamento de outros componentes virais. O precursor *gag* tem a habilidade de se associar com outras poliproteínas, bem como com *gag/pol* via ligações não covalentes, pré-requisito para formação do vírion e é responsável pelo empacotamento do RNA genômico viral através da parte do NC da poliproteína que interage com a extremidade 5' do genoma viral, onde está localizado o sinal de empacotamento do ácido nucléico.

A proteína precursora codificada pelo gene *pol* é clivada em produtos que irão constituir as enzimas virais; transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR). A transcriptase reversa é uma enzima capaz de copiar o RNA viral em uma dupla fita de DNA, além de ter atividade de RNase H necessária no processo da síntese do DNA proviral. A integrase insere a cópia do DNA proviral no genoma da célula hospedeira, formando o provírus. A protease cataliza a formação da estrutura de um novo vírus clivando a poliproteína formada no final do processo. (VARMUS & SWANSTROM, 1985; PANGANIBAN & FIORE, 1988).

O gene *env* codifica a gp do env, gp160 que é composta da gp120 e gp41 e gp41 (LUCIW & LEUNG, 1992; McCUNE *et al.*, 1988). Dentre os genes acessórios estão:

1) gene *tat* que codifica a primeira proteína de regulação. *Tat* é um transativador viral potente, essencial para a replicação viral *in vitro* e *in vivo* (SHERIDAN *et al.*, 1991).

2) gene *rev* codifica a proteína de regulação denominada Rev, essencial para replicação viral. Essa proteína atua após a transcrição. Promove o transporte das moléculas de RNAm do núcleo para o citoplasma. Atua na tradução no citoplasma e na razão entre o RNAm processado e não processado, através da ligação nos Elementos de Resposta a Rev (RRE) nas poliproteínas transcritas (CULLEN & GREENE, 1989; POMERANTZ *et al.*, 1992).

3) gene *nef* codifica a proteína citoplasmática Nef, que se liga à superfície interna da membrana plasmática. Esta proteína não é essencial para a replicação viral. Nef reduz o nível da expressão do receptor CD4 na superfície das células, inibindo a re-infecção das células e facilitando a disseminação do vírus (DELASSUS *et al.*, 1991). Outros dados sugerem que a *nef* possa aumentar a atividade de fatores de transcrição, como NF- Kappa B, facilitando a replicação do vírus diretamente, através do LTR (CULLEN, 1994; JANVIER *et al.*, 2000). Demonstrou-se que vírus com o gene *nef* deletado são menos virulentos (LEARMONT *et al.*, 1995).

Os genes de expressão tardia *vif* e *vpu* dão origem a duas proteínas, com os mesmos nomes. *Vif* facilita a transmissão do HIV, aumentando a infectividade das partículas de 100 a 1000 vezes, mas não é absolutamente essencial para a replicação viral. *Vpu* aumenta a taxa de liberação do vírus da célula infectada, facilitando a maturação e montagem do vírus.

*Vpu* não está presente no HIV-2 e no SIV (Vírus da Imunodeficiência do Símio) (JANVIER *et al.*, 2000).

O HIV-2 e o SIV codificam ainda outras proteínas acessórias. O gene *vpr* codifica a proteína Vpr, não essencial para a sua replicação *in vitro*, o que parece atuar precocemente durante o ciclo viral como um transativador fraco do LTR do HIV e de outros promotores (GIBBS & DESROSIERS, 1994).

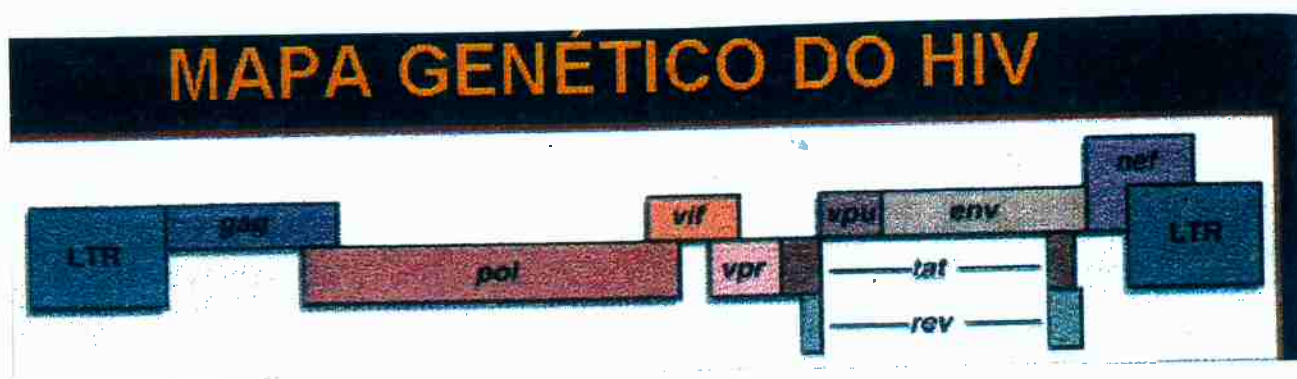


Figura- 2 Estrutura genômica do HIV-1.

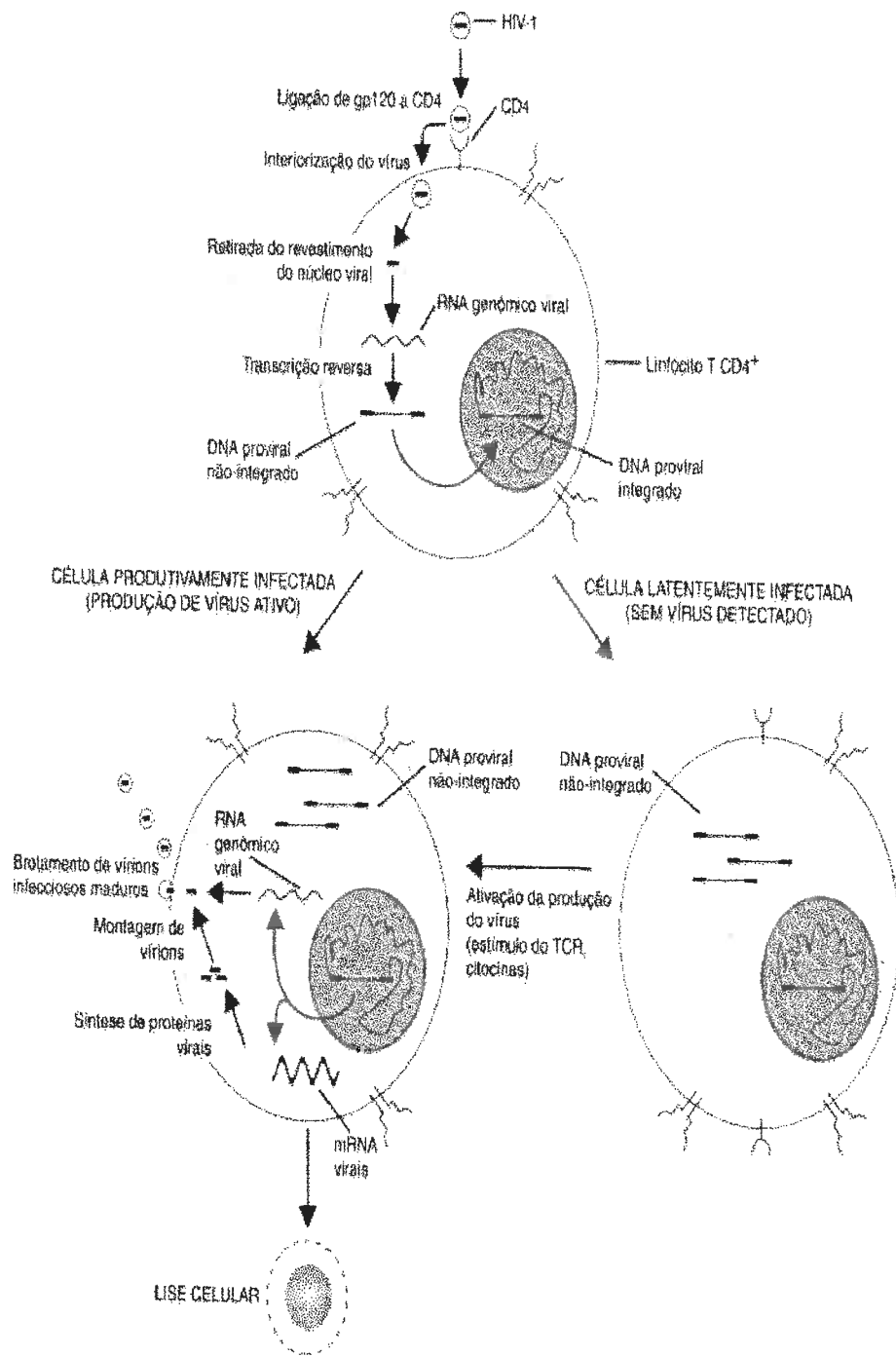
#### 1.4- Ciclo Replicativo

Os retrovírus são vírus RNA que, através da enzima DNA polimerase RNA dependente (transcriptase reversa), são capazes de copiar seu genoma RNA em uma fita dupla de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira (BALTIMORE, 1970; TEMIN & MIZUTANI, 1970).

