



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO 1 (HIV-1) NO
MUNICÍPIO DE MACAPÁ (AMAPÁ), BRASIL**

MÁRCIO RONALDO CHAGAS MOREIRA

BELÉM-PARÁ
2007

MÁRCIO RONALDO CHAGAS MOREIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1 (HIV-1) NO MUNICÍPIO DE
MACAPÁ (AMAPÁ), BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ishak.

BELÉM-PARÁ
2007

MÁRCIO RONALDO CHAGAS MOREIRA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO 1 (HIV-1) NO
MUNICÍPIO DE MACAPÁ (AMAPÁ), BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ishak
Departamento de Patologia, CCB, UFPA.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Departamento de Patologia, CCB, UFPA.

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Departamento de Patologia, CCB, UFPA.

Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos
Departamento de Genética, CCB, UFPA.

Profa. Dra. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak (Suplente)
Departamento de Patologia, CCB, UFPA.

Belém - PA, 18 de janeiro de 2007.

EPIGRAFE

“Há um dom acima de todos os outros que torna o homem único entre os animais [...] O imenso prazer de exercer e aprimorar sua habilidade [...] A descoberta é uma dupla relação de análise e síntese juntas. como análise, ela sonda à procura do que existe [...] Como síntese, une as partes de maneira que a mente criativa transcenda o esqueleto simples fornecido pela natureza”.

Jacob Bronowski

DEDICATÓRIA

À minha mãe D. Maria José, tradução de
força de vontade e esperança, o melhor
refúgio;

À minha esposa e filhos, que sempre me
apoiaram;

Ao amigo, Prof. Dr. Luiz Fernando
Machado, luz sempre presente nesta
caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor, Dr. Ricardo Ishak, idealizador e responsável por este curso de Pós-graduação e que me acolheu enquanto orientador.

Governo do Estado do Amapá – GEA

Secretaria de Estado da Saúde – SESA

Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN/AP

Coordenação Estadual de DST e AIDS/AP

Escola de Administração Pública – EAP/AP

Laboratório de Virologia – UFPA

E a todos que contribuíram, de forma direta, e indireta com este estudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 A FAMÍLIA <i>Retroviridae</i>	10
1.2 O <i>Vírus da imunodeficiência humana</i> (HIV)	10
1.2.1 A Origem do HIV	11
1.3 BIOLOGIA DO HIV-1	13
1.3.1 Aspectos Morfológicos do HIV-1	13
1.3.2 Organização Genômica do HIV-1	14
1.3.3 Replicação do HIV-1	19
1.4 IMUNOPATOGÊNESE DO HIV-1	21
1.5 ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA DO HIV-1	22
1.5.1 Modos de transmissão do HIV-1	25
1.5.2 Diagnóstico laboratorial	27
1.5.3 Prevenção e controle	28
1.5.4 Epidemiologia molecular do HIV-1	30
1.6 OBJETIVOS	34
1.6.1 Objetivo Geral	34
1.6.2 Objetivos Específicos	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 POPULAÇÕES EXAMINADAS	35
2.2 COLETA DAS AMOSTRAS	35
2.3 EXTRAÇÃO DO DNA	36
2.3.1 Lise Celular	36
2.3.2 Precipitação de Proteínas	37
2.3.3 Precipitação do DNA	37
2.3.4 Hidratação do DNA	38
2.4 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR)	38
2.4.1 Amplificação do Gene <i>pro</i>	38
2.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR	39

2.6	SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	40
2.6.1	Precipitação do DNA Seqüenciado	41
2.6.2	Eletroforese do DNA Seqüenciado	42
2.6.2.1	Montagem das Placas de Vidro	42
2.6.2.2	Polimerização do Gel	42
2.7	ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	44
2.7.1	Edição e Alinhamento das Seqüências	44
2.7.2	Análise das Seqüências Nucleotídicas	44
2.7.3	Análise Estatística	44
3	RESULTADOS	45
4	DISCUSSÃO	52
4.1	INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS	52
4.2	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1	53
4.2.1	Caracterização do Subtipo B e do Subtipo F	53
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
	ANEXOS	

RESUMO

Uma das principais características do *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) é sua grande diversidade genética. O presente trabalho tem como objetivo descrever a epidemiologia molecular do HIV-1 circulante na cidade Macapá, Amapá, assim como os fatores associados à aquisição da infecção e correlacionar estes com os subtipos virais encontrados e as informações epidemiológicas da população examinada. Amostras de sangue de 48 indivíduos portadores do HIV foram colhidas no Serviço de Assistência Especializada (SAE) da cidade de Macapá, no período de junho de 2003 a junho de 2004. Após a extração do DNA, foi realizada a amplificação de 297 pb da protease (gene *pro*) por meio da técnica de *Nested* PCR, sendo seqüenciadas, posteriormente, para a determinação dos subtipos virais. Foram identificados os subtipos B (93,7%) e F (6,3%) na cidade de Macapá, que são os mais prevalentes no Brasil, não tendo sido observada associação entre os subtipos do HIV-1 circulantes nesta cidade e a preferência sexual. No entanto, uma parcela significativa da população examinada possui um baixo grau de escolaridade, característica esta que reflete a maior parcela população infectada pelo HIV no Brasil.

ABSTRACT

One of the main characteristics of Human immunodeficiency virus (HIV) is its great genetic diversity. The present work has as main objective the description of the molecular epidemiology of HIV-1 circulating in the city of Macapa, Amapa, as well as the factors associated with the infection and to correlate these with the viral subtypes found and the epidemiological data of the investigated population. Blood samples from 48 subjects bearers of the HIV were collected in the Service of Specialized Assistance (SSA) in the city of Macapa, in the mean time of June 2003 to June 2004. After the DNA extraction, was performed an amplification of 297 bp from the protease (gene *pro*) by means of the *Nested PCR* assay, being sequenced, afterwards, for the determination of the viral subtypes. Were identified the subtypes B (93.7%) and F (6.3%) in the city of Macapa which are the most prevalent in Brazil, and was not observed an association between the subtypes of HIV-1 circulating in this city with sexual preferences. Although, a significant part of the population examined has a low degree of scholaryty, characteristic which reflects the majority of the population infected with HIV in Brazil.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA RETROVIRIDAE

Os retrovírus são vírus que infectam animais e podem estar associados ao câncer e a doenças imunossupressoras (Gallo, 2002). Apresentam como genoma ácido ribonucléico (RNA) e que, por meio da enzima DNA polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa – RT), são capazes de copiar seu genoma de RNA em uma dupla fita de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira (Baltimore, apud Sabino & Saéz-Alquézar, 1999, p.1).

Atualmente, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral reconhece sete gêneros distintos dentro da família *Retroviridae*, de acordo com os aspectos de seqüência nucleotídica e de estrutura genômica: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus* (Coffin, 1996).

A partícula viral, com um diâmetro de cerca de 110 nm, tem um *core* em formato de cone composto da proteína p24 . Dentro deste capsídeo estão contidas duas moléculas de RNA de fita simples, idênticas, de aproximadamente 9.2 kilobases (Kb) cada e polaridade positiva. As enzimas virais TR, integrase e protease estão também contidas no nucleocapsídeo (Luciw, 1996; Fortin *et al.*, 1997).

1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

Os primeiros casos de uma entidade atualmente conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) foram identificados em 1981, quando um padrão incomum de sintomas foi observado entre um pequeno número de homens homossexuais nos Estados Unidos (Brennan & Durack, 1981; Gottlieb *et al.*,

1981). Posteriormente, foram relatados casos de AIDS em outros grupos, incluindo usuários de drogas intravenosas e suas parceiras sexuais, os hemofílicos e as crianças filhas de mães com a síndrome (Masur *et al.*, 1981; CDC, 1982; Davis *et al.*, 1983).

Em 1983, pesquisadores franceses isolaram um novo retrovírus do linfonodo de um homem com a síndrome de linfadenopatia persistente (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983), ao tempo em que médicos suspeitaram que a síndrome estivesse associada com a AIDS. O vírus foi isolado de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes adultos e crianças com AIDS nos Estados Unidos (Levy *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984). Para aquele momento, três nomes foram usados para o mesmo vírus, sendo que em 1986, o novo retrovírus foi renomeado como *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) (Coffin *et al.*, 1986).

1.2.1 A Origem do HIV

As análises filogenéticas, realizadas em diversas partes do globo, revelam que existem dois tipos de HIV, chamados de HIV-1 e HIV-2. As evidências indicam que o vírus entrou na população humana, a partir de transmissões zoonóticas do *Vírus da imunodeficiência de símios* (SIV) entre primatas não humanos e humanos (Gao *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2000; Holmes, 2001).

O HIV-1 é, filogeneticamente, mais próximo do SIV de chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*), enquanto o HIV-2 está mais relacionado ao SIV encontrado em macacos mangabeus fuligentos (*Sooty mangabey*). A transferência de lentivirus de outras espécies de primatas não-humanos a humanos pode ocorrer periodicamente por meio do contato estreito como, por exemplo, por meio da caça e exportação desses animais (Schrag *et al.*, 1995). O ancestral do HIV-1 foi estudado por meio do SIVcpz

infectando chimpanzés, no Oeste da África Central, mas a origem de SIVcpz permanece desconhecida (Gao *et al.*, 1999; Peeters *et al.*, 2001; Weiss, 2001).

O HIV-1 exibe um extraordinário grau de variabilidade genética e foi classificado, baseado nas relações filogenéticas, em grupos, subtipos, subsubtipos e formas recombinantes circulantes (CRF). Três grupos distintos foram descritos: M, N e O. O grupo M (*major*), o qual contém a maioria dos subtipos da pandemia do HIV-1; grupo O (*outline*), assim como o grupo N (*new*), compreendem cepas altamente divergentes. A grande maioria das cepas responsáveis pela pandemia da AIDS pertence ao grupo M, tendo sido identificados nove subtipos genéticos (A-D, F-H, J, e K), quatro sub-subtipos (A1, A2, F1 e F2) e 34 formas recombinantes circulantes (CRF), sendo as mais comuns as CRF02_AG e CRF01_AE (Robertson *et al.*, 1999; Carrion *et al.*, 2003; Pinto & Struchiner, 2006, *HIV Sequence Database*, 2006).

De forma similar, os isolados de HIV-2 também são classificados em subtipos genéticos, podendo ser categorizados como subtipos epidêmicos (A e B) e como subtipos não-epidêmicos (C, D, E, F e G) (Sarr *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2000; Lemey *et al.*, 2003), apresentando, ainda, uma única forma recombinante, a A/B.

A existência de pelo menos três grupos do HIV-1 e sete subtipos do HIV-2 sugere que a transmissão zoonótica do SIVcpz e SIVsm a humanos, embora raro, tenha ocorrido em baixas taxas por milhares de anos (Gisselquist, 2003). Algumas evidências demonstram que a diversificação de todos os subtipos do grupo M, ocorreu em tempos recentes, há mais ou menos 50 anos atrás. As análises evolucionárias dos grupos M, N e O, em comparação aos isolados de SIVcpz, indicam que estes grupos do HIV-1 representam três transferências distintas de chimpanzés a humanos (Weiss & Wrangham, 1999).

A identificação de subtipos e de CRF fornece meios de acompanhar a disseminação do HIV-1 seguindo a pandemia pelo mundo. A maioria dos subtipos e CRF estão presentes no continente africano, visto que em outras regiões poucos subtipos ou CRF são predominantes. Esta distribuição sugere, indiretamente, que a propagação inicial do HIV-1 para o exterior da África foi iniciada por poucos indivíduos. A disseminação inicial da pandemia em uma área previamente não infectada é geralmente caracterizada por um efeito fundador (Perrin *et al.*, 2003).

O HIV-1 apresenta extensa variabilidade genética devido à alta taxa de erros da TR, a rápida circulação de vírus em indivíduos infectados e a possibilidade de recombinação, é gerada por pressão da resposta imune do hospedeiro e por drogas antivirais (Gadelha *et al.*, 2003).

