

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Variabilidade genética de *nef* em amostras de HIV-1 circulantes

Eduardo Dias Ramalho

Brasília

2006

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Variabilidade genética de *nef* em amostras de HIV-1 circulantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Aluno: Eduardo Dias Ramalho

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Renata Fernandes Martins

Brasília

2006

“Grandes poderes trazem grandes responsabilidades”

Ben Parker / Stan Lee

Aos meus queridos pais, pelo carinho, motivação e paciência.

Aos meus familiares, especialmente meu irmão Henrique, por serem tão presentes em minha vida.

À minha namorada, Gegê, por ser minha musa inspiradora e minha doida, sempre me apoiando e incentivando nessa minha longa estrada da vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Cláudia Renata Fernandes Martins, pela contribuição para meu crescimento profissional e pessoal e pela confiança depositada em mim durante todos os anos de trabalho no Grupo de Pesquisa em Virologia Humana da Universidade de Brasília.

Aos professores César Martins de Sá, Marcelo Macedo Brígido e José Paulo Gagliardi Leite, membros da banca examinadora, pelas valiosas e oportunas considerações na análise deste trabalho.

Aos amigos e companheiros do Grupo de Pesquisa em Virologia Humana da Universidade de Brasília, pelo grande incentivo e amizade: Tainá Raiol, Claudiner Oliveira, Patrícia Wyant, Nazle Vêras, Regina Amorim, Verônica Veras, Daniela Cerqueira, Daniella Moraes, Geni Câmara, Karla Braga, Margareti Medeiros, Márcio e Davi Neves.

Ao Ruitter Silva, do LACEN-DF, pelo apoio essencial na realização deste trabalho.

À equipe do LACEN-DF, pelo auxílio na obtenção das amostras utilizadas na pesquisa.

Aos meus pais, Wanyr Ramalho e Delma Dias Ramalho, pela paciência, carinho e apoio constantes.

Aos meus familiares, meu irmão Henrique Dias Ramalho, meu primo Ricardo Dias Spagnol, minha cunhada Karla Munique, minha avó, meus tios e primos e à agredada Eliane, pelo carinho, amizade e apoio.

À minha namorada Gegê, pela grande ajuda na revisão dessa dissertação, e por sempre me incentivar com muito amor, respeito e compreensão.

Ao Seu Edson, meu sogro, e à Patrícia, minha cunhada, por terem me aturado em sua residência durante a redação dessa dissertação, pelo apoio, amizade e carinho.

Aos meus queridos amigos, por todas as horas de divertimento e pela compreensão nos momentos de ausência (espero...): Tainá, Júnior, Lanuse, Cássio, Luciana (Lalu), Reinaldo, Flávio (Baiano), Paola, Luciana (Nany), Thiago, Antonieta, Daniel Martinelli, Sérgio, William, Felipe (Batatinha), Tiago (Sam), Rafael Aguiar, Thomáz, Tiago, e todos os outros não listados, porém não esquecidos.

À Ana, funcionária da Secretaria do Departamento de Biologia Celular, por ser sempre tão prestativa, paciente e eficiente no trato com os alunos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e à Universidade de Brasília, representados por todos os professores e funcionários, pelos ensinamentos recebidos e pela atenção despendida.