O HIV inicia o processo de infecção através da interação com os receptores CD4 presentes na superfície de macrófagos, monócitos, células da microglia, células dendríticas e especialmente linfócitos, e também com co-receptores como CCR5. Tal ligação induz mudanças que expõem a região V3, resultando na exposição da gp41 que possui o peptídeo de fusão responsável pela interação entre o envelope viral e a membrana celular (CLAPHAN, 1997). Após a fusão, o material genético do HIV é liberado no interior celular prosseguindo com a transcrição reversa, que é a síntese de uma fita de DNA, usando o RNA como molde, e catalisada pela enzima transcriptase reversa. Em seguida, o DNA é transportado e integrado ao núcleo da célula hospedeira, pela ação da enzima integrase, e passa ser denominado próvirus. Esse próvirus pode permanecer na forma latente por muitos anos bem como dar continuidade ao ciclo de replicação. (HO *et al.*, 1995).

Uma ativação das células hospedeiras resulta na transcrição do DNA viral em RNA mensageiro, o qual é traduzido em proteínas virais que darão origem a novas partículas virais. Entre essas proteínas está a protease necessária para processar outras proteínas em suas formas funcionais. Uma vez produzidas, vão regular a síntese de novos genomas virais e formar a estrutura externa de outros vírus que são liberados pela célula hospedeira.

O vírion recém-formado é liberado para o meio circulante da célula hospedeira, podendo permanecer no fluido extracelular ou infectar novas células.



**Figura 3-** Esquema simplificado do ciclo de vida do HIV-1.



### 1.5-Diversidade genética do HIV

Desde que os primeiros isolados de HIV foram estudados quanto às seqüências nucleotídicas, verificou-se uma alta diversidade genética entre os mesmos (CLAVEL *et al.*, 1986; COFFIN *et al.*, 1986). Esta diversidade foi observada não somente entre isolados virais de pacientes em regiões geográficas distintas, como também entre isolados de pacientes de uma mesma região. As análises de isolados virais obtidos de um mesmo indivíduo ao longo de um período de infecção e mesmo daqueles obtidos em um determinado ponto da infecção também demonstraram uma alta taxa de variação entre os mesmos (DIAZ *et al.*, 1997).

Uma população heterogênea de HIV, mas que possui vírus com características gerais comuns e que infecta um determinado indivíduo é denominada quasispécie. Quasispécie seria uma mistura heterogênea de vírus com genomas relacionados, posto que a população se originou de um ancestral comum, onde cada genoma viral difere do outro em decorrência da evolução deste vírus no hospedeiro.

Os mecanismos que contribuem para a diversidade genética do HIV são os de replicação do genoma viral; esses mecanismos incluem: pontos de mutação, hipermutação, inserção, deleção e recombinação intragênica. (DIAZ RS; BUSCH MP.2001).

O acúmulo da diversidade genética do HIV em um determinado indivíduo resulta principalmente da taxa de erros da transcriptase reversa. Esta taxa de erros é cerca de  $1,7 \times 10^{-4}$  por base incorporada por ciclo de replicação. A taxa de fixação do erro é de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-5}$  (MANSKY *et al.*, 1995). O acúmulo da diversidade genética também é decorrente do alto índice replicativo do vírus, que é da ordem de  $10^{10}$  novos vírus por dia (HO *et al.*, 1995).

A variabilidade genética do HIV pode ser observada ao longo do genoma deste

vírus como um todo. No entanto, algumas regiões limitadas dentro deste contexto genômico experimentam mais altas taxas de variação, apresentando uma velocidade de evolução mais acelerada. A análise da região do envelope (*env*), mais especificamente da gp120, demonstrou de maneira mais efetiva estes altos níveis de divergência entre isolados virais. Além disso, pôde ser observada uma variação diferencial entre blocos de seqüências desta região, os quais foram denominados constantes (C1-C5) e hipervariáveis (V1- V5), sendo que estas últimas experimentam um alto grau de variação de suas seqüências (MYERS *et al.*, 1995).

Análises dos genes do envelope (*env*) e do nucleocapsídeo (*gag*) do HIV-1 de diferentes regiões do mundo revelaram que os isolados do HIV-1 se agrupam em pelo menos dois grupos principais denominados de M (do inglês Major, ou principal) e de O (do inglês Outlier, ou destacado do grupo) (GURTLER *et al.*, 1994). Recentemente, um terceiro grupo de HIV-1 chamado N (do inglês New, ou novo) foi descrito (SIMON *et al.*, 1998). O grupo M é o responsável pela maior parte da epidemia, apresenta 10 subtipos diferentes (A-J). Temos ainda as formas recombinantes que circulam ao redor do mundo, com estruturas bem definidas (PEETERS, 2000).

Estudos realizados principalmente com pacientes sintomáticos revelaram que os vírus mudam para “escapar” da resposta do sistema imune do hospedeiro (McKEATING *et al.*, 1989). O aumento da diversidade genética durante o curso da infecção pode também estar relacionado à progressão da doença. O aumento no número de vírus variantes pode ser um fator importante, levando à falência do sistema imune. Teoricamente, o controle da replicação do HIV-1 é perdido quando a diversidade genética do vírus, dentro do indivíduo infectado, excede a capacidade do sistema imune do mesmo para responder de forma eficaz. Quando

esta diversidade atravessa o limiar, ocorre um aumento da viremia, diminuição das células CD4 e progressão da doença. (NOWAK *et.al.*,1991).

A geração da diversidade genética das seqüências do HIV-1 está ocorrendo o tempo todo dentro de cada indivíduo infectado. Entretanto, estudos virológicos de infecção primária ou recente indicam que o HIV-1 nestes pacientes é relativamente homogêneo quanto às seqüências e fenótipos (ZHANG *et al.*,1993 JV, ZHU 1993 Science). Estes estudos indicam também que a seqüência nucleotídica do HIV presente no indivíduo recém infectado é semelhante à seqüência presente no transmissor, o que pode ser denominado como transmissão seletiva (bottleneck). Embora não esteja claro como esta transmissão seletiva ocorra, várias hipóteses têm sido propostas.

A primeira hipótese para explicar o fenômeno da transmissão seletiva roga que a homogeneidade encontrada no receptor da infecção pode refletir uma diversidade da seqüência restrita presente no inóculo do transmissor. Porém, o fato que o vírus transmitido representa somente uma menor variação no sangue do transmissor contesta contra essa hipótese (ZHU *et.al.*, 1993). Outro modelo propõe, que algumas variantes apresentam uma vantagem em penetrar a barreira da mucosa do novo hospedeiro. Isto poderia explicar não somente a homogeneidade da seqüência mas também o fato que o HIV-1 isolado durante a infecção é predominantemente trópico por macrófagos e não indutor de sincício. Outra hipótese é que múltiplas variantes de HIV-1 penetram no novo hospedeiro mas somente uma apresenta a capacidade de se tornar uma população predominante devido às características de crescimento biológico (amplificação seletiva). Esta hipótese é fundamentada pela homogeneidade encontrada em pacientes hemofílicos soroconvertidos que foram inoculados via parenteral com múltiplas variantes de HIV-1 (ZHANG *et. al.*, 1993). A última proposta é que várias cepas são transmitidas mas somente uma predomina após a soroconversão. Outras

cepas transmitidas, presentes em baixo número de cópias durante o tempo de contágio, eventualmente se tornam detectáveis após pressão causada pelo sistema imune sobre as cepas replicantes. Esta hipótese poderia explicar como um trabalhador da área da saúde infectado acidentalmente com um clone de HIV-1 demonstrou homogeneidade nos genótipos encontrados 5 anos após a infecção primária (DELWART *et.al.*, 1995) (REITZ *et.al.*, 1994).

O “bottleneck” ocorre a despeito da via de transmissão (sexual, materno-fetal ou parenteral) (WOLINSKY *et. al.*, 1992). Foi descrito um caso em que um indivíduo foi exposto a duas diferentes quasispécies de HIV-1 por transfusão a partir de dois diferentes doadores de sangue, porém, a infecção se estabeleceu somente a partir da quasispécie de um doador (DIAZ *et. al.*, 1996). Este caso é um exemplo de “bottleneck”, onde houve a seleção específica de uma seqüência viral presente na quasispécie de um e não dos dois doadores da infecção.

Evidência para a seleção de genomas ou “bottleneck” ocorridas durante ou após a transmissão parenteral, perinatal e sexual tem sido obtida através da comparação das seqüências do transmissor e do indivíduo infectado recentemente, e por notável homogeneidade das seqüências presentes nos indivíduos infectados recentemente quando comparadas à heterogeneidade vistas em indivíduos soropositivos (DIAZ *et. al.*, 1996).

Vários estudos têm sido realizados com propósito de confirmar o “bottleneck” em indivíduos com infecção recente, de ambos os sexos e na transmissão materno-fetal. Em estudo realizado por (ZHU *et al*, 1993) em 5 pacientes soroconvertores o fenótipo viral foi uniformemente trópico por macrófagos e não indutor de sincício e os vírus eram genotipicamente homogêneos dentro de cada paciente. Em dois desses casos, onde os parceiros sexuais foram estudados, as seqüências dos vírus transmitidos se assemelharam mais às variantes minoritárias presentes no sangue dos transmissores. Também existe uma

pressão seletiva mais intensa na gp120 do que na gp41, nef e p17, sugerindo que o mecanismo seletivo está envolvido na transmissão.

Em outro estudo realizado foi analisada a distribuição de genótipos distinguíveis entre mãe e filho para investigar o papel da seleção na transmissão de HIV-1. As seqüências das regiões V3 e V4-V5 do gene *env* foram analisadas a partir de três pares de mãe e filho. Em dois pares, a forma proviral menos freqüente encontrada na mãe predominou em seu filho. Estes resultados demonstram que, em alguns casos, a variante minoritária do vírus materno foi transmitida ao filho (WOLINSK *et al*, 1992).