1.3 A BIOLOGIA DO HIV-1

1.3.1 Aspectos Morfológicos do HIV-1

O HIV-1 possui forma esférica com diâmetro de, aproximadamente, 110 nm. Apresenta um envelope lipoprotéico que, por sua vez, envolve um capsídeo protéico de simetria icosaédrica, o qual contém duas cópias idênticas do genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva no interior de um cerne. O vírus também contém as enzimas TR, protease e integrase, bem como duas cópias de RNA transportador (tRNA) (Murray *et al.*, 1998).

A porção interna do envelope viral é circundada pela proteína p17, que forma a matriz da estrutura viral. A superfície viral é feita de 72 espículas representando trímeros ou tetrâmeros de glicoproteínas (gp) complexas. Cada espícula consiste de uma proteína do envelope de superfície externa, a gp120, interagindo não covalentemente

com a proteína transmembrana, a gp41, que cruza a bicamada lipídica do envelope. O envelope também contém proteínas adquiridas durante o brotamento do vírus, incluindo a molécula de adesão intracelular (ICAM), microglobulina - β_2 e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) das classes I e II (Luciw, 1996; Fortin *et al.*, 1997; Rizzuto & Sodroski, 1997; Figura 1).

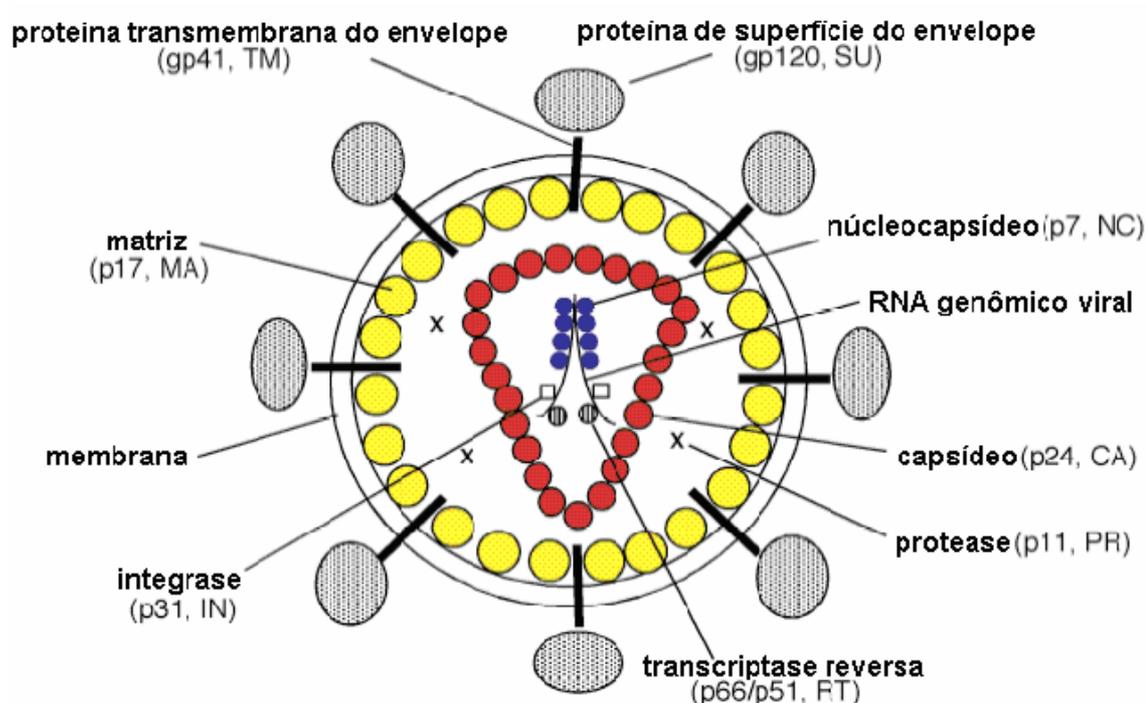


Figura 1 – Figura esquemática da organização HIV-1 (Adaptado de Freed, 1998).

1.3.2 Organização Genômica do HIV-1

No interior da partícula viral, proteínas estruturais envolvem um *core* interno que contém enzimas e proteínas requeridas para a replicação viral, assim como o genoma do mesmo. Este possui, aproximadamente, 10 Kb em tamanho e consiste de três genes estruturais (*gag*, *pol*, e *env*), característicos de todos os retrovírus, e seis

genes funcionais ou acessórios (*nef*, *vif*, *vpr*, *rev*, *tat* e *vpu*), flanqueados por duas regiões conhecidas como *Long Terminal Repeats*, *LTR* (Luciw, 1996; Figura 2).

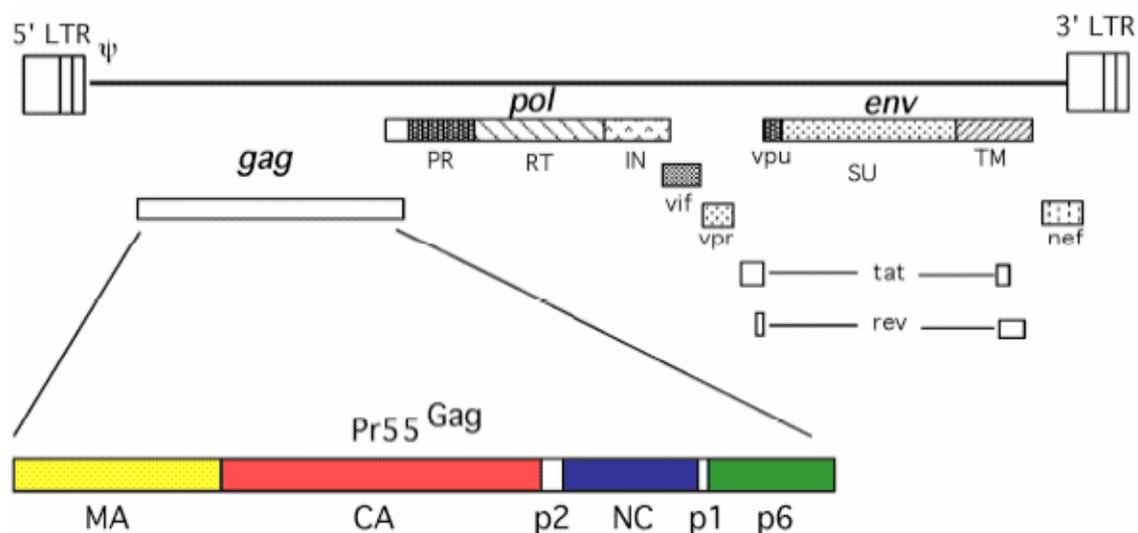


Figura 2 – Representação esquemática da organização genômica do HIV-1, mostrando os genes funcionais e estruturais (Adaptado de Freed, 1998).

O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do *core* viral. O gene *env* codifica as glicoproteínas gp120 e gp41, essenciais para a ligação e entrada do vírus na célula hospedeira. O gene *pol* codifica as enzimas virais TR, integrase e protease. Dois outros genes essenciais para a replicação viral que são o *tat* e o *rev*, que agem para facilitar a transcrição de genes virais. Além disso, genes acessórios *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*, embora não essenciais para a replicação viral *in vitro*, contribuem para a capacidade de replicação *in vivo*. Estes genes acessórios são únicos para lentivirus e não aparece nos genomas dos retrovírus oncogênicos (Sleasman & Goodenow, 2003).

O gene *gag* codifica a proteína precursora p55, que mais adiante é clivada pela protease viral nas proteínas estruturais p24, p17, p7 e p6. O gene *pol*

codifica para um precursor da proteína que após clivagem proteolítica, resulta em três enzimas virais: protease (p15), RT (p66/51) e integrase (p32). O gene *env* codifica para o precursor da gp160, proteoliticamente clivada em duas proteínas do envelope, gp120 e gp41.

Além disso, para estes genes, o genoma do HIV-1 codifica proteínas acessórias com funções importantes para a replicação viral e infecção (Cullen, 1998; Emerman & Malin, 1998). A proteína Tat (Transativador transcricional) inicia e/ou estabiliza o alongamento do mRNA viral transcrito por ligação a um local especial chamado TAR (região respondora Tat) localizada no LTR. Tat é a principal proteína envolvida na regulação da replicação do HIV. A proteína Rev (regulação da expressão viral) interage com uma estrutura chamada RRE (elemento respondor de Rev) localizado no gene *env*. Esta interação permite que o *unspliced* mRNA entre no citoplasma a partir do núcleo e origine sequências completas de proteínas virais necessárias para a produção da progênie. A proteína Nef é uma das primeiras proteínas do HIV-1 a ser produzida nas células infectadas e é a mais imunogênica das proteínas acessórias. Nef tem pelo menos três atividades distintas nas células infectadas: regulação supressora na superfície das células CD4⁺ e das moléculas de CHP da classe I e aumento da infectividade do vírus (Harris, 1998).

A proteína Vif parece ser importante para a transmissão célula-célula do vírus. Isto tem sido reportado por ser crucial para a síntese do DNA proviral e envolve o estágio final do empacotamento do *core* nucleoprotéico (von Schwedler *et al.*, 1993; Höglund *et al.*, 1994). A proteína Vpr afeta a localização nuclear do ácido nucléico viral em células não divisoras e células indutoras de diferenciação (Levy, *et al.*, 1993; Heinzinger, *et al.*, 1994; Zao, *et al.*, 1994), enquanto a proteína Vpu aumenta a

liberação do vírus e degrada $CD4^+$ no retículo endoplasmático (Klimkait *et al.*, 1990; Willey *et al.*, 1992; Emerman & Malin, 1998). As proteínas Vpr, Vif e Nef são encontradas na partícula viral (Frankel & Young, 1998; Tabela 1).

Tabela 1 – Principais características dos genes do HIV-1 e seus produtos.

Gene	Produto(s)	Tamanho	Funções
<i>gag</i>	Matriz (MA)	p17	Interage com Env; transporte nuclear
	Capsídeo (CA)	p24	Proteína do capsídeo
	Nucleocapsídeo (NC)	p6	Liga-se ao Vpr
		p7	Liga-se ao RNA viral
<i>pol</i>	Protease (PRO)	p15	Clivagem da poliproteína Gag-Pol e
	Transcriptase reversa	p66, p51	maturação do vírus
	(RT), RNase H	p32	Transcrição reversa e ação de ribonuclease
	Integrase		Integração do DNA proviral
<i>env</i>	Envelope	gp120	Glicoproteína viral externa que se liga ao
		gp41	CD4 ⁺ Glicoproteína transmembrana. Ligante viral secundário
<i>tat</i>	Tat	p16/p14	Transativador transcricional viral
<i>rev</i>	Rev	p19	Transporte de RNA viral e estabilidade da partícula
<i>vif</i>	Vif	p23	Promove maturação e infectividade viral
<i>vpr</i>	Vpr	p10-15	Promove localização nuclear do complexo de pré-integração e inibe a divisão celular
<i>vpu</i>	Vpu	p16	Promove a saída das partículas virais e degrada o CD4 ⁺ no retículo endoplasmático rugoso
<i>nef</i>	Nef	p27-p25	Diminui a quantidade das moléculas de CD4 ⁺ e CPH de classe I

Fonte: Kuiken *et al.* (2001).

1.3.3 Replicação do HIV-1

O ciclo de replicação do HIV-1, bem como, de todos os membros da família *Retroviridae*, pode ser considerado como uma seqüência de eventos que são regulados por proteínas virais e celulares (Luciw, 1996; Freed, 1998; Figura 3).

Inicialmente, ocorre a adsorção da gp120 viral à glicoproteína de superfície celular CD4 presente, principalmente, nos linfócitos auxiliares, nos monócitos, nos macrófagos, nas células dendríticas e da micróglia cerebral, que funciona como o receptor de membrana celular para o vírus (Wyatt & Sodroski, 1998; Douek *et al.*, 2002).

Após a ligação inicial entre as moléculas gp120 e CD4, ocorre uma mudança conformacional na gp120, que promove a interação entre esta e uma molécula receptora de quimiocinas, como a CCR5 e a CXCR4 (Rizzuto *et al.*, 1998; Tscherning *et al.*, 1998).