Ao CNPq, FINATEC, Ministério da Saúde e Programa Nacional de DST/AIDS pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. HISTÓRICO	5
1.2. A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA ADQUIRIDA (AIDS)	7
1.3. CLASSIFICAÇÃO E VARIABILIDADE DO HIV-1	9
1.4. VACINAS	14
1.4.1. <i>Vacinas profiláticas</i>	14
1.4.2. <i>Vacinas terapêuticas</i>	16
1.5. O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1	16
1.5.1. <i>Organização genômica</i>	17
1.5.2. <i>Proteínas virais</i>	18
1.6. A PROTEÍNA NEF	23
1.6.1. <i>Modificações pós-traducionais</i>	24
1.6.2. <i>Modulação de CD4</i>	25
1.6.3. <i>Modulação de MHC classe I</i>	28
1.6.4. <i>Modulação de MHC classe II</i>	30
1.6.5. <i>Modulação de CD1a e CD1d</i>	31
1.6.6. <i>Modulação de CD28</i>	32
1.6.7. <i>Aumento da replicação e infectividade viral</i>	32
1.6.8. <i>Alterações na sinalização para apoptose</i>	33
1.6.9. <i>Alterações em vias de sinalização celular</i>	34
1.6.10. <i>Caracterização da variabilidade de nef</i>	35
1.6.11. <i>Potencial imunogênico de Nef</i>	38
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. AMOSTRAGEM	41
3.2. TRANSCRIÇÃO REVERSA	41
3.3. AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	42
3.4. CLONAGEM	43
3.4.1. <i>Obtenção do plasmídeo recombinante</i>	43
3.4.2. <i>Transformação</i>	43
3.4.3. <i>Amplificação do DNA plasmidial</i>	44
3.5. PURIFICAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	45
3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS	45
3.6.1. <i>Seqüenciamento automático</i>	45
3.6.2. <i>Análise das seqüências</i>	46
3.6.3. <i>Análise filogenética</i>	46
4. RESULTADOS	47
4.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>NEF</i>	47
4.2. DEFINIÇÃO DOS SUBTIPOS COM BASE NO GENE <i>NEF</i>	47
4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA	49
4.3. CARACTERIZAÇÃO DE <i>NEF</i>	51
4.3.1. <i>Seqüência deduzida de aminoácidos de Nef</i>	51
4.3.2. <i>Motivos e resíduos associados às atividades biológicas de Nef</i>	55
4.3.2.a. <i>Modificações pós-traducionais em Nef</i>	55
4.3.2.b. <i>Sítios envolvidos na modulação de moléculas de superfície celular</i>	57

<i>Modulação de CD4</i>	57
<i>Modulação de MHC de classe I</i>	61
<i>Modulação de MHC de classe II</i>	64
<i>Modulação de CD1d</i>	64
<i>Modulação de CD28</i>	64
4.3.2.c. <i>Sítios envolvidos na alteração de vias de sinalização</i>	65
<i>Alterações na sinalização para apoptose</i>	65
<i>Alterações em vias de sinalização celular</i>	65
4.3.3. <i>Epitopos descritos em Nef</i>	66
5. DISCUSSÃO	69
5.1. DEFINIÇÃO DOS SUBTIPOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA	69
5.2. CARACTERIZAÇÃO DE NEF	70
5.2.1. <i>Motivos e resíduos associados às atividades biológicas de Nef</i>	72
5.2.1.a. <i>Modificações pós-traducionais em Nef</i>	72
5.2.1.b. <i>Sítios envolvidos na modulação de moléculas de superfície celular</i>	73
<i>Modulação de CD4</i>	73
<i>Modulação de MHC I</i>	75
<i>Modulação de MHC II</i>	77
<i>Modulação de CD1d</i>	77
<i>Modulação de CD28</i>	77
5.2.1.c. <i>Sítios envolvidos na alteração de vias de sinalização</i>	78
<i>Alterações na sinalização para apoptose</i>	78
<i>Alterações em vias de sinalização celular</i>	78
5.2.2. <i>Epitopos descritos em Nef</i>	80
6. CONCLUSÕES	82
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