ZHANG *et al* (1993) desenvolveram estudo onde RNA viral foi extraído de plasma de 5 indivíduos durante o período de viremia, antes da soroconversão, na infecção primária com HIV-1 e amplificado por reação da polimerase em cadeia. Análise da seqüência de nucleotídeos de DNA amplificado das regiões hipervariáveis V3 e V4 indicou que a população inicial de vírus de cada indivíduo infectado recentemente foi completamente homogênea na seqüência, confirmando os dados descritos anteriormente. Nenhuma variabilidade na amostra foi encontrada dentro os 44,090 nucleotídeos seqüenciados nesta região do *env*, contrastando com alto grau de variabilidade normalmente encontrada em indivíduos soropositivos. Paralelamente, foi encontrada uma variabilidade substancial no gene *gag*, p17 normalmente conservado em muitas amostras de soroconversores. A diversidade na seqüência da p17 de amostras que foram homogêneas no V3 e V4 pode ser explicada pela existência de forte seleção para seqüência específica no *env*.

Diferenças nas análises das seqüências de nucleotídeos têm sido observadas entre pacientes homens e mulheres com infecção recente. Em um estudo recente, (LONG *et al*, 2000) analisaram as seqüências do gene *env* de homens e mulheres da África com infecção recente. A coorte de indivíduos analisados para o estudo foi composta de 10 homens e 32

mulheres de alto risco que foram monitorados quanto à presença de anticorpos específicos para HIV-1, a intervalos de aproximadamente três meses. Foram analisadas as seqüências de três regiões variáveis (V1, V2 e V3) que incluíam determinantes para o tropismo viral e fenótipo do vírus. Foi detectada uma população proviral homogênea em PBMCs, definida como menos que 1% de diversidade em V1/V2 ou V3 nos homens e uma população viral heterogênea em 20 das 32 mulheres (63%) examinadas neste estudo. Existem pelo menos três modelos para explicar a diversidade em mulheres com infecção recente. O primeiro é que a população diversa do vírus é o resultado de reinfecção por múltiplos parceiros. Os outros modelos hipotetizam que: A) as várias cepas distintas de HIV sejam transmitidas às mulheres mas não aos homens. B) ou que evoluíram rapidamente a partir de uma única cepa infectante em resposta à pressão seletiva do hospedeiro. Os dados publicados neste estudo apóiam a hipótese de que as mulheres são tipicamente infectadas por múltiplas cepas de HIV-1 a partir de seus parceiros, sendo que os homens são mais freqüentemente infectados por somente um único genótipo viral. (LONG *et al.*, 2000)

O estudo realizado pelo grupo de Long *et al.*, indica que existem diferenças nos padrões das viroses transmitidas em homens e mulheres e em virtude destes resultados encontrados no estudo de LONG *et al.*, realizado em indivíduos da África, achamos pertinente confirmar se há presença de diversidade genética ou seleção de genomas e diferenças no padrão em homens e mulheres no Brasil.

## **2-OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi descrever a diversidade genética do HIV-1 em indivíduos masculinos e femininos com infecção recente por este vírus no Brasil.

### **3-MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Casuística**

Foram utilizadas amostras de sangue total para o presente estudo que estavam disponíveis no Laboratório de Retrovirologia da Escola Paulista de Medicina –Unifesp, São Paulo-SP e haviam sido identificadas previamente e colhidas em tubos contendo etilenodiaminotetracetato (EDTA). Estas amostras provinham de cinco pacientes do sexo masculino e cinco do sexo feminino com sorologias positivas para o HIV (confirmada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) e Western Blot) do COAS (Centro de Testagem e Aconselhamento de Santos, São Paulo, Brasil. Estas amostras foram centrifugadas, separadas em plasma e creme leucocitário (“buffy coat”), aliquotadas e estocadas em freezer -80°C. Os pacientes que se dispuseram a participar foram informados em detalhes sobre o estudo e assinaram o TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO. Essas amostras foram previamente identificadas como proveniente de pacientes com infecção recente pelo HIV até 170 dias após soroconversão após testagem pela estratégia sorológica de testagem dupla (JANSSEN *et.al.*;1998).

#### **3.2 Identificação das amostras**

As amostras de pacientes do sexo feminino estão identificadas com os números 11920, 12277, 13080, 13849, 15370 e as amostras de pacientes do sexo masculino com os números 11277, 13193, 16330, 2003, e LCR.

Foi usado como controle negativo para reação de PCR água e amostra de indivíduo soronegativo. Como controle positivo foi utilizado o genoma do HXB2r clonado em plasmídeo.



### 3.3-Extração do ácido nucléico do HIV-1

Foi extraído o DNA proviral do HIV-1 das alíquotas do creme leucocitário (buffy coat), utilizando o Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit, (Qiagen Inc. Santa Clarita, CA, EUA), conforme instruções do fabricante.

Para desenvolver o estudo da diversidade genética do HIV-1 com estas amostras, foram obtidos cinco clones para região *env* (C2-V3-C3) usando PCR nested, após diluição limitante da fita de DNA. A estratégia para gerar seqüências que representem clones isolados após a PCR foi baseada em várias diluições da amostra de DNA visando obter a última diluição com amplificação positiva (SIMMONDS *et al.*, 1990).

Após a extração de DNA proviral foi eluído em aproximadamente 100 µl de tampão de eluição e a partir desta amostra foi feita uma diluição seriada até  $10^{-4}$ . Após a realização desta diluição seriada foram realizadas reações de PCR usando os iniciadores V<sub>3</sub> "outer" 3' e V<sub>3</sub> "outer" 5' e para a PCR "nested" os iniciadores V<sub>3</sub> "inner" 3' e V<sub>3</sub> "inner" 5', como descrito abaixo. Para cada diluição, a PCR foi feita em duplicata. A última diluição positiva obtida foi adicionada a um tubo contendo 1ml de mistura de reagentes para reação de PCR e distribuída em 20 tubos de reação. De acordo com a tabela de POISSON foram consideradas as reações que resultaram em produtos de PCR em até 25% dos tubos. Esse procedimento garante que os amplicons foram gerados a partir de apenas uma molécula de cDNA ("clone"). (SIMMONDS *et al.*, 1990 e DIAZ *et al.*, 1995).

### 3.4-Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do DNA proviral.

#### 3.4.1- Região V3 da gp120 do gene *env*.

Uma PCR da primeira rodada amplifica um fragmento de 350pb que contém a região C2 à C3 do gene *env* do HIV, utilizando os iniciadores descritos por WOLFS *et al.*, 1991 V3outer 5' - 5'ATAAGCTTCAATGTACACATGGAATT 3' (localizado na posição 6958 à-6977 do HXB2r) e - V3outer 3' - 5 'ATG AATTCATTACAGTAGAAAAATTCC C 3' (localizado na posição 7382 à 7363 do HXB2r). As concentrações dos reagentes para 1 mL de reação de PCR foram as seguintes:

Concentração:Tampão 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, dNTP 0,2mM, Iniciador V<sub>3</sub>outer5' 0,2pmol, Iniciador V<sub>3</sub>outer 3' 0,2pmol,Taq DNA polimerase 0,25 U .

As condições de amplificação foram: 1 ciclo de: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de: 72°C por 7 minutos.

Desta PCR (1º round), foram transferidos 5 µL do produto para uma PCR secundária (“nested” PCR), utilizando os iniciadores V3inner5' - 5'ATAAGCTTGCAGTCTAGCAGAAGAAGA 3'(7010 à 7030) e V3inner3' ATGAATTCTTGGGTCCCCTCCTGAGGA (7337 à 7314) (WOLFS *et al.*; 1991). As concentrações dos reagentes e as condições de ciclagem foram as mesmas descritas no PCR primário.

### **3.5-Detecção dos produtos amplificados**

Após a PCR, as amostras de DNA amplificados foram separadas em gel de agarose 1,5% (peso/volume) em Tris-borato/ EDTA (TBE) 0,5X (0,89M Tris; 0,89 M ácido Bórico e 0,02 M EDTA pH 8,0), contendo brometo de etideo (0,5 (µg/mL). A corrida foi efetuada a 100 Volts (V), no tempo médio de 30 minutos, em tampão TBE 0,5X. O padrão utilizado para a comparação do peso molecular dos fragmentos amplificados foi o padrão de bandas de 100 pares de base (pb) (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD, EUA). O gel foi visualizado e fotografado sob iluminação ultravioleta (U.V.) (320 nm), utilizando câmera digital DC 40 (Kodak, Rochester, NY, EUA).

### **3.6-Purificação dos produtos das PCRs**

Os produtos de PCR das amostras diluídas, correspondentes a clones isolados , foram purificados pelo QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA) conforme instruções do fabricante.

### **3.7-Reação de sequenciamento**

As amostras purificadas foram sequenciadas utilizando-se o Cy5/Cy5.5 Dye primer Kit (Visible Genetics Inc- Toronto, Ont, Canadá) com os iniciadores V3inner5' - 5' ATA AGC TTG CAG TCT AGC AGA AGA AGA 3' para o sequenciamento da região V3 de apenas uma fita (WOLFS *et. al.*,1991) marcados com CY5.5.

### **3.8-Deteccão dos fragmentos sequenciados**

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em um sequenciador automático de DNA modelo LONG-READER TOWER, marca (Visible Genetics Inc – Toronto, Ontario, Canada), em gel de poliacrilamida Rapid Gel XL 6% cartridge (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, EUA) na placa MicroCel™ 300 Cassettes (Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canadá), em TBE 1X durante 30 minutos, na temperatura de 54°C, na voltagem de 1300V, com o laser na potência de 25%.