A entrada do vírus é seguida pela perda do capsídeo e pela liberação do genoma viral, no citoplasma da célula alvo, etapas estas, ainda, não muito bem compreendidas (Emerman & Malim, 1998; Turner & Summers, 1999).

Posteriormente à liberação do ácido nucléico viral, ocorre uma série complexa de eventos, que se inicia com a transcrição reversa do genoma viral (Turner & Summers, 1999). Nesta etapa, ocorre a transcrição de uma molécula de DNA de fita simples, a partir de uma molécula molde de RNA viral, por meio da enzima TR. Após isto, a própria TR, que também possui a ação de ribonuclease (RNase H), degrada a fita molde de RNA e duplica a fita simples de DNA recém-sintetizada (Götte *et al.*, 1999).

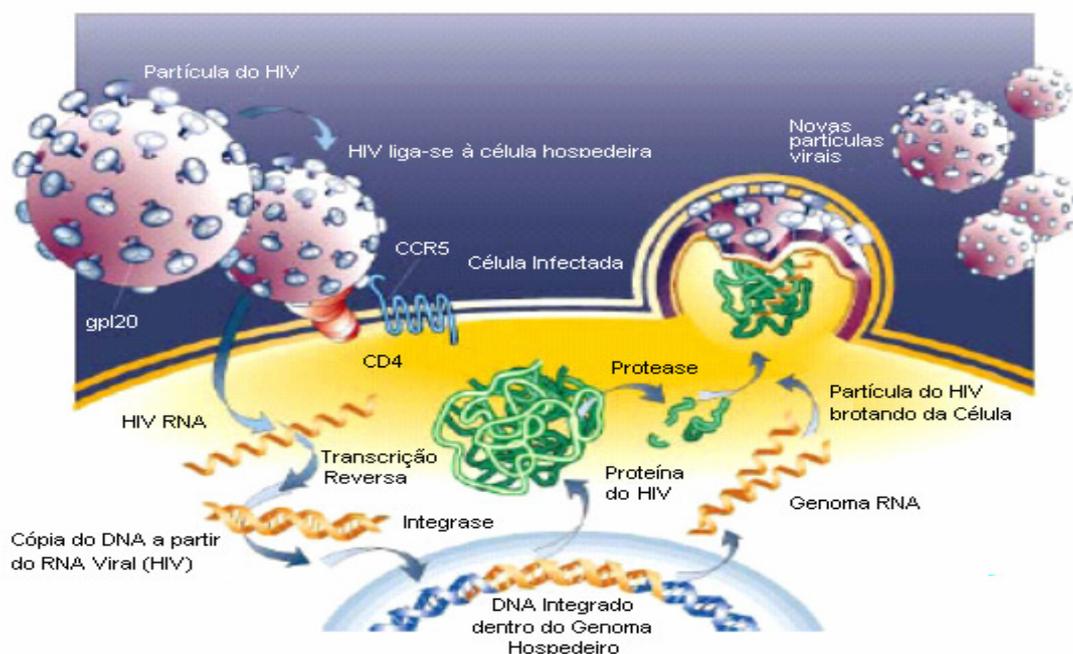


Figura 3 – Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1 (Adaptado de http://www.aids.gov.br/manual_carga_viral).

Finalmente, a molécula de DNA proviral é transportada para o núcleo, sob a forma de um complexo de nucleoproteínas e ligada covalentemente ao genoma da célula hospedeira, pela atividade catalítica da integrase (Daniel *et al.*, 1999; Turner & Summers, 1999).

Após a produção de proteínas e a síntese de RNA viral, a montagem e o brotamento da partícula viral ocorrem simultaneamente. É por meio desse processo de brotamento que a partícula viral incompleta adquire o envelope (Coffin, 1996b). Muitas proteínas de superfície celular, incluindo as moléculas de adesão, também são incorporadas, juntamente, com as glicoproteínas do envelope (Wyatt & Sodroski, 1998).

1.4 IMUNOPATOGENESE DO HIV-1

Em 50 a 70% dos pacientes com infecção primária pelo HIV-1, uma síndrome semelhante à mononucleose aguda se desenvolve em aproximadamente três a seis semanas após o início da infecção. Este período é associado com altos níveis de viremia. O HIV-1 é largamente disseminado durante esta fase inicial da infecção, sugerindo fortemente que o curso subsequente da infecção pelo HIV-1 pode ser influenciado pelo aparecimento do vírus, particularmente nos órgãos linfóides, durante este curto período (Schwartz & Nair, 1999).

A infecção em adultos pelo HIV-1 resulta em três períodos clínicos comuns, que são o agudo, o assintomático e o estágio final da doença, apesar da interação do patógeno com o sistema imune. Um ponto de partida é estabelecido no estágio agudo e é imaginado para determinar a velocidade da progressão da doença. O estágio final da doença resulta em três cenários comuns da doença. Não Progressores à Longo Prazo (LTNP) são pequenos percentuais da população infectada (5%-10%) onde se esquia da progressão típica da AIDS sem a ajuda da terapia de antiretrovirais por longos 20 anos. Em contraste, indivíduos cujos níveis de células T CD4⁺ diminui abaixo de 200 células/ μ L após 8 a 10 anos de período assintomático, visto que a carga viral plasmática, no estágio final da doença aumenta exponencialmente, estes são progressores típicos. Finalmente, alguns indivíduos desenvolvem AIDS dentro de três a cinco anos após infecção inicial e são conhecidos como rápidos progressores. Neste caso, um declínio não usual da contagem de linfócitos T CD4⁺ pode ser causado por infecção com uma cepa particularmente citopática ou pode ocorrer em indivíduos onde são mais susceptíveis para AIDS baseados sobre fatores tais como o estado imune, o tempo de infecção, a idade e o perfil genético (Bajaria *et al.*, 2002).

1.5 ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA DO HIV-1

A identificação dos primeiros casos de AIDS tornou-se um marco na história da humanidade. A epidemia da infecção pelo HIV-1 e da AIDS representa fenômeno global, dinâmico e instável, cuja forma de ocorrência nas diferentes regiões do mundo depende, entre outros determinantes, do comportamento humano individual e coletivo. A AIDS destaca-se entre as enfermidades infecciosas emergentes pela grande magnitude e extensão dos danos causados às populações e, desde a sua origem, cada uma de suas características e repercussões tem sido exaustivamente discutida pela comunidade científica e pela comunidade em geral (Brito *et al.*, 2000).

A UNAIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam até ao final de 2006, menos de 3 milhões de pessoas morreram de HIV/AIDS. E pouco mais de 4 milhões de pessoas adquiriram novas infecções pelo HIV-1, a estimativa geral é de 39,5 milhões o número de pessoas vivendo com o vírus no mundo.

Mais de 1,7 milhões de pessoas estão vivendo com o HIV-1 na América Latina. A epidemia no Brasil está dispersa em todas as regiões do vasto continente brasileiro, tornando-se mais variada, com as mulheres sendo cada vez mais afetadas (UNAIDS/WHO, 2006; Figura 4).



Figura 4 – Número estimado de pessoas infectadas com o HIV-1, no mundo (Adaptado de UNAIDS/WHO, 2006).

No Brasil, na primeira metade da década de 80, a epidemia HIV/AIDS manteve-se basicamente restrita às regiões metropolitanas do sudeste e sul do país, sendo suas principais vias de transmissão a sexual (subcategoria homossexual), a sangüínea, a transfusão de sangue e hemoderivados e uso de drogas injetáveis. Nos últimos anos da década de 80 e início dos anos 90, a epidemia assumiu um outro perfil. A transmissão heterossexual passou a ser a principal via de transmissão do HIV-1, a qual vem apresentando maior tendência de crescimento em anos recentes, acompanhada de uma expressiva participação das mulheres na dinâmica da epidemia (BRASIL/MS, 2002).

Como resultado das profundas desigualdades da sociedade brasileira, a propagação da infecção pelo HIV-1 no país revela epidemia de múltiplas dimensões que vem, ao longo do tempo, sofrendo transformações significativas em seu perfil epidemiológico. O aumento da transmissão por contato heterossexual resulta em crescimento substancial de casos em mulheres, o que vem sendo apontado como o mais importante fenômeno para o atual momento da epidemia (Brito *et al.*, 2000).

A epidemia da AIDS no Brasil está estimada em aproximadamente 600.000 mil pessoas vivendo com o HIV e AIDS, número que permanece estável desde 2.000. Observa-se entre os idosos com 50 anos ou mais, uma tendência de crescimento da epidemia. Na população masculina há discreta queda na taxa de incidência para cada cem mil, que era de 22,5 em 1996 e foi para 21,9 em 2005. Entretanto, observa-se ainda o crescimento da epidemia em mulheres, que saltou de 9,3 para 14,2 em 2005. Nas mulheres com mais de 30 anos, há aumento em todos os grupos de idade, confirmando o crescimento do número de casos de AIDS na população feminina, observado a partir da década de 1990. A razão dos casos de AIDS entre gêneros mostram sinais de estabilização nos últimos anos. Em 2005, a razão foi de 1,5 casos em homem para 1 em mulher. Nas regiões brasileiras, apenas no sudeste observa-se queda na taxa de incidência, nas demais regiões, o crescimento da epidemia ainda é pronunciado. Segundo a categoria de exposição, nos homens observa-se diminuição nos casos entre os homossexuais e aumento entre os bissexuais e heterossexuais. Nas mulheres, a epidemia segue com a característica de ser quase totalmente de transmissão heterossexual (Boletim Epidemiológico, 2006)

Quanto à taxa de mortalidade por AIDS no país vem mostrando uma tendência de queda desde que passou de 9,6 em 1996 para 6 em 2005. Essa tendência

estável se deve, principalmente, à introdução e à garantia de acesso do tratamento anti-retroviral de alta eficácia (*Highly Active Antiretroviral Therapy* – HAART) (BRASIL/MS - AIDS, 2006).

1.5.1 Modos de transmissão do HIV-1

As principais formas de transmissão do HIV são: a sexual, a sangüínea (em receptores de sangue ou hemoderivados e em usuários de drogas injetáveis) e vertical (da mãe para o filho, durante a gestação, no parto ou por aleitamento). Além dessas formas, mais freqüentes, também pode ocorrer a transmissão ocupacional, ocasionada por acidente de trabalho, em profissionais da área da saúde que sofrem ferimentos com instrumentos perfuro cortantes contaminados com sangue de pacientes infectados pelo HIV-1 (BRASIL/MS, 2004).

A principal forma de exposição ao vírus, em todo o mundo, é a sexual, sendo que a transmissão heterossexual, nas relações sem o uso de preservativo é considerada pela OMS como a mais freqüente, na África Sub-sahariana, sendo a principal forma de transmissão. Nos países desenvolvidos, a exposição ao HIV-1 por relações homossexuais masculinas ainda é a responsável pelo maior número de casos, embora a transmissão do vírus em uma relação heterossexual esteja aumentando de forma alarmante.

A transmissão sangüínea, associada ao uso de drogas injetáveis, é um meio muito eficaz de transmissão do HIV-1, devido ao uso compartilhado de seringas e agulhas. Essa via de transmissão adquire importância crescente em várias partes do mundo, como na Ásia, América Latina e no Caribe. A transmissão mediante transfusão de sangue e derivados é cada vez menos relevante nos países industrializados e naqueles

que adotaram medidas de controle da qualidade do sangue utilizado, como é o caso do Brasil (UNAIDS/WHO, 2003).

A transmissão vertical, decorrente da exposição da criança durante a gestação, parto ou aleitamento materno, vem aumentando devido à maior transmissão heterossexual. No continente africano, são encontradas as maiores taxas desta forma de infecção pelo HIV-1, da ordem de 30 a 40%. Entretanto, em outras partes do mundo, como na América do Norte e na Europa, situam-se em torno de 15 a 29%. Os principais motivos dessa diferença devem-se ao fato de que, na África, a transmissão heterossexual é mais intensa, e que neste continente, o aleitamento materno é muito mais freqüente do que nos países industrializados (UNAIDS/WHO, 2003).