SUMÁRIO DE FIGURAS

- Figura 1.** Estimativa do número de adultos e crianças no mundo portadores do vírus HIV-1, até o final de 2005 (UNAIDS, 2005). 7
- Figura 2.** Relação filogenética entre os gêneros da família Retroviridae (Adaptado de Van Regenmortel et al. (2000)). 11
- Figura 3.** Distribuição geográfica do HIV-1 no mundo (adaptado de Thomson et al., 2002). 12
- Figura 4.** Distribuição dos subtipos e das formas recombinantes nas cinco regiões brasileiras (Morgado et al., 2002). 14
- Figura 5.** Estrutura da partícula viral do HIV-1. CA – capsídeo, IN – integrase, MA – matriz, NC – nucleocapsídeo, PR – protease, RT – transcriptase reversa, ssRNA⁺ - RNA fita simples positivo (adaptado de Flint et al., 2004). 17
- Figura 6.** Organização genômica do HIV-1. LTR – long terminal repeat; gag – codifica proteínas estruturais; pol – codifica enzimas virais; vif – virion infective factor; vpr – virion protein r-; vpu – virion protein r; tat – transactivating protein-; rev – regulator of virus expression; env – codifica proteínas do envelope; nef – negative factor (Abbas & Lichtman, 2003). 18
- Figura 7.** Modelo esquemático da atuação de Tat. Tat interage com TAR e ciclina T, e recruta Cdk9. Cdk9 hiperfosforila o CTD (domínio C-terminal) da RNA Pol II, aumentando a transcrição do genoma viral. Nef e Spt4/5 são proteínas celulares que também participam desse processo. Adaptado de Lodish et al. (2003). 21
- Figura 8.** Representação da proteína Nef associada à membrana plasmática. Em amarelo estão destacados motivos associados à modulação negativa de MHC I. Em azul estão destacados motivos envolvidos na interação com domínios SH3. Em vermelho estão destacados resíduos envolvidos na interação com CD4. Em verde está destacado o motivo associado à interação com coatômeros. Em roxo está destacado o motivo associado à interação com AP-2 (Adaptado de Arold & Baur (2001)). 24
- Figura 9.** Esquema da interação entre CD4, AP-2, Clatrina e Nef (Adaptado de Arold & Baur (2001)). MP – membrana plasmática. AP-2 em vermelho, CD4 está em amarelo, clatrina em verde e Nef em azul. 26
- Figura 10.** Modelo proposto por Blagoveshchenskaya et al. (2002). 1 – Nef se associa a PACS-1 e AP-1 através do motivo EEEE62-65 e é translocada para o Complexo de Golgi. 2 – No complexo de Golgi, Nef adquire afinidade por PI3K, mostrado pela estrela, devido a alterações conformacionais no motivo PxøPxR72-72. 3 – Nef ativa PI3K, estado ativado de PI3K evidenciado pela seta. 4 – PI3K catalisa a síntese de PIP3 na membrana plasmática. 5 – ARNO é recrutada para a membrana e interage com PIP3. 6 – ARNO ativa ARF6, estado ativado de ARF-6 evidenciado pela seta. 7 – ARF6 ativada induz a internalização de MHC I, para compartimentos intracelulares. 8 – Nef impede o retorno de MHC I para a membrana plasmática, o resíduo M20 de Nef participa desse processo. 9 – MHC I é encaminhado e acumula no complexo de Golgi. 29
- Figura 11.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida de Nef dos consensos dos subtipos A, B, C, D, F, G, H e das CRFs 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12 e 14. Alguns motivos de Nef foram destacados. Os resíduos realçados em azul estão associados à modulação de CD4. Os resíduos realçados em verde estão associados à modulação de MHC I. O resíduo realçado em amarelo é fosforilado pela PKA. Os resíduos realçados em rosa estão associados a alterações em vias de sinalização celular. 36
- Figura 12.** Gel de agarose a 1%. No poço 1 pode-se observar o marcador molecular 100pb (Promega); nos poços 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 pode-se observar os fragmento amplificados. 47

Figura 13. Relações filogenéticas pelo método neighbor joining entre os isolados de HIV-1 circulantes no Distrito Federal (DF02.N) e seqüências de isolados de referência dos subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K do grupo M do HIV-1. O grupo O foi utilizado como grupo externo. Valores de bootstrap significativos encontram-se indicados ao lado do ramo respectivo (1000 replicações)..... 50

Figura 14. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas das 33 amostras com o consenso do subtipo B e o isolado HXB2. Os pontos representam resíduos de aminoácidos concordantes com o consenso do subtipo B. Os traços representam espaços inseridos para otimizar o alinhamento das seqüências. Asteriscos representam códons de parada. 52

Figura 14. (Continuação) Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas das 33 amostras com o consenso do subtipo B e o isolado HXB2. Os pontos representam resíduos de aminoácidos concordantes com o consenso do subtipo B. Os traços representam espaços inseridos para otimizar o alinhamento das seqüências. Asteriscos representam códons de parada. 53

Figura 15. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos das amostras DF02.73 e DF02.81 com o consenso do subtipo B e o isolado HXB2. A adenina inserida entre os nucleotídeos 316 e 317 da amostra DF02,73, e a deleção de uma guanina na posição 263, da amostra DF02.81 estão destacados em azul. Os pontos representam resíduos de aminoácidos concordantes com o consenso do subtipo B. Os traços representam espaços inseridos para otimizar o alinhamento das seqüências. 54