### **3.9-Análise do sequenciamento**

As edições e análise do fragmento sequenciado foram feitas através do programa OpenGene – (Gene Objects - Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canada).

### **3.10-Alinhamento das seqüências**

As seqüências dos nucleotídeos obtidas pelo seqüenciamento da região V3 do gene *env* foram alinhadas com seqüências de nucleotídeos da consenso americana (D85-40) com o auxílio do programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997) e ajuste manual. A análise filogenética foi realizada, com a geração de árvores filogenéticas utilizando um pacote de programas MEGA 2 e teve seu nível de significância verificado pela técnica de Bootstrap (ordenação forçada) de 100 simulações (FELSENSTEIN, 1989), matriz de distância entre 2 parâmetros através do método Kimura, método de "Neighbor-Joining" (agrupamento por similaridade) e o estimativo das substituições sinônimas e não sinônimas pelo método Nei-Gojobori, análise par a par.

## 4-Resultados

### 4.1- Diversidade genética da região V3 da gp120 do HIV-1.

A análise das seqüências de nucleotídeos dos 5 clones obtidos das 10 amostras estudadas com infecção recente não apresentou diversidade genética significativa neste período da infecção, indicando portanto a presença de homogeneidade entre as seqüências de cada indivíduo analisado (diversidade genética intra-indivíduo). Estes resultados podem ser visualizados nas figuras 4a, b e c. A distância calculada entre os clones de cada amostra das seqüências da região V3 da gp120 foi em geral menor que 1% (Tabela 2) confirmando a homogeneidade intra-paciente tanto nos indivíduos de sexo masculino quanto feminino. A análise das seqüências de aminoácidos indica que o fenótipo viral (predito a partir do genótipo) foi uniformemente trópico por macrófagos/monócitos e não indutor de sincício, como predito pela presença de aminoácidos de carga negativa (D,E) ou neutra e conseqüente ausência dos aminoácidos de carga positiva (R e K) nas posições 306 ou 320 da alça V3. (MILICH *et al.*,1993). (Figura 5). Da mesma forma, a carga média do V3 foi inferior a 5, o que novamente sugere a ausência de cepas indutoras de sincício. (MILICH *et al.*,1993). Nesta mesma análise, podemos observar que seis pacientes possuem a seqüência GPGR no topo da alça V3, semelhante ao padrão encontrado nas cepas do subtipo B caracterizada nos EUA e Europa ocidental, e quatro pacientes com a seqüência GWGR, típico de cepas do subtipo B que tem sido caracterizada no Brasil (MORGADO *et al.*,1994 e LOUWAGIE *et al.*, 1994) (Figura 5). A análise da árvore filogenética demonstrou, de uma forma geral, a segregação dos clones gerados de cada amostra em um determinado ramo, exceção feita às amostras 11277 (sexo masculino) e 12277 (sexo feminino) as quais permaneceram em um mesmo ramo, demonstrando uma provável relação epidemiológica

entre estes indivíduos, dado este cuja confirmação não possuímos (Figura 6).

O cálculo de substituições sinônimas e não sinônimas obtidas, podem ser visualizadas na tabela 1 e indicam que no geral existe uma maior presença de mutações sinônimas do que não sinônimas neste início de infecção (média de  $DS/DN = 1,39$ ). Entretanto, os resultados foram discretamente variáveis, sendo que em um indivíduo houve um predomínio de alterações não sinônimas sobre as sinônimas, como no caso do indivíduo 16330, que apesar de apresentar um DN extremamente baixo, apresenta um DS igual a zero. O indivíduo 13193 apresenta um alto índice DN, denotando um processo seletivo mais intenso desde o início da infecção e, coincidentemente, apresenta também uma maior diversidade genética, mostrando a importância deste evento (DN) na geração de diversidade do HIV-1.

D8540	gta	cag	ctg	aaa	gaa	tct	gta	aaa	att	aat	tgt	aca	aga	ccc	aac	aac	aat	aca	aga	aaa	agt	ata	cat	ata	gga	cca	[ 78]
11920-34	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11920-26	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11920-24	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11920-39	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11920-29	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
12277-33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
12277-24	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
12277-38	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
12277-5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
12277-32	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13080-05	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13080-20	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13080-29	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13080-15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13080-18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13849-9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13849-33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13849-11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13849-15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13849-20	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
15370-8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
15370-18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
15370-7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
15370-10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
15370-24	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
2003-11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
2003-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
2003-13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
2003-17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
2003-18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
LCR-24	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
LCR-27	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
LCR-30	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
LCR-36	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
LCR-39	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11277-13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11277-20	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11277-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11277-11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
11277-17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13193-6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13193-15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13193-19	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13193-9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
13193-17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
16330-33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
16330-25	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
16330-32	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
16330-23	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	
16330-37	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	

**Figura 4a-** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene *env* do HIV-1 dos clones obtidos das amostras analisadas. Os pontos indicam identidade e os traços indicam ausências dos nucleotídeos em questão (deleções). D85-40 representa a seqüência consenso das cepas Norte Americanas não indutoras de sincício. A numeração de 1 à 5 identifica amostras do sexo feminino e 6 à 10 sexo masculino.

D8540	ggg aga qca ttt tat qca aca gga gaa ata ata gga gat ata aga caa qca cat tgt aac ctt agt aga aca gaa tgg	[156]
11920-34	...	[156]
11920-26	...	[156]
11920-24	...	[156]1
11920-39	...	[156]
11920-29	...	[156]
12277-33	...	[156]
12277-24	...	[156]
12277-38	...	[156]2
12277-5	...	[156]
12277-32	...	[156]
13080-05	...	[156]
13080-20	...	[156]
13080-29	...	[156]3
13080-15	...	[156]
13080-18	...	[156]
13849-9	...	[156]
13849-33	...	[156]
13849-11	...	[156]4
13849-15	...	[156]
13849-20	...	[156]
15370-8	...	[156]
15370-18	...	[156]
15370-7	...	[156]5
15370-10	...	[156]
15370-24	...	[156]
2003-11	...	[156]
2003-12	...	[156]
2003-13	...	[156]6
2003-17	...	[156]
2003-18	...	[156]
LCR-24	...	[156]
LCR-27	...	[156]
LCR-30	...	[156]7
LCR-36	...	[156]
LCR-39	...	[156]
11277-13	...	[156]
11277-20	...	[156]
11277-16	...	[156]8
11277-11	...	[156]
11277-17	...	[156]
13193-6	...	[156]
13193-15	...	[156]
13193-19	...	[156]9
13193-9	...	[156]
13193-17	...	[156]
16330-33	...	[156]
16330-25	...	[156]
16330-32	...	[156]10
16330-23	...	[156]
16330-37	...	[156]