A transmissão intra-uterina é possível em qualquer fase da gravidez, porém é menos freqüente no primeiro trimestre. As infecções ocorridas nesse período não têm sido associadas a malformações fetais. O risco de transmissão do HIV-1 da mãe para o filho pode ser reduzido em até 67% com o uso de zidovudina (AZT) durante a gravidez e no momento do parto, associado à administração da mesma droga ao recém-nascido por seis semanas. A transmissão ocupacional ocorre quando profissionais da área da saúde sofrem ferimentos com instrumentos perfurocortantes contaminados com sangue de pacientes portadores do HIV. Embora o vírus tenha sido isolado de vários fluidos corporais, como saliva, urina, lágrimas, somente o contato com sangue, sêmen, secreções genitais e leite materno têm sido implicados como fontes de infecção. (BRASIL/MS/SVS, 2004).

1.5.2 Diagnóstico laboratorial

Devido a importância do diagnóstico laboratorial, particularmente pelas conseqüências de determinar um indivíduo como portador do HIV e para se ter uma maior segurança no controle de qualidade do sangue e derivados, a Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) e AIDS, do Ministério da Saúde, regulamentou os procedimentos (Portaria Ministerial nº 59, de 28 de janeiro de 2003) que devem ser rigorosamente seguidos, de acordo com a natureza de cada situação.

Os testes para detecção da infecção pelo HIV podem ser divididos basicamente em quatro grupos: detecção de anticorpos, detecção de antígenos, cultura viral e amplificação do genoma do vírus. As técnicas rotineiramente utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo HIV são baseadas na detecção de anticorpos contra o vírus. As outras três técnicas detectam diretamente o vírus, porém, são menos utilizadas rotineiramente, sendo aplicadas em situações específicas, tais como: exames sorológicos indeterminados ou duvidosos, acompanhamento laboratorial de pacientes e mensuração da carga viral para controle de tratamento, dentre outras.

O ensaio imunoenzimático (EIE) utiliza antígenos virais (proteínas) produzidos em cultura celular (testes de primeira geração) ou através de tecnologia molecular recombinante, é amplamente utilizada como teste inicial para detecção de anticorpos contra o vírus, devido à sua facilidade de automação e custo relativamente baixo. O teste de *Western Blot* é utilizado para confirmação do resultado reagente ao teste ELISA. Na Imunofluorescência Indireta (IFI) a presença dos anticorpos é revelada por meio de microscopia óptica de epifluorescência e também é utilizada como teste confirmatório.

Um grande número de testes rápidos para estudos de campo, triagens de grandes populações e para decisões terapêuticas em situações de emergência vêm sendo desenvolvidos. A pesquisa de antígenos p24, embora esta proteína esteja presente no plasma de pacientes em todos os estágios da infecção pelo HIV, o teste é realizado mediante a utilização da técnica de EIE.

A análise quantitativa direta da carga viral plasmática pode ser feita por meio de técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucléicos, tais como a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) quantitativa, a amplificação de DNA em cadeia ramificada (*branched-chain* DNA ou bDNA) e a amplificação baseada na sequência de ácidos nucléicos (*nucleic acid sequence-based amplification* ou NASBA). Embora as técnicas sejam diferentes, o PCR quantitativo e o NASBA apresentam alta sensibilidade, permitindo o acompanhamento da resposta terapêutica antiretroviral.

A contagem de células linfócitos T CD4⁺ em sangue periférico tem implicações prognósticas na evolução da infecção pelo HIV-1, pois é a medida de imunocompetência celular; é mais útil no acompanhamento de pacientes infectados pelo HIV. (BRASIL/MS/SVS, 2004).

1.5.3 Prevenção e controle

No mundo, menos do que um quinto de pessoas tem acesso aos serviços de prevenção contra o HIV. A prevenção poderia evitar 29 dos 45 milhões de novas infecções estimadas para ocorrer nesta década. Embora o tratamento com antiretroviral traga esperança para milhões, sem reduzir o número de novas infecções pelo HIV, a expansão ao acesso do tratamento torna-se insustentável. O acesso ao tratamento antiretroviral e ao tratamento de outras doenças relacionadas ao HIV permanecem

insuficientes. A OMS estima que nove de dez pessoas que necessitam urgentemente de tratamento para o HIV não estão sendo alcançadas (UNAIDS-WHO, 2004).

A facilidade de deslocamento proporcionado principalmente pelos meios de transportes aéreos, colaboram para a disseminação da diversidade genética do HIV-1 no mundo, e o desenvolvimento de migração de populações rurais e guerra civil são fatores adicionais contribuintes. A propagação de formas variantes do HIV-1 tem implicações para o diagnóstico, para o tratamento e para o desenvolvimento de vacinas (Perrin *et al.*, 2003).

O controle da pandemia do HIV-1 requer o desenvolvimento de vacinas que proteja, eficientemente, contra todas variantes genéticas do HIV-1. A introdução de terapia efetiva antiretroviral, em áreas de alta prevalência do HIV-1, pode, contribuir para o controle da pandemia (Thomson *et al.*, 2002).

As principais estratégias de prevenção empregadas pelos programas de controle envolvem: a informação e a educação visando a prática do sexo seguro pela redução do número de parceiros e uso de preservativos, a promoção do uso de agulhas e seringas esterilizadas ou descartáveis e instrumentos perfurocortantes.

O controle do sangue e derivados, todo sangue para ser transfundido deve ser obrigatoriamente testado para detecção de anticorpos anti-HIV, os produtos derivados de sangue, que podem transmitir o HIV, devem passar por processo de inativação do vírus, a adoção de cuidados na exposição ocupacional a material biológico, o manejo adequado das outras DST, assim como a disponibilização de testes rápidos para o diagnóstico precoce do HIV em hospitais, além de medidas preventivas como o uso do AZT que reduz a transmissão do HIV da mãe para o bebê. No entanto, a

prevenção da infecção na mulher é ainda a melhor abordagem para se evitar a transmissão da mãe para o filho (BRASIL/MS/SVS, 2004) .

1.5.4 Epidemiologia molecular do HIV-1

A distribuição global de subtipos do HIV-1 varia com a origem geográfica. A dispersão de diferentes subtipos de HIV-1 parece estar relacionado preferencialmente com as mudanças socioeconômica, imigração e deslocamentos internacionais, do que nas diferentes vias de transmissão (Paraskevis & Hatzakis, 1999).

Desde sua expansão inicial em seres humanos, aproximadamente há sete décadas, na África Central, por meio de mutação e recombinação, cepas do HIV-1 diversificaram-se extensivamente. Trinta e quatro formas genéticas circulantes do grupo M do HIV-1 são atualmente reconhecidas, incluindo 09 subtipos e sub-subtipos (Thomson *et al.*; 2002, *HIV Sequence Database*, 2006).

A identificação de subtipos e CRF fornece meios de rastrear a disseminação da epidemia no mundo. O mapa do mundo ilustra que a maioria dos subtipos e CRF está presente na África Central, visto que em outros continentes, somente um simples ou poucos subtipos ou CRF são predominantes. Esta distribuição sugere, indiretamente, que a propagação inicial do HIV-1 fora da África foi iniciada por poucos indivíduos (Perrin *et al.*, 2003; Figura 5).



Figura 5 - Distribuição mundial de subtipos do HIV-1 do grupo M e das formas recombinantes circulantes (CRF). Adaptado de Thomson (2002).

No Brasil, o subtipo B é a principal cepa de HIV-1 circulante, sendo seguida pelo subtipo F, que é o responsável por cerca de 15 a 20% das infecções (Tanuri *et al.*, 1999b), apesar de que em Manaus a prevalência deste subtipo é de, aproximadamente, 50% (Vicente *et al.*, 2000) e no Rio Grande do Sul, de 3% (Martínez *et al.*, 2002).

Até o momento, já foram identificados os subtipos B, F, C e D, além das amostras adicionais de vírus recombinantes e de infecções duplas em diferentes áreas

geográficas (Janini *et al.*, 1996; Brindeiro *et al.*, 1999; Couto-Fernandez *et al.*, 1999; Proietti *et al.*, 1999; Vicente *et al.*, 2000).

As infecções mistas (B/F, B/D e F/D) e recombinantes também já foram observadas em várias partes do país (Ramos *et al.*, 1999; Tanuri *et al.*, 1999a; Machado *et al.*, 2004). Em Belém e em Macapá também foi observada a predominância do subtipo B, em relação aos genes *env* e *pro*, sendo seguido pelo subtipo F, refletindo, desta forma, o perfil epidemiológico encontrado em quase todas as regiões do Brasil (Machado, 2004).

O Estado do Amapá está localizado no extremo norte do Brasil fronteira a Guiana Francesa e Suriname, quase que inteiramente no hemisfério norte. Por suas características geofísicas, sociais, políticas e econômicas, faz parte da vasta região Amazônica ou Norte do Brasil. Com uma área de 143.453 Km², a população do estado está estimada em 475.843 habitantes (Censo 2000) dos quais 362.914 residem em Macapá e Santana.

A epidemia de AIDS no Brasil tem sido estudada principalmente nos grandes centros urbanos. As áreas de fronteira, onde existe um grande potencial de interação entre pessoas e grupos populacionais, foram pouco estudadas até o momento, apesar de que suas características particulares possam vir a constituir-se em espaços críticos para a disseminação do HIV. No Estado do Amapá o processo migratório, principalmente nas fronteiras serve como uma importante porta de entrada para a transmissão de novas formas genéticas do HIV-1. A cidade de Oiapoque, situada às margens do rio do mesmo nome e à divisa com a Guiana Francesa, é um ponto importante na conexão com este país e com o Suriname (Barcellos *et al.*, 2003).

O primeiro caso de aids no estado do Amapá foi notificado em 1988. A este caso inicial seguiram-se outros, basicamente restritos ao município de Macapá, a partir de 1996 foram notificados os primeiros casos nos municípios de Oiapoque, Santana, Laranjal do Jarí e Tartarugalzinho. Segundo, o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, até julho de 2006 o Estado do Amapá totaliza 533 casos notificados.

Considerando a disseminação de variantes do HIV-1 na população humana, pesquisas são necessárias para identificar os subtipos circulantes do HIV-1 no Estado do Amapá, utilizando a biologia molecular como ferramenta da epidemiologia molecular para a caracterização do perfil da epidemia do HIV-1.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Descrever a epidemiologia molecular das cepas do HIV-1 em Macapá, Amapá, Brasil.

1.6.2 Objetivos Específicos

1. Descrever a ocorrência de subtipos do HIV-1, baseando-se nas sequências nucleotídicas da região do gene *pro*;
2. Estabelecer possíveis correlações entre os subtipos genéticos e características epidemiológicas da população estudada;
3. Monitorar o aparecimento de novas cepas do HIV-1, no município Macapá-AP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO EXAMINADA

Um total de 48 indivíduos portadores do HIV-1 e/ou com SIDA/AIDS, procedentes do Serviço de Assistência Especializada (SAE-AP), foram orientados acerca dos objetivos do trabalho. Após a leitura e explicações dos objetivos do referido trabalho, os indivíduos que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (anexo 1) e responderam ao questionário epidemiológico (anexo 2), em seguida foram colhidas as amostras de sangue total para os exames necessários.

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, seguindo as Diretrizes e as normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde).

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN), no período de junho de 2003 a junho de 2004, utilizando o sistema de colheita à vácuo, em dois tubos de 5 mL, contendo EDTA como anticoagulante. As amostras foram processadas no Laboratório de carga viral do LACEN-AP, onde o plasma foi separado por centrifugação a 7.000 rotações por minuto (rpm) e, juntamente com o sangue total, congelado à -20°C até o momento de uso.

2.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O método de extração de DNA total foi realizado, a partir de células mononucleadas do sangue periférico, de acordo com o protocolo do conjunto de isolamento de ácido nucléico da *EZ-DNA Biological Industries*. O procedimento utilizado seguiu as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.