Figura 4b- Continuação

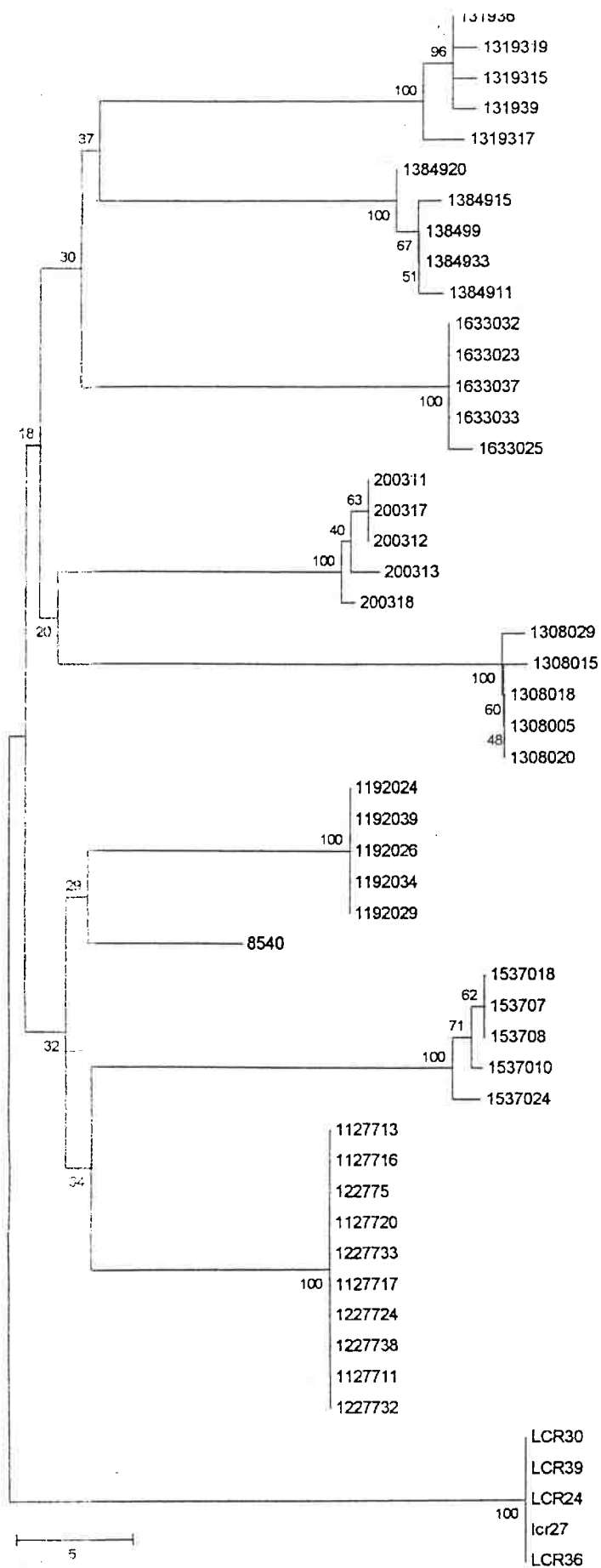


D8540 aac aac act tta aaa cag ata gtt aaa aaa tta aga gaa caa ttt ggg aa [206]  
11920-34 ... .. .C. .C. ... .. g. ... .. a. ... [206]  
11920-26 ... .. .C. .C. ... .. g. ... .. a. ... [206]  
11920-24 ... .. .C. .C. ... .. g. ... .. a. ... [206]1  
11920-39 ... .. .C. .C. ... .. g. ... .. a. ... [206]  
11920-29 ... .. .C. .C. ... .. g. ... .. a. ... [206]  
12277-33 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
12277-24 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
12277-38 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]2  
12277-5 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
12277-32 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
13080-05 g.a ..t ... .. .tg ... .. .C. .C. ... .. ga. ... .. tac ... [206]  
13080-20 g.a ..t ... .. .tg ... .. .C. .C. ... .. ga. ... .. tac ... [206]  
13080-29 g.a .ct ... .. .tg ... .. .C. .C. ... .. ga. ... .. tac ... [206]3  
13080-15 g.a ..t ... .. .tg ... .. .C. .C. ... .. ga. ... .. tac ... [206]  
13080-18 g.a ..t ... .. .tg ... .. .C. .C. ... .. ga. ... .. tac ... [206]  
13849-9 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. a. ... g [206]  
13849-33 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. a. ... g [206]  
13849-11 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. a. ... g [206]4  
13849-15 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. a. ... g [206]  
13849-20 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. a. ... g [206]  
15370-8 ..a g. ... .. .C. .a. ... .. .C. ... .. aat ... [206]  
15370-18 ..a g. ... .. .C. .a. ... .. .C. ... .. aat ... [206]  
15370-7 ..a g. ... .. .C. .a. ... .. .C. ... .. aat ... [206]5  
15370-10 ..a g. ... .. .C. .a. ... .. .C. ... .. g. ... .. aat ... [206]  
15370-24 ..a g. ... .. .C. .a. ... .. .C. ... .. aat ... [206]  
2003-11 g.a ..g ... .. .g. ... .. g. ... .C. .t. ... .. g. ... .. ca. ... [206]  
2003-12 g.a ..g ... .. .g. ... .. g. ... .C. .t. ... .. g. ... .. ca. ... [206]  
2003-13 g.a ..g ... .. .g. ... .. g. ... .C. .t. ... .. g. ... .. ca. ... [206]6  
2003-17 g.a ..g ... .. .g. ... .. g. ... .C. .t. ... .. g. ... .. ca. ... [206]  
2003-18 g.a ..g ... .. .g. ... .. g. ... .C. .t. ... .. g. ... .. ca. ... [206]  
LCR-24 .ca .c. ... .. .g. ... .. g. ... .C. .g. ... .. .g .ag .c ... .. aaa tg [206]  
LCR-27 .ca .c. ... .. .g. ... .. g. ... .C. .g. ... .. .g .ag .c ... .. aaa tg [206]  
LCR-30 .ca .c. ... .. .g. ... .. g. ... .C. .g. ... .. .g .ag .c ... .. aaa tg [206]7  
LCR-36 .ca .c. ... .. .g. ... .. g. ... .C. .g. ... .. .g .ag .c ... .. aaa tg [206]  
LCR-39 .ca .c. ... .. .g. ... .. g. ... .C. .g. ... .. .g .ag .c ... .. aaa tg [206]  
11277-13 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
11277-20 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
11277-16 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]8  
11277-11 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
11277-17 ..t ... .. .C. .g ... .. .t ... aat ... [206]  
13193-6 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. .ag .aa .c [206]  
13193-15 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. .ag .aa .c [206]  
13193-19 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. .ag .aa .c [206]9  
13193-9 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. .ag .aa .c [206]  
13193-17 g.a ... .. .C. ... .. g. ... .. .ag .aa .c [206]  
16330-33 g.g .g. ... .. g. ... .. g. ... .C. ... .. aac ... [206]  
16330-25 g.g .g. ... .. g. ... .. g. ... .C. ... .. aac ... [206]  
16330-32 g.g .g. ... .. g. ... .. g. ... .C. ... .. aac ... [206]10  
16330-23 g.g .g. ... .. g. ... .. g. ... .C. ... .. aac ... [206]  
16330-37 g.g .g. ... .. g. ... .. g. ... .C. ... .. aac ... [206]

Figura 4c-Continuação

D8540	VOLKESVKIN	CTRENNNTRK	SIHIG <b>GPGR</b> F	YATGEIIGDI	ROAHCNLSRT	EWNNTLKQIV	KKLREQ	[66]
11920-34	...N.A.N.T	.I.....	..SL.....	....D...N.	.....EA	K.....A	T..G..	[66]
11920-26	...N.A.N.T	.I.....	..SL.....	....D...N.	.....EA	K.....A	T..G..	[66]
11920-24	...N.A.N.T	.I.....	..SL.....	....D...N.	.....EA	K.....A	T..G..	[66]+2
11920-39	...N.A.N.T	.I.....	..SL.....	....D...N.	.....EA	K.....A	T..G..	[66]
11920-29	...N.A.N.T	.I.....	..SL.....	....D...N.	.....EA	K.....A	T..G..	[66]
12277-33	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
12277-24	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
12277-38	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]+2
12277-5	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
12277-32	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
13080-05	...KT.V..	...G.....	..L.W.SL	.T.....N.	.....D.E..M.	A T..E..	[66]	
13080-20	...KT.V..	...G.....	..L.W.SL	.T.....N.	.....D.E..M.	A T..E..	[66]	
13080-29	...KT.V..	...G.....	..L.W.SL	.T.....N.	.....D.ET..M.	A T..E..	[66]+2	
13080-15	...KT.V..	...G.....	..L.W.SL	.T.....N.	.....D.E..M.	A T..E..	[66]	
13080-18	...KT.V..	...G.....	..L.W.SL	.T.....N.	.....D.E..M.	A T..E..	[66]	
13849-9	...NKT.Q..	.....	..L.W..I	F....T..	.....GE	T.E.....	T..G..	[66]
13849-33	...NKT.Q..	.....	..L.W..I	F....T..	.....GE	T.E.....	T..G..	[66]
13849-11	...NKT.Q..	.....E	..L.W..I	F....T..	.....GE	T.E.....	T..G..	[66]+2
13849-15	...NKT.Q..	.....	..L.W..I	F....T..	.....GE	T.E.....	T..G..	[66]
13849-20	...NKT.Q..	.....	..L.W..I	F....T..	.....GE	T.E.....	T..G..	[66]
15370-8	...N...Q..	.....	..QL.....	....L.N.	..R.Y.T..GA	K.KD..QK..	T.....	[66]
15370-18	...N...Q..	.....	..QL.....	....L.N.	..R.Y.T..GA	K.KD..QK..	T.....	[66]
15370-7	...N...Q..	.....	..QL.....	....L.N.	..R.Y.T..GA	K.KD..QK..	T.....	[66]+4
15370-10	...N...Q..	.....	..QL.....	....L.N.	..R.Y.T..GA	K.KD..QK..	T..G..	[66]
15370-24	...NK...Q..	.....	..QL.....	....L.N.	..R.Y.T..GA	K.KD..QK..	T.....	[66]
2003-11	...N.T.R..	.....	..PV.....	....-D....	.....KA	D.EK..R.VA	I..G..	[66]
2003-12	...N.T.R..	.....	..PV.....	....-D....	.....KA	D.EK..R.VA	I..G..	[66]
2003-13	...N.T.R..	.....	..V.....	....-D....	.....KA	D.EK..R.VA	I..G..	[66]+2
2003-17	...N.T.R..	.....	..PV.....	....-D....	.....KA	D.EK..R.VA	I..G..	[66]
2003-18	...N.T.R..	.....	..PV.....	....-D....	.....KA	D.EK..R.VA	I..G..	[66]
LCR 24	...NKAIE..	.....	..Q.....	H...A....	.....V.EK	..TT..R.VA	R..KD.	[66]
LCR 27	...NKAIE..	.....	..Q.....	H...A....	.....V.EK	..TT..R.VA	R..KD.	[66]
LCR-30	...NKAIE..	.....	..Q.....	H...A....	.....V.EK	..TT..R.VA	R..KD.	[66]+3
LCR-36	...NKAIE..	.....	..Q.....	H...A....	.....V.EK	..TT..R.VA	R..KD.	[66]
LCR-39	...NKAIE..	.....	..Q.....	H...A....	.....V.EK	..TT..R.VA	R..KD.	[66]
11277-13	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
11277-20	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
11277-16	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]+2
11277-11	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
11277-17	...NKT.V..	.....	.....	....D...N.	.....I	.....	T...H	[66]
13193-6	...N.T.E..	.....	G..L.W.	....D....	...Y.V.NNN	K.E.....	T..G..	[66]
13193-15	...N.T.E..	.....	G..L.W.	....D....	...Y.V.NNN	K.E.....	T..G.K	[66]
13193-19	...N.T.E..	.....	G..L.W.	....D....	...Y.V.NNN	K.E.....	T..GK.	[66]+2
13193-9	...N.T.E..	.....	G..L.W.	....D....	...Y.V.NNN	K*E.....	T..G..	[66]
13193-17	...NKT.E..	.....	G..L.W.	....D....	...Y.V.NNN	K.E.....	T..G..	[66]
16330-33	...NQ.IE.E	.....	..V.W.	.....	..K.Y....KA	K.ES..E.V.	T.....	[66]
16330-25	...NQ.IE.E	.....	..V.W.	.....E..	..K.Y....KA	K.ES..E.V.	T.....	[66]
16330-32	...NQ.IE.E	.....	..V.W.	.....	..K.Y....KA	K.ES..E.V.	T.....	[66]+2
16330-23	...NQ.IE.E	.....	..V.W.	.....	..K.Y....KA	K.ES..E.V.	T.....	[66]
16330-37	...NQ.IE.E	.....	..V.W.	.....	..K.Y....KA	K.ES..E.V.	T.....	[66]

**Figura 5 :** Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos clones do gene *env* do HIV-1. O número seguido ao número da amostra, indica o clone. Os pontos indicam identidade, enquanto que os traços indicam ausência dos aminoácidos em questão (deleções). Em negrito está assinalado o motivo GPGR do topo da alça V3 e em \* as posições relacionadas ao tropismo e citopogenicidade das cepas virais (indutoras de sincício e não indutoras de sincício). D85-40 representa a seqüência consenso das cepas Norte Americanas não indutoras de sincício. \* indica codon de repetição(stop codon). A carga está identificada com sinat+ e o algarismo numérico ao lado de cada grupo de amostra. A ordem das amostras permanece a mesma do alinhamento das seqüências de nucleotídeos.



**Figura 6-** Árvore filogenética construída com as seqüências de nucleotídeos. D85-40 representa a seqüência consenso das cepas Norte Americanas não indutoras de sincício.

<b>Amostra</b>	<b>dS</b>	<b>dN</b>	<b>dS/dN</b>
16330	0,0	0,002	0
13193	0,009	0,010	0,9
13849	0,009	0,005	1,8
11920	0,0	0,0	0
15370	0,009	0,005	1,8
12277	0,0	0,0	0
11277	0,0	0,0	0
13080	0,009	0,003	3
2003	0,018	0,003	6
LCR	0,0	0,0	0

**Tabela 1-** Estimativo de mutações sinônimas e não sinônimas pelo método Nei-Gojobori, onde (dS) é mutação sinônima, (dN) é mutação não sinônima.

<b>Amostra</b>	<b>d</b>	<b>DP</b>
16330	0,002	0,002
13193	0,012	0,005
13849	0,006	0,003
11920	0,0	0,0
15370	0,006	0,003
12277	0,0	0,0
11277	0,0	0,0
13080	0,004	0,002
2003	0,006	0,003
LCR	0,0	0,0

**Tabela 2-** Cálculo da distância entre os clones das seqüências da região V3 da gp120. (d) representa distância e (DP) desvio padrão. Cálculo realizado através do método Kimura 2 parâmetros.

## 5-Discussão

A diversidade genética do HIV-1 tem sido tema de muitos estudos atuais devido à sua importância para melhor entendimento do perfil genético do vírus e a fisiopatogenia da infecção primária. A diversidade genética, além de representar um grande desafio para a elaboração de uma vacina efetiva contra a AIDS (ESPARZA *et. al.*, 1996), está relacionada à capacidade de cepas mutantes escaparem do sistema imune do hospedeiro, além de potencialmente propiciarem resultados falso negativos em testes sorológicos convencionais para o seu diagnóstico (McKNIGHT & CLAPHAM 1995). Pode também estar associada ao surgimento de resistência aos quimioterápicos anti-retrovirais (NAJERA *et. al.*, 1995). Além disso, a evolução viral poderia levar a mudanças na virulência das cepas, afetando o ritmo, a transmissão e a progressão da doença (WEISS, 1993).

Uma caracterização melhor do HIV-1 e o conhecimento dos detalhes genéticos do vírus e da fisiopatogenia da infecção primária têm importante implicação para o desenvolvimento de uma vacina anti-HIV.

Evidências para a seleção de genomas ocorrida durante ou após a transmissão parenteral, perinatal ou sexual têm sido obtidas através da comparação das seqüências do transmissor e do indivíduo infectado recentemente. A transmissão seletiva é representada pela homogeneidade das seqüências presentes nos indivíduos infectados recentemente quando comparadas à heterogeneidade vista em indivíduos já há mais tempo infectados (DIAZ *et al.*, 1996).

Em soroconvertidos, a análise das seqüências de HIV-1 demonstra uma forte pressão para conservar a homogeneidade do gene *env* em relação aos genes do nucleocapsídeo viral como o *gag* (ZHU *et al.*, 1993 ZHANG *et. al.*, 1993). Embora não

esteja claro como esta transmissão seletiva ocorra, várias hipóteses têm sido propostas. Primeiro, a homogeneidade encontrada no receptor da infecção pode refletir uma diversidade da seqüência restrita presente no inóculo do transmissor. Outra hipótese é que múltiplas variantes de HIV-1 penetram no novo hospedeiro, mas somente uma apresenta a capacidade de tornar uma população predominante, devido a características de crescimento biológico (amplificação seletiva). Esta hipótese é fundamentada pela homogeneidade encontrada em pacientes hemofílicos soroconvertidos que foram inoculados via parenteral com múltiplas variantes de HIV-1 (ZHANG *et al.*, 1993).

A distribuição das quasispécies muda com o passar do tempo. Diferenças entre o gene *env* do HIV-1 em indivíduos infectados, por um mesmo subtipo, apresentam taxas de variação em torno de 1% ao ano na região V3 em estudos longitudinais (DELWART *et al.*, 1994; DIAZ *et al.*, 1997). A razão de termos escolhido a região V3 (C2V3C3) para analisar consiste no fato que esta é uma região imunodominante, tem relação com o tropismo celular, escape imune e citopatogenicidade. A V3 é um dos domínios variáveis da gp120 do envelope viral, formada por 35 aminoácidos distribuídos dentro de uma alça formada pela ponte dissulfeto entre duas cisteínas (DE JONG *et al.*, 1992) e a região que engloba os dois domínios conservados num total de 235 aminoácidos. A alça V3 apresenta subdomínios relativamente conservados e subdomínios variáveis e vários estudos demonstram que o domínio V3 desempenha um papel importante na formação de sincício e no tropismo celular (DE JONG *et al.*, 1992; MILICH *et al.*, 1993). A presença de aminoácidos básicos (K ou R) na posição 306 e/ou 320 conferem ao vírus o fenótipo indutor de sincício (SI) enquanto aminoácidos ácidos (D ou E) ou neutros nestas posições conferem o fenótipo não indutor de sincício (NSI) (CHESEBRO *et al.*, 1991; DE JONG *et al.*, 1992; MILICH *et al.*, 1993). As cepas indutoras de sincício normalmente emergem no

curso da infecção e estão relacionadas com a progressão mais rápida da doença (GOUDSMIT 1995). Todos os indivíduos deste estudo apresentam cepas não indutoras de sincício em sua quasipécie, corroborando o fato de que estas pessoas estivessem próximas do seu período de infecção primária.

O presente estudo nos direciona para visualização da presença de seqüências homogêneas na análise da região *env* do HIV-1 de indivíduos recém infectados, sendo indistintos os padrões observados entre homens e mulheres. Como exposto na tabela 2, podemos observar que as seqüências das 10 amostras foram relativamente homogêneas com geralmente menos de 1% de variação em indivíduos com infecção recente tanto do sexo masculino como feminino. Este resultado está em desacordo com o apresentado por Long *et al* que encontrou maior diversidade genética entre mulheres africanas infectadas por HIV-1 de subtipo não B, por motivos descritos na introdução deste manuscrito. Desta forma, como descrito em estudos anteriores, acreditamos que haja sim esta seleção por genomas mais conservados a despeito da via de transmissão e gênero masculino e feminino. Entendemos ser importante a expansão deste estudo e a apresentação de novos estudos para que seja definitivamente clarificada esta questão.

Na análise das seqüências de aminoácidos encontramos seis pacientes que possuem a seqüência GPGR no topo da alça V3, semelhante ao padrão encontrado nas cepas do subtipo B caracterizadas nos EUA e Europa ocidental, e quatro pacientes com a seqüência GWGR, típico de cepas do subtipo B que tem sido caracterizadas no Brasil (MORGADO *et al.*, 1994 e LOUWAGIE *et al* 1994). Este tipo de padrão tem sido descrito desde o início da infecção no Brasil, sendo que o GWGR foi identificado em amostras desde 1983 (DIAZ *et al.*, 1995).

É interessante notar também o perfil diferente das amostras provenientes de

pacientes brasileiros com infecção recente, quando comparado com o consenso das seqüências americanas (Figura 5). Para os que acreditam que uma vacina anti-HIV eficaz deve respeitar a diversidade genética das cepas circulantes em um determinado local, este fato sugere que o perfil de um “candidato” à vacina a ser testado no Brasil deveria ser cuidadosamente escolhido à luz dos dados gerados em nosso meio, ao invés de se utilizar produtos produzidos em locais geograficamente muito distintos do nosso.

A partir da observação que isolados de HIV-1 podem ser diferenciados entre si, de acordo com suas seqüências genômicas, estudos abrangentes foram desenvolvidos para o estudo da variabilidade deste vírus. As análises de seqüências de HIV-1 obtidas de amostras de diferentes regiões do mundo revelaram que as que pertenciam às mesmas regiões geográficas eram muito mais similares entre si, do que amostras de outras regiões.

O fato de ter havido uma segregação consistente das amostras dos diferentes pacientes em grupos diferentes na árvore filogenética (exceção feita às amostras 11277 e 12277), apontam para o trabalho cuidadoso realizado na tentativa de se evitar contaminações por produto de PCR, fato este de risco quando se utiliza PCR do tipo “nested”, principalmente quando o PCR é otimizado para amplificar a partir de uma cópia do genoma viral, como deve ocorrer na utilização da estratégia de diluição limite final.