2.3.1 Lise Celular

O protocolo de lise celular seguiu as etapas a seguir:

1. Adicionar 300 μL de sangue total a um tubo *eppendorf* de 2,0 mL ;
2. Adicionar 1 mL de solução de lise de hemácias (RBC);
3. Homogeneizar por inversão lentamente por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C);
4. Centrifugar, por 2 segundos, à 13.000 rpm. Remover o sobrenadante com uma micropipeta, deixando, ao fundo do tubo, o sedimento de leucócitos com um resíduo de 10-20 μL do líquido;
5. Agitar vigorosamente, em agitador mecânico (vórtex), para ressuspender o sedimento de células e para facilitar a lise celular na etapa seguinte;
6. Adicionar 300 μL de solução de lise celular e homogeneizar por pipetagem. É necessária a incubação à 37°C, caso seja possível visualizar aglomerados no sedimento.

2.3.2 Precipitação de Proteínas

O protocolo de precipitação de proteínas seguiu as etapas a seguir:

1. Permitir à amostra atingir a temperatura ambiente;
2. Adicionar 100 μ L de solução de precipitação protéica ao lisado celular;
3. Agitar vigorosamente, em agitador mecânico, em alta velocidade, por 20 segundos, objetivando uma total homogeneização;
4. Centrifugar entre 13.000 e 16.000 rpm, por 3 minutos. As proteínas precipitadas formam um sedimento marrom escuro no fundo do tubo.

2.3.3 Precipitação do DNA

O protocolo de precipitação do DNA seguiu as etapas a seguir:

1. Transferir o sobrenadante, contendo o DNA (deixando o precipitado no tubo), para um novo tubo de 1,5 mL, contendo 300 μ L de isopropanol 100%;
2. Misturar a amostra, por inversão suave (cerca de 50 vezes), até formar um precipitado visível de DNA;
3. Centrifugar entre 13.000 e 16.000 rpm por 1 minuto. O DNA formará um precipitado branco visível a olho nu;
4. Desprezar o sobrenadante e secar o excesso com papel absorvente;
5. Adicionar 300 μ L de etanol 70%. Inverter o tubo, várias vezes, para lavar o sedimento de DNA;
6. Centrifugar entre 13.000 e 16.000 rpm por 1 minuto. Desprezar o etanol, cuidadosamente, evitando a perda do DNA;
7. Secar o excesso em papel absorvente e deixar a amostra secar, ao ar, por 15 minutos.

2.3.4 Hidratação do DNA

O protocolo de hidratação do DNA seguiu as etapas a seguir:

1. Adicionar 100 μL de solução de hidratação de DNA (concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$);
2. Deixar o DNA reidratar durante a noite (entre 12 e 16 horas), à temperatura ambiente (25°C);
3. Estocar entre 2-8°C. Posteriormente, alíquotas de DNA serão usadas diretamente na análise da reação em cadeia da polimerase, a PCR.

2.4 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR)

No presente trabalho, a PCR foi efetuada em duas etapas (Nested PCR) para a amplificação de 297 pb da protease (gene *pro*), a partir do DNA de indivíduos soropositivos, auxiliando na confirmação da infecção pelo HIV-1. As amplificações foram realizadas no equipamento termociclador *Mastercycler Personal, Eppendorff*. Após a PCR, os produtos amplificados foram submetidos à purificação para, posterior, seqüenciamento de bases nucleotídicas.

2.4.1 Amplificação do Gene *pro*

As reações de amplificação foram realizadas, primeiramente, em um volume de 50 μL , contendo 400 ng de DNA extraído, 225 μM de cada dNTP, 250 ng de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl_2 2,5 mM, Tris-HCl pH 8.3 10 mM e 0,5 U de *Taq* polimerase. Na segunda etapa da amplificação (*Nested PCR*) foram utilizados 5 μL do produto da amplificação anterior, considerando as mesmas condições de reação (Janini *et al.*, 1996; Tanuri *et al.*, 1999b; Vicente *et al.*, 2000). Essas reações ocorreram pela

utilização de pares de iniciadores internos e externos à região gênica, cujas seqüências são descritas na Tabela 2.

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, foram efetivados 35 ciclos de: 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 50°C e 30 segundos para o gene *pro*, com um tempo de dez minutos para a extensão final à 72°C.

Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos), em gel de agarose a 2,0%, em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de sódio 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água desionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

Tabela 2 – Iniciadores que foram utilizados nas duas reações de *Nested-PCR*.

Iniciadores	Gene	Seqüência 5' - 3'	Etapas
DP10	<i>pro</i>	5' - CAACTCCCTCTCAgAAgCAggAgCCg -3'	1°
DP11	<i>pro</i>	5' - CCATTCCTggCTTTAATTTTACTggTA -3'	1°
DP16	<i>pro</i>	5' - CCTCAAATCACTCTTTggCAAC -3'	2°
DP17	<i>pro</i>	5' - AAAATTTAAAgTgCAgCCAAT -3'	2°

2.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

A reação de purificação do produto da PCR tem a finalidade de otimizar o processo de seqüenciamento dos produtos de amplificação. O processo de purificação seguiu o protocolo da *QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc., USA)* descrito abaixo:

1. Adicionar 4 volumes da solução de ligação ao DNA a 1 volume do produto da PCR e misturar;
2. Colocar uma coluna *QIAquick* em um tubo de 2 mL e adicionar a mistura acima;
3. Centrifugar por 60 segundos à 8.000 rpm;
4. Desprezar o conteúdo do tubo coletor e retornar a coluna *QIAquick* ao mesmo tubo;
5. Proceder a lavagem da coluna, por duas vezes, adicionando 150 µL de tampão de lavagem à coluna *QIAquick* e centrifugar por 60 segundos à 8.000 rpm;
6. Desprezar o tampão de lavagem do tubo coletor. Centrifugar por mais 60 segundos à 8.000 rpm;
7. Colocar a coluna *QIAquick* em um novo tubo coletor tipo *ependorf* (1,5 mL);
8. Para eluir o DNA, adicionar 25 µL do tampão de eluição, previamente aquecido à 65°C, à coluna *QIAquick*, deixar 15 minutos à temperatura ambiente (25°C) e, em seguida, centrifugar por dois minutos à 8.000 rpm. Alternativamente, o DNA pode ser eluído em água desionizada estéril;
9. Após a eluição, o DNA purificado é armazenado à -20°C.

2.6 SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Após a purificação do produto da PCR, o DNA foi submetido ao seqüenciamento automático. A metodologia utilizada foi baseada na síntese bioquímica da cadeia de DNA através do método de Sanger *et al.* (1977) usando-se o *kit* da *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, USA)*. As fitas de DNA foram seqüenciadas em ambas as direções, utilizando-se o equipamento de seqüenciamento automático *ABI 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA)*. A técnica foi feita seguindo o protocolo abaixo:

1. Para cada reação, misturar os seguintes reagentes em um tubo marcado:

• <i>Terminator Ready Reaction Mix</i>	2,0 μ L
• DNA 10-30 ng (PCR purificado)	1,0 μ L
• Iniciadores (3,2 pmol/ μ L)	1,0 μ L
• H ₂ O desionizada	<u>16,0 μL</u>
	20,0 μ L

O *Terminator Ready Reaction Mix* é composto de: *A-Dye Terminator*, *G-Dye Terminator*, *C-Dye Terminator*, *T-Dye Terminator*, dITP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl pH 9,0, MgCl₂, Pirofosfato Termo-estável e *AmpliTaq* DNA Polimerase, FS.

2. Colocar os tubos contendo a mistura no termociclador (*GeneAmp PCR System 2400*) e realizar 25 ciclos de 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C. Ao final do processo, resfriar a mistura para 4°C.

2.6.1 Precipitação do DNA Seqüenciado

O protocolo de precipitação do DNA seqüenciado utilizou as etapas a seguir:

1. Adicionar 80 μ L de isopropanol 75% aos 20 μ L de solução de DNA seqüenciado;
2. Homogeneizar, rapidamente, em agitador mecânico;
3. Incubar, à 25°C, por 15 minutos;
4. Centrifugar a 14.000 rpm, por 20 minutos;
5. Desprezar o sobrenadante, cuidadosamente;
6. Adicionar 250 μ L de isopropanol 75%;
7. Homogeneizar, rapidamente, em agitador mecânico;

8. Centrifugar à 14.000 rpm, por 5 minutos;
9. Desprezar o sobrenadante, cuidadosamente;
10. Secar na estufa à 37°C entre 10 e 20 minutos.

2.6.2 Eletroforese do DNA Seqüenciado

O sistema de eletroforese utilizou o seqüenciador *ABI 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem)* e o protocolo de preparação das placas de vidro, de polimerização do gel e da aplicação das amostras são descritas a seguir:

2.6.2.1 Montagem das Placas de Vidro

1. Lavar as placas comalconox 1,5%, água corrente e água destilada;
2. Deixar secar à temperatura ambiente;
3. Montar as placas, colocando-as uma frente a outra, separadas pelos espaçadores, cuja espessura varia de 0,2 mm a 0,4 mm;
4. Para a perfeita aderência dos espaçadores, será utilizada uma fita de vedação para placas de seqüenciamento (*Mylar Sealing Tape-216FT, Pharmacia Biotech, USA*).

2.6.2.2 Polimerização do Gel

O protocolo de polimerização do gel seguiu as etapas a seguir:

1. Pesar 10,8 g de uréia;
2. Adicionar 3 mL da solução de acrilamida;
3. Adicionar 15,6 mL de água purificada;
4. Acrescentar 3 mL do tampão TEB 10x (8,3 g de EDTA, 55 g de ácido bórico, 108 g de Tris para 1000 mL de água desionizada);

5. Filtrar em bomba de vácuo usando membrana filtrante ME25 de 0,45 mm;
6. Deixar no vácuo, por 5 minutos, para retirar o O₂;
7. Adicionar 150 µL de APS a 10% (persulfato de amônio – 0,1g/mL);
8. Adicionar 21 µL de TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamine);
9. Adicionar a mistura à placa imediatamente, ainda no estado líquido. Após, aproximadamente, 120 minutos a solução atingirá o estado de gel;
10. Após a polimerização do gel, lavar a placa, suavemente, com água destilada;
11. Inserir a placa no sistema de eletroforese, colocar 1 litro de tampão TEB 1x em cada uma das cubas e fazer uma corrida preliminar (1200 V por 15 minutos) do gel, antes de adicionar as amostras. Este procedimento permite verificar o padrão de resolução do gel e quantas amostras poderão ser aplicadas;
12. Decorrida a análise da placa, adicionar 4 µL da solução de ressuspensão (100 µL de formamida, 20 µL de EDTA 50 mM [1,9 g/100 mL pH 8,0]) ao tubo contendo o DNA precipitado;
13. Aquecer as amostras ressuspensas à 94°C por 5 minutos e em seguida resfriá-las em gelo;
14. Aplicar as amostras (1,5 µL) no gel com a reação de cada amostra em uma cavidade e submeter à corrente contínua de 1200 V por 7 horas.

As seqüências produzidas foram editadas em um computador *Apple Macintosh* acoplado ao *ABI 377 DNA Sequencer* e exportadas para um computador PC-IBM, para análises posteriores no programa *Chromas* versão 1,4.

2.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

2.7.1 Edição e Alinhamento das Sequências

A análise comparativa entre as sequências nucleotídicas requer que elas estejam perfeitamente alinhadas, considerando o pareamento de bases homólogas. O alinhamento foi realizado por meio do programa BIOEDIT versão 5.0.9 (Hall, 1999), utilizando-se a plataforma Windows 98.

2.7.2 Análise das Sequências Nucleotídicas

Todas as sequências nucleotídicas obtidas no trabalho foram comparadas às sequências do banco de dados do *GeneBank/NCBI*, utilizando-se ferramentas para a subtipagem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/retroviruses/subtype/>). Este programa detecta a melhor similaridade entre a sequência obtida no presente estudo e as sequências referências de todos os subtipos do HIV-1 (Triques *et al.*, 2000).