O fato de não possuímos informações relevantes dos dados epidemiológicos das amostras analisadas, não nos confere a capacidade de afirmar que as amostras 11277 e 12277 estejam epidemiologicamente relacionadas. A semelhança entre as seqüências de nucleotídeos e a segregação das seqüências na árvore filogenética seria um forte indicativo disto.

Um dos mecanismos geradores de diversidade é resultante da pressão seletiva positiva exercida pela resposta imune do hospedeiro, a qual vai variar segundo a região



genômica, sendo as regiões do *env* as mais expostas a esta pressão (BROWN e MENAGHAN 1998). A intensidade desta pressão seletiva pode ser determinada pela relação entre a frequência de mutações sinônimas e não sinônimas em cada gene (KIMURA *et al.*, 1980; NEI e GOJOBORI, 1986 ). Em caso de pressão seletiva neutra, a relação dS: dN é próxima de zero, sendo que quando há um predomínio de alterações não sinônimas a pressão é positiva, e negativa no sentido inverso. O que se observa em nossa casuística é que houve, no geral, uma tendência à baixa frequência de DN. Isto indica que nestes momentos iniciais da infecção pelo HIV, a pressão seletiva é modesta, o que levaria a um acúmulo de diversidade genética pequeno. Isto está de acordo com o fato de que o controle da replicação viral se dá vagarosamente, posto que os níveis basais de replicação viral medidos pela carga viral ("set point") dar-se-ão progressivamente, com estabilização em torno do sexto mês.

## 6-CONCLUSÕES

- 1- Os resultados indicam que não há diversidade genética significativa nas seqüências da região V3 da gp120 do *env*, confirmando a homogeneidade entre as seqüências no período próximo à infecção primária.
- 2- Em contraste com estudos anteriores, não há diferença significativa entre a diversidade genética de indivíduos do gênero masculino e feminino em amostras do subtipo B brasileiro.
- 3- 60% das amostras estudadas apresentam o padrão de seqüências semelhante às amostras dos EUA e Europa ocidental com relação à presença dos aa GPGR no topo da alça V3, enquanto 40% das seqüências apresentam o padrão GWGR.
- 4- As amostras estudadas foram uniformemente trópicas por macrófagos/monócitos e não indutoras de sincício, como ocorre normalmente em indivíduos com infecção primária.
- 5- O padrão evolutivo do vírus é neutro ou negativo no início da infecção, como se observa pela predominância de DS sobre DN.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALTIMORE, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*, **226**:1209-11, 1970.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNAIR, L. Isolation of a T- lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220** 868-71, 1983.

BROWN AL & MONAGHAN P. Evolution of the structural proteins of human immunodeficiency virus: selective constraints on nucleotide substitution. *Aids Res Hum Retroviruses* **4**:399-407, 1988

CHANH, T.C.; DREESMAN, G.R.; KANDA, P.; LINETTE, G.P.; SPARROW, J.T.; HO, D.D.; KENNEDY, R.C. Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Embo j.*, **5**:3065-71, 1986.

CHESEBRO, B.; NISHIO, J.; PERRYMAN, S.; CANN, A.; O'BRIEN, W.; CHEN, I. S.; *et al.* Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T leukemia cells, and macrophages. *J Virol*, v.65, p. 5782-5789, 1991.

CLAPPHAM, P.R. HIV and chemokines: LIGANDS SHARING CELL-SURFACE RECEPTOR. *Trends in Cell Biology*, **7**: 264-268, 1997.

CLAVEL, F.; GUETARD, D.; BRUNVEZINET, F; *et al.* Isolation of a new Human Retrovirus from west African Patients with AIDS. *Science*, **233**: 343-346, 1986.

COFFIN, J.; HAASE, J.A.; LEVY, J.A.; MONTAGNIER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N.; TEMIN, H.; TOYOSHIMA, K.; VARMUS, H.; VOGT, P.; WEISS, R. Human immunodeficiency viruses. *Science*, **232**:697, 1986.

COFFIN, J. M. Structure and classification of retrovirus. In: LEVY, J. A. The Retroviridae. New York: **Plenum Press**, 1992.

COFFIN, J. M.; HAASE, A.; LEVY, J.A.; MONTAGNIER, L.; OROZLAN, S. TEICH, N.; TEMIN, H. *et al.* Human Immunodeficiency viruses. *Science*, **232**:97, 1996.

CULLEN, B.R.; GREENE, W.C. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* **58**:423-6, 1989.

CULLEN, B.R. The role of Nef in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses. *Virology* **205**:1-6, 1994.

DALGLEISH, A.G.; CHANH, T.C.; KENNEDY, R.C.; KANDA, P.; CLAPHAM, P.R.; WEISS, R.A. Neutralization of diverse HIV-1 strains by monoclonal antibodies raised against a gp41 synthetic peptide. **Virology**, 165:209-15, 1988.

DENG, H.K.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTMAZ, D.; BURKHART, M.; DI-MARZIO, P.; MARMON, S.; SUTTON, R.E.; HILL, C.M.; DAVIS, C.B.; PEIPER, S.C.; SCHALL, T.J.; LITTMAN, D.R.; LANDAU, N.R. **Nature**, 381:661-6, 1996.

DE JONG, J. J.; DE RONDE, A.; KEULEN, W.; TERSMETTE, M.; GOUDSMIT, J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. **J Virol**, v. 66, p. 6777-6780, 1992.

DELASSUS S.; CHEYNIER R.; WAIN. HOBSONS. Evolution of human immunodeficiency virus type I Nef and long terminal repeat sequences over 4 years in vivo and in vitro. **J. Virol**, 65: 225-31, 1991.

DELWART E.L.; SHEPPARD H.W.; WALKER B.D.; GOUDSMIT J, MULLINS J. Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays. **J. Virol**, 68: 6672-83, 1994.

DELWART E.L.; BUSH M.P.; KALISH M.L.; MOSLEY J.W.; MULLINS J. Rapid molecular epidemiology of human immunodeficiency virus transmission. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, 11: 1081-93, 1995.

DENG, H.K.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTMAZ, D.; BURKHART, M.; DI-MARZIO, P.; MARMON, S.; SUTTON, R.E.; HILL, C.M.; DAVIS, C.B.; PEIPER, S.C.; SCHALL, T.J.; LITTMAN, D.R.; LANDAU, N.R. **Nature**, 381:661-6, 1996.

DIAZ R.S., HENDRY M., SABINO E *et al.* Genetic and antigenic heterogeneity of V3 region of HIV-1 from Brazilian homosexual males from 1983. **Interscience Conference on antimicrobial agents and chemotherapy**. p209, 1995.

DIAZ R.S.; SABINO E.C.; MAYER A.; MOSLEY J.W.; BUSCH M.P. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a transfusion recipient. **J. Virol**, 69: 3273-81, 1995.

DIAZ R.S.; SABINO E.C.; MAYER A.; OLIVEIRA C.F.; MOSLEY J.W.; BUSH M.P. Lack of dual HIV infection in a transfusion recipient exposed to two seropositive blood components. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 12:13, 1996.

DIAZ R.S.; ZHANG M.P.; BUSCH J.W.; MOSLEY J.W.; MAYER A. Divergence of HIV-1 quasispecies in an epidemiologic cluster. **AIDS**, 11: 415-22, 1997.

DIAZ R.S., BUSCH M.P. Human Immunodeficiency Viruses Scientific. **Basis of transfusion Medicine**, p. 502-13. Second edition.

ESPARZA J.; HEYWARD W.L.; OSMANOV S. HIV vaccine development from basic research to human trials. **AIDS**, 10(suppl):5 123-32, 1996.

EARL, P.L.; DOMS, R.W.; MOSS, B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87:648-52, 1990.

FELSENSTEIN J. Philip-phylogeny interference package (version 3.2). **Cladistics** 5, 164-6, 1989.

GALLO, R. C.; SALAHUDDIN, S. Z.; POPVIC, M.; SHEARER, G. M.; KAPLAN, M.; HAYNES, T.J.; PALKER, T. J.; REDFIELD, R.; OLESK, J.; SAFAL, B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. **Science**, 224: 500-3, 1984.

GENDELMAN, H.E.; ORENSTEIN, J.M.; BACA, L.M.; WEISER, B.; BURGER, H.; KAÇTER, D.C.; MELTZER, M.S. The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. **AIDS**, 3:475-95, 1989.

GELDERBLOM, H.R.; OZEL, M.; HAUSMANN, E.H.S.; WINKEL, T.; PAULI, KOCH, M.A. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV), immunolocalization of structural proteins and virus-cell relation. **Micron. Microscop.**, 19: 41-60, 1988.

GELDERBLOM, H.R.; OZEL, M.; PAULI, G. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relation. **Arch. Virol.** 106:1-13, 1989.

GIBBS, J.S.; DESROSIERS, R.C. Auxiliary protein of the primate immunodeficiency viruses. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** 10:343-50, 1994.

GOUDSMIT, J. The role of viral diversity in HIV pathogenesis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 10 Suppl 1, p. S15-19, 1995.

GURTLER L.G.; HAUSER P.H.; EBERLE J.; VON V A.; KNAPP S.; ZEKENG L, *et.al.* A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. **J. Virol**, 68:1581-5, 1994.

HO, D. D. HIV-1 dynamics in vivo. **J Biol Regul Homeost Agents**, v 9, 76-77, 1995.