2.7.3 Análise Estatística

Para verificar a associação existente entre as informações epidemiológicas fornecida pelos participantes e os subtipos do HIV, assim como os fatores de risco associados, foram utilizados o teste Exato de Fisher e o Coeficiente de Contingência, com o auxílio do programa BIOESTAT, versão 3.0 (Ayres *et al.*, 2003).

3. RESULTADOS

No presente trabalho foi avaliado 48 portadores do HIV-1, procedentes de Macapá, Amapá (31 homens e 17 mulheres), com média de idade de 32,7 (\pm 10,5) anos (intervalo entre 14 e 69 anos).

A análise do segmento do gene *pro* do HIV-1 evidenciou a presença de dois subtipos, sendo 45 (93,7%) do subtipo B e três (6,3%) do subtipo F. Os analisados que apresentaram um dos segmentos gênicos como sendo não-B, relataram ser heterossexuais. Não foi encontrada significância estatística quando o subtipo B e F foram correlacionados com o sexo (Teste Exato de Fisher; $p = 0,263$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Informações gerais demográficas e laboratoriais do grupo de portadores do HIV-1 na cidade de Macapá.

Paciente	Sexo	Idade	Categoria de Risco*	Subtipos <i>Pro</i>
BRAP002	F	29	HET	B
BRAP003	M	38	HET	B
BRAP004	M	32	HOM	B
BRAP005	M	32	HET	B
BRAP006	M	28	HET	B
BRAP008	M	32	HET	B
BRAP009	M	38	HOM	B
BRAP011	M	31	HOM	B
BRAP012	M	41	BI	B
BRAP013	M	37	HOM	B
BRAP014	M	36	HET/UDE	F
BRAP015	M	14	ND	B
BRAP016	M	24	HET	B
BRAP017	M	27	HOM	B
BRAP018	M	37	HET	B
BRAP019	F	59	HET	B
BRAP020	M	20	HET	B
BRAP021	M	33	HET	B

BRAP024	M	43	HOM	B
BRAP025	M	69	HET	B
BRAP026	M	27	HET	B
BRAP027	M	23	HET	B
BRAP030	M	43	HET	B
BRAP031	F	21	HET	B
BRAP032	F	55	HET/TF	B
BRAP033	F	38	HET/TF	B
BRAP035	M	ND	ND	B
BRAP036	F	37	HET	B
BRAP037	M	41	HET	B
BRAP039	F	27	HET	B
BRAP041	F	22	HET/TF	B
BRAP045	M	38	HET/UDNE/TF	B
BRAP047	F	23	HET	B
BRAP049	M	22	HET	B
BRAP050	F	23	HET	B
BRAP051	F	26	HET	B
BRAP052	M	40	HET	B
BRAP053	F	27	HET	F
BRAP054	M	36	ND	B
BRAP055	F	44	HET	B
BRAP056	F	30	HET	B
BRAP057	M	26	HET	F
BRAP058	F	30	HET	B
BRAP059	F	27	HET/TF	B
BRAP060	M	ND	ND	B
BRAP061	M	26	BI	B
BRAP062	F	22	ND	B
BRAP063	M	31	ND	B

* BRAPN° (Brasil, Amapá, N° indivíduo), HET (heterossexual), HOM (homossexual), BI (bissexual), UDE (usuário de drogas endovenosas), UDNE (usuário de drogas não endovenosa), TF (transfusão). ND: Dados não disponíveis.

A avaliação do comportamento sexual do grupo de examinados mostrou que seis relataram ser homens homossexuais (14,3%), trinta e quatro (80,9%) heterossexuais e dois bissexuais (4,8%) (Tabela 4). De seis indivíduos (12,5%) não foi possível obter informações.

Tabela 4 - Distribuição dos subtipos B e F, de acordo com a frequência da preferência sexual, na cidade de Macapá.

Preferência sexual	Frequência	Subtipos	
		<i>pro</i>	
		B	F
Homossexual	6/42 (14,3%)	6	0
Heterossexual	34/42 (80,9%)	31	3
Bissexual	2/42 (4,8%)	2	0

Na categoria de risco heterossexual, quatro eram transfundidos (11,8%), um era UDE (2,9%) e outro era UDNE e transfundido (2,9%). Em Macapá, foi observada associação entre o comportamento de risco e a prevalência de infecção pelo HIV-1 (Coeficiente de Contingência $C = 0,8165$; $p = 0,0001$). Quanto à preferência sexual e os subtipos do HIV-1 nos indivíduos de Macapá, não foi observada uma correlação, estatisticamente significativa (Coeficiente de Contingência $C = 0,1333$; $p = 0,680$).

No presente estudo, vinte e seis indivíduos (83,9%) afirmaram não ter nenhum ou apenas um parceiro por mês, cinco (16,1%) têm de dois a dezenove parceiros por mês e nenhum relatou ter mais de 20 parceiros por mês (Tabela 5).

Tabela 5 – Comportamento sexual (nº de parceiros/mês), de acordo com a idade, em Macapá.

Nº de parceiros/mês	Macapá	Idade			
		13-24	25-39	40-54	55-70
0-1	26/31 (83,9%)	07	15	02	02
2-19	5/31 (16,1%)	0	04	01	0
Mais de 20	0/31 (0,0%)	0	0	0	0

Quanto ao comportamento ou exposição de risco dos indivíduos oriundos de Macapá, um era UDE (2,4%), três (7,3%) eram UDNE e cinco (12,2%) relatou ter recebido sangue ou hemoderivados, oito (19,5%) mantiveram relações sexuais com homossexuais, trinta e quatro (82,9%) com heterossexuais, cinco (12,2%) com bissexuais, doze (29,3%) com múltiplos parceiros, treze (31,7%) com parceiros promíscuos, seis (14,6%) com UDE e/ou UDNE e nove (21,9%) com portadores do HIV-1 e/ou com AIDS. Quatro indivíduos (9,7%) relataram ter mantido relações sexuais com pessoas de outros estados e três (7,3%) com parceiros de outros países (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos subtipos B e F, de acordo com a exposição de risco ou com comportamento sexual, na cidade de Macapá.

Exposição de risco ou Comportamento sexual	Macapá	Subtipos	
		<i>pro</i>	
		B	F
UDE	1/41 (2,4%)	0	1
UDNE	3/41 (7,3%)	3	0
Transfusão	5/41 (12,2%)	5	0
Parceiro homossexual	8/41 (19,5%)	8	0
Parceiro heterossexual	34/41(82,9%)	32	2
Parceiro bissexual	5/41 (12,2%)	5	0
Múltiplos parceiros	12/41 (29,3%)	12	0
Parceiro promíscuo	13/41 (31,7%)	13	0
Parceiro UDE/UDNE	6/41 (14,6%)	6	0
Parceiro HIV+/AIDS	9/41 (21,9%)	9	0
Parceiro outro estado	4/41 (9,7%)	4	0
Parceiro outro país	3/41 (7,3%)	3	0

Referente à história de infecções sexualmente transmissíveis (IST), 12 indivíduos (26,6%), relataram já ter sido acometidos por alguma delas. A gonorréia foi relatada por 50% dos indivíduos, sendo seguida pelo herpes (16,6%), linfogranuloma venéreo (16,6%) e sífilis (16,6%). Quatro indivíduos (33,3%) relataram mais de uma IST (Figura 6).



Figura 6 - Distribuição dos subtipos B e F de acordo com o tipo de IST relatada na cidade de Macapá.

Quanto ao grau de escolaridade dos indivíduos de Macapá, dois (4,6%) eram analfabetos ou alfabetizados, vinte e seis (60,5%) não haviam concluído ou estavam cursando o ensino fundamental, nove (20,9%) haviam concluído ou ainda estavam cursando o ensino médio e seis (14,0%) ainda estavam cursando ou haviam concluído o ensino superior (Tabela 7). Não foi possível obter informações de cinco indivíduos (10,4%).

Tabela 7 - Distribuição dos subtipos B e F de acordo com a escolaridade, na cidade de Macapá.

Escolaridade	Macapá	Subtipos	
		<i>Pro</i>	
		B	F
Analfabeto ou Alfabetizado	2/43 (4,6%)	2	0
Ensino fundamental	26/43 (60,5%)	24	2
Ensino médio	9/43 (20,9%)	9	0
Ensino superior	6/43 (14,0%)	3	0

Houve associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo vírus e o grau de escolaridade dos indivíduos de Macapá (Coeficiente de Contingência $C = 0,8660$; $p = 0,0001$). Não foi observada uma correlação, estatisticamente significativa (Coeficiente de Contingência $C = 0,0660$; $p = 0,7690$), entre o grau de escolaridade e os subtipos do HIV-1 na cidade de Macapá-AP.

4 DISCUSSÃO

4.1 INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

O Estado do Amapá, devido sua localização geográfica, região de fronteira com a Guiana Francesa pode ser apontado como uma importante porta de entrada do HIV-1 na região Norte do Brasil. A consolidação da proposta de integração da Amazônia ao restante do país, viabilizada pela construção da rodovia transguianense promoverá o desenvolvimento da região com a integração do mercado americano, caribenho e europeu, fortalecendo o fluxo populacional entre a região norte com outras partes do mundo. A intensificação da migração, e a instalação de vários projetos de mineração, que deslocam grande contingente de migrantes de outras regiões, são fatores determinantes para a consolidação de diferentes situações epidemiológicas vivenciadas na Amazônia, principalmente no que concerne às doenças transmissíveis.

Este estudo identificou os subtipos circulantes do HIV-1 na cidade de Macapá, corroborando com a pesquisa realizada por Machado *et al.* (2004) na cidade de Belém-PA, com resultados semelhantes aos encontrados em outras regiões brasileiras, refletindo a realidade da epidemia brasileira.

No perfil epidemiológico do grupo estudado, quando relacionado ao comportamento sexual, revelou um número bastante significativo no percentual de indivíduos que possivelmente foram contaminados, em uma relação heterossexual (80,9%), mostrando a importância desta subcategoria na transmissão sexual do HIV. Entre os heterossexuais, observou-se que 31,7% tinham múltiplos parceiros e 21,9% relataram ter parceiros promíscuos. Outro fator relevante está relacionado com indivíduos entre 25-39 anos de idade que apresentaram o maior percentual de

adoecimento (61,3%) semelhante aos dados observados no Brasil (Boletim Epidemiológico - AIDS, 2003).

No presente estudo, no que se refere às IST, 12 indivíduos (26,6%) relataram já ter tido alguma, embora a ocorrência de mais de uma IST também tenha sido mencionada. A gonorréia teve elevada frequência (50%) quando mencionada pelos indivíduos com história de IST, semelhante como o que observou Martinez (2002), no Sul do país, seguida de herpes, linfogranuloma venéreo e sífilis (16,6%).

Quanto à escolaridade dos participantes, a maioria (60,5%) relatou ter ou estar cursando ensino fundamental, indicando forte associação quando relacionado com a epidemia, na cidade de Macapá, sugerindo que a infecção tem acometimento maior em indivíduos de baixa escolaridade, como observado na série histórica da dinâmica da epidemia brasileira (Brasil, 2003).

4.2 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV-1

4.2.1 Caracterização do subtipo B e do subtipo F

A epidemia da infecção pelo HIV/AIDS no Brasil é complexa quando comparada com outros países da América Latina acerca da prevalência e distribuição dos subtipos. Alguns trabalhos no Brasil evidenciam que a epidemia de HIV é caracterizada por múltiplos subtipos do grupo M, sendo o subtipo B o mais prevalente, seguido dos subtipos F, D e A (Morgado *et al.*, 1994; Sabino *et al.*, 1996; Tanuri *et al.*, 1999; Caride, 2000). Recentemente, foi descrita elevada prevalência do subtipo C na região sul do Brasil (Martinez *et al.*, 2002), alcançando baixa frequência na região sudeste, não sendo detectado nenhum subtipo C nos indivíduos analisados em Macapá.

As diversidades de cepas do HIV-1 em determinadas áreas geográficas podem produzir considerável variação intrasubtipos, afetando a acurácia dos ensaios de amplificação em biologia molecular, podendo ser a explicação para as dificuldades que algumas amostras analisadas apresentaram quando não foi possível amplificar o segmento gênico, sugerindo cepas divergentes ou problemas no que se refere à qualidade do material genético utilizado na amplificação (Sabino *et al.*, 1996; Vallet *et al.*, 2002; Machado, 2004). Dificuldades semelhantes foram observadas em outros estudos quando se utilizou metodologias diferentes para identificação de subtipos (Heyndrickx *et al.*, 2000; Gadelha *et al.*, 2003).

Em Macapá foi observada a predominância do subtipo B (93,7%), em relação ao gene *pro*, sendo seguido pelo subtipo F (6,3%), semelhante às observações realizadas no Rio Grande do Sul, Ceará e Belém (Martinez *et al.*, 2002; Gadelha *et al.*, 2003; Machado, 2004). A predominância do subtipo B é similar àquelas encontradas em avaliações anteriores de amostras das regiões Nordeste e Sudeste, demonstrando uma característica epidemiológica da epidemia encontrada em quase todas as regiões brasileiras (Sabino *et al.*, 1996; Morgado *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1999, Tanuri *et al.*, 1999b) sendo característica da América do Sul, especialmente no Brasil, onde diferentes subtipos e formas recombinantes circulam entre os indivíduos afetados (Marquina *et al.*, 1996; Navas *et al.*, 1999, Paraskevis & Hatzakis 1999; Avila *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2003). Vale ressaltar, que em Manaus os subtipos B e F foram identificados em iguais proporções, diferindo dos resultados de estudos conduzidos em áreas urbanas da região Sudeste (Vicente *et al.*, 2000).

Em Macapá, a prevalência do subtipo F (6,3%), quando o gene *pro* foi analisado, mostrou ser mais elevado do que o encontrado no Estado do Rio Grande do

Sul, Ceará e Pará (Martinez *et al.*, 2002; Gadelha *et al.*, 2003; Machado, 2004), porém menor do que a identificada na cidade do Rio de Janeiro (Teixeira *et al.*, 2004), e Manaus onde a frequência do subtipo F é substancialmente alta quando comparada com áreas urbanas do Sudeste brasileiro (Vicente *et al.*, 2000). É importante notar que no Uruguai, a prevalência deste subtipo é em torno de 56% (Russel *et al.*, 2000).

A diferença na prevalência de subtipos distintos do HIV-1 entre indivíduos que relatam diferentes fatores de risco já foram encontradas em vários países como na Tailândia (Gao *et al.*, 1996; Subbarao *et al.*, 2000), na Rússia (Bobkov *et al.*, 1996), na França (Vallet *et al.*, 2002) e na Argentina (Avila *et al.*, 2002). Contudo, no grupo analisado em Macapá nenhuma associação, estatisticamente significativa, foi encontrada entre os subtipos do HIV-1, o grau de escolaridade e o sexo, de acordo com as observações anteriores no Brasil (Sabino *et al.*, 1996; Morgado *et al.*, 1998; Bongertz *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2002; Gadelha *et al.*, 2003; Machado, 2004). A transmissão do HIV-1 na cidade Macapá por meio do uso de drogas endovenosas teve baixa frequência, quando comparada aos indivíduos que apresentaram este comportamento de risco, nos Estados de São Paulo (Sabino *et al.*, 1996; Rossini *et al.*, 2001) e Rio de Janeiro (Teixeira *et al.*, 2004). Dos três indivíduos identificados com subtipo F, apenas um indivíduo (BRAP014) relatou ser ex-usuário de drogas endovenosas e que havia compartilhado seringa e agulha com outros indivíduos.

A diversidade genética do HIV-1 no Brasil é dinâmica e complexa, pois a prevalência de múltiplos subtipos depende da região geográfica estudada. Seguindo o padrão brasileiro, estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 em Macapá, apresentaram os mesmos resultados de estudos anteriores sobre a distribuição de subtipos confirmando a predominância do subtipo B do HIV-1 no Brasil. Algumas

evidências indicam para o aparecimento de outros subtipos virais, possivelmente, por migrações e viagens internacionais, demonstrando a importância do monitoramento molecular de formas genéticas do HIV-1 no Brasil, sendo útil para o desenvolvimento de vacinas apropriadas. Entretanto, os sistemas de notificação do HIV/AIDS ainda constituem em um sistema problemático que depende de uma demanda espontânea. Há a necessidade de um fluxo de notificações definido e consolidado, para que a análise dos dados, contemple, minimamente, as características individuais, espaciais e cronológicas, para que se possa ter noção do processo evolutivo e do perfil da epidemia na região.

4. CONCLUSÕES

- 1) Na Cidade de Macapá-AP as principais cepas circulantes do HIV-1 nesse estudo foram identificados como subtipo B e F;
- 2) O subtipo B do HIV-1 é o mais prevalente (93,7%), quando analisado para o gene *pro*, na Cidade de Macapá-AP;
- 3) O subtipo F do HIV-1 é o segundo mais prevalente (6,3%), quando analisado para o gene *pro*, na Cidade de Macapá-AP;
- 4) Dentre os subtipos F, apenas um estava relacionado com o grupo de risco UDE;
- 5) Não foi observada associação entre os subtipos do HIV-1 circulantes em Macapá e a preferência sexual;
- 6) Houve correlação entre o grau de escolaridade e o risco de infecção pelo HIV-1, porém nenhuma associação quando comparada à escolaridade e aos subtipos identificados na cidade estudada.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILA, M.M., PANDO, M.A., CARRION, G., PERALTA, L.M., SALOMON, H., CARRILLO, M.G., SANCHEZ, J., MAULEN, S., HIERHOLZER, J., MARINELLO, M., NEGRETE, M., RUSSEL, K.L., CARR, J.K. Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, **29**: 422-426, 2002.
- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S.S. **Bioestat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq, 2003. 290p.
- BARCELLOS, C., PEITER, P., ROJAS, L. I. A geografia da AIDS nas fronteiras do Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Brasília, 2003.
- BAJARIA, S. H., WEBB, G., CLOYD, M., KIRSCHNER, D. Dynamics of naive and memory CD4 T lymphocytes in HIV-1 disease progression. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, **30**: 41-58, 2002.
- BARRÉ-SINOUSSE F, CHERMANN J. C., REY F., NUGEYRE M. T., CHAMARET S., GRUEST J., DAUGUET C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W., MONTAGNIER, L. Isolation of a t-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, **220**: 868-871, 1983.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico – AIDST. Ano III, nº 1, 01 à 26ª semanas epidemiológicas, janeiro a junho, Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 3ª ed., Vol. I. Brasília, 2004

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Brasília, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2002.
- BRENNAN, R. O., DURACK, D. T. Gay compromise syndrome. **Lancet**, **2**: 1338-1339, 1981.
- BRINDEIRO, R., VANDERBORGHT, B., CARIDE, E., CORREA, L., ORAVEC, R.M., BERRO, O., STUYVER, L., TANURI, A. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43**: 1674-1680, 1999.
- BRITO, A. M., CASTILHO, E. A., SCWARCWALD, C. L. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, **34**: 207-217, 2000.
- CARIDE, E., BRINDEIRO, R., HERTOOGS, K., LARDER, B., DEHERTOGH, P., MACHADO, E., SÁ, C. A. M., EYER-SILVA, W., A., SION, F. S., PASSIONI, J. A.M., CALAZANS, A. R., TANURI, A. Drug-Resistant Reverse Transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency Virus type I found in Brazilian patients failing HAART. **Virology**, **275**: 107-115, 2000.
- CARRION, G., HIERHOLZER, J., MONTANO, S., ALAVA, A., PEREZ, J., GUEVARA, A., LAGUNA-TORRES, V., MOSQUERA, C., RUSSELL, K., CHAUCA, G., KOCHER, T., BIRX, D.L., SANCHEZ, J.L., CARR, J.K. Circulating recombinant form CRF02_AG in South America. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **19**: 329-332, 2003.

CASTRO, E., ECHEVERRIA, G., DEIBIS, L., GONZALEZ DE SALMEN, B., MOREIRA, A. S., GUIMARAES, M.L., BASTOS, F.I., MORGADO, M.G. Molecular epidemiology of HIV-1 in Venezuela: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a B/F recombinant infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, **32**: 338-344, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Epidemiologic aspects of the current outbreak of kaposi's sarcoma and opportunistic infections. **New England Journal of Medicine**, **306**: 248-252, 1982.

COFFIN, J. M. *Retroviridae: The Viruses and Their Replication*. In: **Fundamental Virology**. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996. P.763-843.

COFFIN, J., HAASE, 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. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, **267**: 483-489, 1996.

COUTO-FERNANDEZ, J.C., MORGADO, M.G., BONGERTZ, V., TANURI, A., ANDRADE, T., BRITES, C., GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: A city with African sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, **22**: 288-293, 1999.

CULLEN, B. R., HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. **Cell**, **93**: 685-692, 1998.

DANIEL, R., KATZ, R.A., SKALKA, A.M. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. **Science**, **284**: 644-647, 1999.

- DAVIS, K. C., HORSBURGH, C. R., JR, HASIBA, U., SCHOCKET, A. L., KIRKPATRICK, C. H. Acquired immunodeficiency syndrome in a patient with hemophilia. **Annals of Internal Medicine**, **98**: 284-286, 1983.
- DOUEK, D.C., BRENCHLEY, J.M., BETTS, M.R., AMBROZAK, D.R., HILL, B.J., OKAMOTO, Y., CASAZZA, J.P., KURUPPU, J., KUNSTMAN, K., WOLINSKY, S., GROSSMAN, Z., DYBUL, M., OXENIUS, A., PRICE, D.A., CONNORS, M., KOUP, R.A. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature**, **417**: 95-98, 2002.
- EMERMAN, M., MALIN, M. H. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. **Science**, **280**: 1880-1884, 1998.
- FORTIN J. F., CANTIN R, LAMONTAGNE G, TREMBLAY M. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. **Journal of Virology**, **71**: 3588-3596, 1997.
- FRANKEL, A. D., YOUNG, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, **67**:1-25, 1998.
- FREED, E.O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology**, **251**: 1-15, 1998.
- GADELHA, S.R., SHINDO, N., CRUZ, J.N., MORGADO, M.G., GALVAO-CASTRO, B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98**: 461-463, 2003.
- GALLO, R.C. The Early Years of HIV/AIDS. **Science**, **298**: 1728-1729, 2002.

- GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D.L., CHEN, Y., RODENBURG, C.M., MICHAEL, S.F., CUMMINS, L.B., ARTHUR, L.O., PEETERS, M., SHAW, G.M., SHARP, P.M., HAHN, B.H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, **397**: 436-441, 1999.
- GISSELQUIST, D. Emergence of the HIV type 1 epidemic in the twentieth century: comparing hypotheses to evidence. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **19**: 1071-1078, 2003.
- GÖTTE, M., LI, X., WAINBERG, M, A. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **365**: 199-210, 1999.
- GOTTLIEB, M.S., SCHROFF, R., SCHANKER, H.M., WEISMAN, J.D., FAN, P.T., WOLF, R.A., SAXON, A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, **305**: 1425-1431, 1981.
- GUIMARÃES, M. L., BASTOS, F. I., TELLES, P. R. Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. **Journal of Clinical Virology**, **21**: 143-151, 2001.
- HAHN, B.H., SHAW, G.M., DE COCK, K.M., SHARP, P.M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, **287**: 607-614, 2000.
- HARRIS, M. From negative factor to a critical role in virus pathogenesis: the changing fortunes of Nef. **Journal General Virology**, **77**: 2379-2392, 1998.
- HEINZINGER., N. K., BUKRINSKY, M. I., HAGGERTY, S. A., RAGLAND, A. M., KEWALRAMANI, V., LEE, M. A., GENDELMAN, H. E., RATNER, L., STEVENSON, M., EMERMAN, M. The vpr protein of human immunodeficiency

virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **91**: 7311-7315, 1994.