JANSSENS R.S, SATTEN G.A, STRAMER S.L, RAWAL B.D, O'BRIE T.R, WEIBLEEN B.J, HECHT F.M, JACK N, CLEGHORN FR, KAHN J.O, CHESNEY M.A, BUSCH M.P. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. **JAMA**, 280(1):42-8, 1998.

JANVIER, K.; PETT, C.; LE ROUZIC, E.; SCHWARTZ, O.; BENICHO, S. HIV auxiliary proteins: an interface between the virus and the host. **AIDS 14(Suppl3):S21-30**, 2000.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.** 16:111-120.

LEARMONT, J.; COOK, L.; DUNCKLEY, H.; SULLIVAN, J.S. Update on long-term symptom-less HIV type 1 infection in recipients of blood products from a single donor. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, 11:1, 1995.

LEVY, J.A.; HOFFMAN, A.D.; KRAMER, S.M.; LANDIS, J.A.; SHIMABUKURU, J.M.; OSHIRO, L.S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, 225:840-2, 1984.

LEVY, J.A.; SHIMABUKURU, J. MCHUGH, T. CASAVANT, C.; STITES, D.; OSHIRO, L. AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. **Virology**, 147:441-8, 1985b.

LONG E.M.; MARTIN H.L.; KREISS J.K.; RAINWATER M.J.; LAVREYS L.; JACKSON D.J.; RAKWAR J.; MANDALIYA K.; OVERBAUGH J. Gender differences in HIV-1 diversity at time of infection. **Nature Medicine**. 6(1): 23-25, 2000.

LOUWAGIE J, DELWART E.L, MULLINS J I *et al.*, Genetic analysis of HIV-1 Isolates from Brazil Reveals Presence of two distinct Genetic Subtypes. **AIDS Res Hum.Retrov.**5: 561-567,1994.

LUCIW P.A, LEUNG. Nj *et al.* ,Genetic and biological comparisons of pathogenic and nonpathogenic molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIVmac) **AIDS Res Hum.Retrov** 8(3):395-402, 1992.

MANSKY, L.M.; TEMIN, H.M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than what predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. **J Virol**, v. 69, 5087-5094, 1995.

MCCCLUNE, J.M.; RABIN, L.B.; FEINBERG, M.B.; LIEBERMAN, M.; KOSEC, J.C.; REYES, G.R.; WEISMANN, I.L. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. **Cell**, 53:55-67, 1988.

MCKEATING J.A.; GOW J.; GOUDSMIT J.; PEARL L.H.; MULDER C.; WEISS R.A. Characterization of HIV-1 neutralization escape mutants. **AIDS**, 3: 777-84, 1989.

MCKNIGHT A.; CLAPHAM P.R. Immune escape and tropism of HIV. **Trends microbial**, 3: 356-61,1995.

MILICH L.; MARGOLIN .B.; SWANSTROM R. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. **J Virol**, 67, 5623-34, 1993.

MORGADO M.G.; SABINO E.C.; SHAPAER E.G, *et. al.* V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from the North american/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res Hum Retroviruses** 10: 567-569, 1994.

MYERS G.; BKORBER S.; WAIN H.; SMITH R.F.; PAVLAKIS G.N. Eds Human Retroviruses and AIDS. **Los Alamos NM**: Los Alamos National Laboratory, 1995.

NAJERA I.; HOLGUIN A.; QUINONES -MATEU M.E.; MUNOZ FERNANDEZ M.A.; NAJERA R.; LOPEZ-GALINDEZ C, *et.al.* Pol gene quasispecies of immunodeficiency virus mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. **J. Virol**, 69: 23-31,1995

NAYLOR, P.H.; NAYLOR, C.W.; BADAMCHIAN, M.; WADA, S.; GOLDESTEN, A.L.; WANG, S.S.; SUN, D.K.; THORNTON, H.A.; SARIN, P.S. Human immunodeficiency virus contain na epitope imunoreactive with thymosin alpha-1 and the 30-amino acid synthetic p17 group-specific antigen peptide HGP-30.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84:2951-5, 1987.

NEIM, GOJOBORI. T Simple Methods for estimating the number of synonymous and nonsinonamous nucleotide substitutions. **Mol Biol Evol** 3:418-426,1986.

NOWAK M.A; ANDERSON R.M ;MCLEAN A. R *et al.* Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS. **Science** 254:963, 1991.

OZEL, M.; PAULI, G.; GELDERBLOM, H.R.; The organization of the envelope projections on the surface of VIV. **Arch. Virol.**, 100:255-66, 1988.

PANGANIBAN, A. & FIORE, D. Ordered interstrand and intrastrand DNA tranfer during reverse trancription. **Science**, 241:1064-9, 1988.

PEETERS M. Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. In; Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos National laboratory, **Los Alamos, NM**, 2000.

PINTER, A; HONENN, W.J.; TILLEY, S.A; BONA, C.; ZAGHOUANI, H.; GORNY, M.K.; ZOLLA-PAZNER, S. Oligomeric struture of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. **J. Virol.**, 63:2674-9, 1989.

POPVIC, M. ; SARNGADHARAN, M.G.; READ, E.; GALLO, R.C. Detection, isolation and continuos production of cytopathic retroviruses (HTLV-III). **Scienc**, 224: 497-500, 1984.

POMERANTZ, R.J.; SESHAMMA, T.; TRONO, D. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of V<sub>er</sub>: potential implications for latency. **J. Virol.**;66:1809-13, 1992.

POSS, M *et al.*, Diversity in virus populations from genital secretions and peripheral blood from women recently infected with human immunodeficiency virus type 1. **J. Virol.**;69:8118-8122, 1995.

RATNER L, GALLO R.C, WONG STALL F. HTLV III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. **Nature** 313 (6004):636-7, 1985.

REITZ M.S, J.R.; HALL L.; ROBERT-GUROFF M.; LAUTENBERGER J.; HANN B.M.; SHAW G.M.; KONG L.I.; WEISS S.H.; WATE R.S D.; GALLO R.C, *et.al.* Viral variability and serum antibody response in a laboratory worker infected with HIV type 1 (HTLV type IIIB). **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, 10:1143-55, 1994

SALAHUDDIN, .S.Z.; MARKHAM, P.D.; POPOVIC, M.; SARNGADHARAN, M.G.; ORNFORFF, S.; FLADAGAR, A; PATEL, A; GOLD, J.; GALLO, R. C. Isolation of infection human T-cell leukemia/lymphotropic virus type III (HTLV-III) from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related complex (ARC) and from healthy carriers: a study of risk groups and tissue sources. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82:5530-4, 1985.

SARIN, P.S.; SUN, D.K.; THORNTON, H.A.; NAYLOR, P.H.; GOLDESTINE, A.L. Neutralization of HTLV-III/LAV replication by antiserum to thymosin alpha 1. **Science**, 232:1135-7, 1986.

SARNGADHARAN, M.G.; POPOVIC, M.; BRUCH, L.; SCHUPBACH, J.; GALLO, R.C. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. **Science**, 224: 506-8, 1984.

SCHUPBACH, J.; POPVIC, M.; GILDEN, R. V.; GONDA, M. A; SARNGADHARAN, M. G.; GALLO, R.C. Serological analyses of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. **Science**, 224:503-5, 1984.

SHERIDAN, P.L.; SHELINE, C.T.; MILOCO, S.H.; JONES, K.A. Tat and the HIV promoter: a model for RNA-mediated regulation of transcription. **Semin. Virol.**, 4:69-80, 1991.

SIMMONDS P.; BALFE P.; LUDLAM C.A.; BISHOP J.O.; LEIGH-BROWN A.J. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. **J. Virol**, 64: 5840-50, 1990.

SIMON F.; MAUCLERE P.; ROQUES P.; LOUSSERT-AJAKA I; MULLER TRUTWIN M.C.; SARAGOSTI S, *et.al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nat. Med**, 4: 1032-7, 1998.



TEMIN, H.M.; & MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. **Nature**, 226:1211-3, 1970.

THOMPSON J.D.; GIBSON T.J.; PLEWNIAK F.; JEANMOUNG F.; HIGGINS D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, 25: 4876-82, 1997.

VARMUS, H. E. & SWANSTROM, R. Replication of retrovirus. In: Weiss, R., TEICH, N.; VARMUS, H.; COFFIN, J. **RNA tumor Viruses**. New York, Cold Spring Harbour Laboratory, 75-134, 1985.

WEISS, C.D.; LEVY, J.A.; WHITW, J.M. Oligomeric organization of gp120 on infections human immunodeficiency virus type 1 particles. **J. Virol.**, 64:5674-77, 1990.

WEISS R.A. How does HIV cause AIDS? **Science**, 260: 1283-9, 1993.

WOLFS T.F.W.; ZWART G.; BAKKER M, et al. Naturally occurring mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenic variation dependent on a single amino acid substitution. **Virology**, 185: 195, 1991.

WOLINSKY S.M.; WILKE G.M.; KORBER B.T, *et al.* Selective transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants from mothers in infants. **Science**, 255: 1134, 1992.

ZHANG L.Q.; MACKENZIE P.; CLELAND A.; HOLMES E.C.; LEIG BROWN A.J.; SIMMONDS P. Selective for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. **Journal Virology**, 67: 3345-56, 1993.

ZHU T.; MO H.; WANG N, *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. **Science**, 261: 1179-1181, 1993.

São Paulo, 26 de Março de 2003

Ao Departamento de comitê de ética da USP

Conforme solicitado, estou enviando minha tese de mestrado intitulada: Diversidade genética do HIV-1 em indivíduos com infecção recente, apresentada ao departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas em 26-02-2003 como relatório final deste trabalho.

Atenciosamente



Nancy Alves de Lima Gouvea