HEYNDRIKX L, JANSSENS W, ZEKENG L, MUSONDA R, ANAGONOU S, VAN DER AWERA G, COPPENS S, VEREECKEN K, DE WHITE K, VAN RAMPELBERGH R, KALHINDO M, MORISON L, MCCUTHAN FE, CARR JK, ALBERT J, ESSEX M, GOUDSMIT J, ASJO B, SALMINEN M, BUVÉ A, Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. Simplified strategy for detection of recombinant HIV-1 group M isolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. **Journal of Virology**, **74**: 363-370, 2000.

HIV Sequence Database. Disponível em <http://hiv-web.lanl.gov>. Acesso em 12/12/2006.

HOGLUND, S., OHAGEN, A., LAWRENCE, K., GABUZDA, D. Role of vif during packing of the core of HIV-1. **Virology**, **201**:349-355, 1994.

HOLMES, E. C. On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, **76**: 239-254, 2001.

JANINI, L.M., PIENIAZEK, D., PERALTA, J.M., SCHECHTER, M., TANURI, A., VICENTE, A.C.P., DELA TORRE, N., PIENIAZEK, N.J., LUO, C., KALISH, M.L., SCHOCHETMAN, G., RAYFIELD, M.A. Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. **Virus Genes**, **13**: 69-81, 1996.

KLIMKAIT, T., STREBEL, K., HOGGAN, M. D., MARTIN, M. A., ORENSTEIN, J. M. the human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. **Journal of Virology**, **64**:621-629, 1990.

- LEMEY, P., PYBUS, O.G., WANG, B., SAKSENA, N.K., SALEMI, M., VANDAMME, A.M. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **100**: 6588-6592, 2003.
- LEVY, D. N., FERNANDES, L. S., WILLIAMS, W. V., WEINER, W. B. Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus type 1 vpr. **Cell**, **72**:541-550, 1993.
- LEVY, J. A., HOFFMAN, A. D., KRAMER, S. M., LANDIS, J. A., SHIMABUKURO, L. M., OSHIRO, L. S. ISOLATION OF LYNPHOCYTOPATHIC RETROVIRUSES FROM SAN FRANCISCO PATIENTS WITH AIDS. **Science**, **225**: 840-842, 1984.
- LUCIW, P. A. Human immunodeficiency viruses and their replication. In: **Fundamental Virology**. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.). Lippincott Raven, Philadelphia, 1996. P.1881-1952.
- MACHADO, L.F.A. **Epidemiologia molecular da infecção pelo Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) nas cidades de Belém (Pará) e Macapá (Amapá), Brasil**. Tese de Doutorado. Belém, Universidade Federal do Pará, 2004.
- MARQUINA, S., LEITNER, T., RABINOVICH, R.D., BENETUCCI, J., LIBONATTI, O., ALBERT, J. Coexistence of subtypes B, F, and B/F *env* recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires, Argentina. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **12**: 1651–1654, 1996.
- MARTÍNEZ, A.M.B., BARBOSA, E.F., FERREIRA, P.C.P., CARDOSO, F.A., SILVEIRA, J., SASSI, G., SILVA, C.M., MENDONÇA-SIGNORINI, V.,

ANTUNES, C.M.F. Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, **35**: 471-476, 2002.

MASUR, H., MICHELIS, M. A., GREENE, J. B., ONORATO, I., STOUWE, R. A., HOLZMAN, R. S., WORMSER, G., BRETTMAN, L., LANGE, M., MURRAY, H. W., CUNNINGHAM-RUNDLES, S. An outbreak of community-acquired *pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. **New England Journal of Medicine**, **305**: 1431-1438, 1981.

MORGADO, M.G., SABINO, E.C., SHPAER, E.G., BONGERTZ, V., BRIGIDO, L., GUIMARAES, M.D., CASTILHO, E.A., GALVAO-CASTRO, B., MULLINS, J.I., HENDRY, R.M., Mayer, A. V3 region polymorphism in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **10**: 569-576, 1994.

MORGADO, M.G., GUIMARÃES, M.L., GRIPP, C.B.G., COSTA, C.I., NEVES JR, I., VELOSO, V.G., LINHARES-CARVALHO, M.I., CASTELLO-BRANCO, L.R., BASTOS, F.I., KUIKEN, C., CASTILHO, E.A., GALVÃO-CASTRO, B., BONGERTZ, V. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **18**: 488-494, 1998.

MORGADO, M.G., GUIMARÃES, M.L., GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development. A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**: 143-150, 2002.

- NAVAS, M.C., LETOURNEUR, F., GOMAS, E., BOSHELL, J., SARAGOSTI, S.
Analysis of the V3 loop sequences from 12 HIV type-1 infected patients from Colômbia, South América. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 15: 1141-1144, 1999.
- PARASKEVIS, D. & HATZAKIS, A. Molecular epidemiology of HIV-1 infection. **AIDS Reviews**, 1: 238-249, 1999.
- PEETERS, M., COURGNAUD, V., ABELA, B. Genetic diversity of lentiviruses in non-human primates. **AIDS Reviews**, 3: 3-10, 2001.
- PERRIN, L., KAISER, L., YERLY, S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. **Lancet Infectious Diseases**, 3: 22-27, 2003.
- PINTO, M.E & STRUCHINER, C.J. A Diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. **Cadernos de Saúde Pública**, 22: 473-484, 2006.
- POPOVIC, M., SARNGADHARAN, M. G., READ, E., GALLO, R. C. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with aids and pre-aids. **Science**, 224: 497-500, 1984.
- PROIETTI, A.B.F.C., BARBOSA, SILVA, J.G., CARVALHO, A.F., KROON, E.G., FERREIRA, P.C.P. Genetic variability of HIV-1 isolates from Minas Gerais, Brazil. **Revista de Microbiologia**, 30: 141-143, 1999.
- RAMOS, A., TANURI, A., SCHECHTER, M., RAYFIELD, M.A., HU, D.J., CABRAL, M.C., BANDEA, C.I., BAGGS, J., PIENIAZEK, D. Dual and recombinant infections: an integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 5: 65-74, 1999.

- RIZZUTO, C. D., SODROSKI, J. G. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. **Journal of Virology**, **71**:4847-4851, 1997.
- RIZZUTO, C.D., WYATT, R., HERNÁNDEZ-RAMOS, N., SUN, Y., KWONG, P.D., HENDRICKSON, W.A., SODROSKI, J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. **Science**, **280**: 1949-1953, 1998.
- ROBERTSON, D.L., ANDERSON, J.P., BRADAC, J.A., CARR, J.K., FOLEY, B., FUNKHOUSER, R.K., GAO, F., HAHN, B.H., KALISH, M.L., KUIKEN, C., LEARN, G.H., LEITNER, T., McCUTCHAN, F., OSMANOV, S., PEETERS, M., PIENIAZEK, D., SALMINEN, M., SHARP, P.M., WOLINSK, S., KORBER, B. **HIV-1 Nomenclature proposal: a reference guide to HIV-1 classification**.1999. Disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/HTML/reviews/nomenclature/Nomen.html>. Acesso em 28/02/2003.
- RUSSELL, K. L, CARCAMO, C., WATTS, D. M., SANCHEZA, J., GOTUZZO, E., EULER, A., BLANCO, J.C., GALEANO, A., ALAVA, MULLINS, A. J. I., HOLMES, K. K., CARR J. K. Emerging genetic diversity of HIV-1 in South America. **AIDS**, **14**: 1785-1791, 2000.
- SABINO, E.C., DIAZ, R.S., BRIGIDO, L.F., LEARN, G.H., MULLINS, J.I., REINGOLD, A.L., DUARTE, A.J.S., MAYER, A., BUSCH, M.P. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in Sao Paulo city, Brazil. **AIDS**, **10**: 1579-1584, 1996.
- SABINO E. C., SAÉZ-ALQUÉZAR A. Etiologia e subtipos do HIV. In: **Retrovíroses humanas-HIV/AIDS**. Veronesi, R, Focaccia, R, Lomar, A. V. (eds.). Atheneu, 1999. P.1-11.

- SARR, A.D., SANKALÉ, J., G UÈYE-NDIAYE, A., ESSEX, M., MBOUP, S., KANKI, P.J. Genetic analysis of HIV type 2 in monotypic and dual HIV infections. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **16**: 293-298, 2000.
- SCHRAG, S. J., WIENER, P. Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? **Tree**, **10**: 319-324, 1995.
- SCHWARTZ, S. A., NAIR, M. P. N. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **6**: 295-305, 1999.
- SLEASMAN, J. W., GOODENOW M. M. HIV-1 infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **111**: 582-592, 2003.
- SOARES, E. A. J. M., SANTOS, R. P., PELLEGRINI, J. A., SPRINZ, E., TANURI, SOARES, A. M. A. Epidemiologic and Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Southern Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **34**: 520-526, 2003.
- TANURI, A., SWANSON, P., DEVARE, S., BERRO, O.J., SAVEDRA, A., COSTA, L.J., TELLES, J.G., BRINDEIRO, R., SCHABLE, C., PIENIAZEK, D., RAYFIELD, M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **20**: 60-66, 1999a.
- TANURI, A., VICENTE, A.C.P., OTSUKI, K., RAMOS, C.A., FERREIRA JR, O.C., SCHECHTER, M., JANINI, L.M., PIENIAZEK, D., RAYFIELD, M.A. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43**: 253-258, 1999b.

- TEIXEIRA, S. L. M., BASTOS, F. I., TELLES, P. R., HACKER, M. A. BRIGIDO, L. F., OLIVEIRA, C. A. F., BONGERTZ, V., MORGADO, M. G. HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity. **Journal of Clinical Virology**, **31**: 221-226, 2004.
- TSCHERNING, C., ALAEUS, A., FREDRIKSSON, R., BJÖRNDAL, A., DENG, H., LITTMAN, D.R., FENYÖ, E.M., ALBERT, J. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. **Virology**, **241**: 181-88, 1998.
- TURCHI, M.D., DIAZ, R.S., MARTELLI, C.M., SABINO, E.C., DA SILVA, W.P., FILHO, O.F., LARANJEIRA, R.R., BUSCH, M.P., CASTELO, A. Genetic diversity and HIV-1 incidence estimation among cocaine users in São Paulo, Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **30**: 527-532, 2002.
- TURNER, B.G., SUMMERS, M.F. Structural biology of HIV. **Journal of Molecular Biology**, **285**: 1-32, 1999.
- UNAIDS/WHO Global summary of the HIV/AIDS epidemic, December 2004. Disponível em <http://www.unaids.org>. Acesso em 02/02/2004.
- VALLET, S., LEGRAND-QUILLIEN, M., ROGER, C., BELLEIN, V., PERFEZOU, P., SAINT-MARTIN, L., GARRE, M., BRUN-VEZINET, F., PICARD, B. HIV-1 genetic diversity in Western Brittany, France. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **34**: 65-71, 2002.
- VICENTE, A.C.P., OTSUKI, K., SILVA, N.B., CASTILHO, M.C., BARROS, F.S., PIENIACKZEC, D., HU, D., RAYFIELD, M.A., BRETAS, G., TANURI, A. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1

- subtypes B and F. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **23**: 327-331, 2000.
- VON SCHWEDLER, U., SONG, J., AIKEN, C., TRONO, D. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. **Journal of Virology**, **67**: 4945-4955, 1993.
- WEISS, R. A. The Leeuwenhoek lecture 2001. Animal origins of human infectious disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, **356**: 957-977, 2001.
- WEISS, R.A., WRANGHAM, R.W. From Pan to pandemic. **Nature**, **397**: 385-386, 1999.
- WILLEY, R. L., MALDARELLI, F., MARTIN, M. A., STREBEL, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. **Journal of Virology**, **66**: 7193-7200, 1992.
- WYATT, R., SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, **280**: 1884-1888, 1998.
- YAMAGUCHI, J., DEVARE, S.G., BRENNAN, C.A. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **16**: 925-930, 2000.
- ZAO, L. J., MUKHERJEE, S., NARAYAN, O. Biochemical mechanism of HIV-1 vpr functions. Specific interaction with a cellular protein. **Journal of Biological Chemistry**, **269**: 15577-15582, 1994.