Figura 16. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, para os sítios de miristoilação (MGxxxSI-6) e de fosforilação (S9). Os resíduos em vermelho representam substituições não-conservativas. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B. Os traços representam espaços inseridos para otimizar o alinhamento das seqüências..... 56

Figura 17. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, para o sítio de clivagem pela protease viral, CAWLEA55-60. Os resíduos em azul representam substituições conservativas, enquanto aqueles em vermelho representam as não-conservativas. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B. 57

Figura 18. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, para os resíduos de Nef importantes para modulação negativa de CD4. Os resíduos em azul representam substituições conservativas, enquanto aqueles em vermelho representam as não-conservativas. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B. 59

Figura 19. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, mostrando os motivos e os resíduos de Nef envolvidos na modulação negativa de MHC I. As substituições não conservativas estão representadas em vermelho, e as inserções estão sombreadas. Os traços representam espaços, e os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B. 62

Figura 20. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, mostrando o motivo P_xφP_xR72-77 e os resíduos que interagem com moléculas sinalizadoras. As substituições não conservativas estão representadas em vermelho, e as conservativas em azul. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B..... 66

SUMÁRIO DE TABELAS

- Tabela 1.** *Iniciadores externos (outer) e internos (inner) para o gene nef. Os números entre parênteses indicam a posição genômica de cada iniciador em relação ao isolado HXB2. 42*
- Tabela 2.** *Caracterização dos subtipos para as regiões genômicas de gag (nucleotídeos 837-1690 em HXB2), protease (2253-2549 em HXB2), transcriptase reversa (2604-3250 em HXB2) obtidos por Veras N.M.C. (2006), de env (6816-7380 em HXB2) obtidas por Veras S.R. (2006) e de nef (8797-9417 em HXB2). 48*
- Tabela 3.** *Resíduos de aminoácidos da proteína Nef observados em amostras do DF. A literatura associa os resíduos destacados a Nef isolada de pacientes progressores. 60*
- Tabela 4.** *Resíduos de aminoácidos da proteína Nef observados em amostras do DF. A literatura associa os resíduos destacados a Nef isolada de pacientes não progressores. 63*
- Tabela 5.** *Frequência dos epitopos reconhecidos por linfócitos T CD4, descritos no banco genômico de Los Alamos, nas amostras do Distrito Federal. ^a Posição relativa em Nef, referente ao isolado HXB2. ^b Subtipo no qual o epitopo foi descrito. 67*
- Tabela 6.** *Frequência dos epitopos reconhecidos por linfócitos T CD8, descritos como ótimos e completos por Frahm et al. (2005) e Frahm et al. (2004), nas amostras do Distrito Federal. ^a Posição relativa em Nef, referente ao isolado HXB2. ^b Subtipo no qual o epitopo foi descrito. 68*

RESUMO

Em 2005, cerca de 40 milhões de pessoas viviam com HIV/AIDS no mundo. Desse total, aproximadamente 600 mil residiam no Brasil. Em vista do elevado percentual de infecções pelo HIV-1, o desenvolvimento de vacinas contra esse vírus é uma das prioridades no que se refere à saúde pública mundial. Entretanto, apesar dos estudos sobre esse vírus, pouco se conhece sobre a importância da sua diversidade genética para a eficácia de potenciais vacinas. Assim, conhecer a variabilidade do HIV-1 em diferentes partes do mundo, bem como o seu perfil antigênico, pode ser de fundamental importância para a aplicação dessas. Uma das proteínas mais imunogênicas do HIV-1 é Nef, que desempenha diversas funções importantes durante a infecção viral *in vivo*, como, por exemplo, aumentar a infectividade e a replicação viral e modular negativamente proteínas presentes na superfície celular. Por essas características, Nef pode ter papel importante na imunização contra o vírus. O presente trabalho teve como objetivo principal analisar amostras de uma série histórica de isolados do HIV-1 circulantes no Distrito Federal e no estado de Rondônia e, desse modo, contribuir para a caracterização desses vírus, pela descrição da variabilidade do gene *nef*. Além disso, foram avaliados motivos e resíduos importantes para as atividades biológicas de Nef. Para isso, 33 amostras, 17 do Distrito Federal e 16 de Rondônia, foram amplificadas por *nested*-PCR para o gene *nef* e seqüenciadas. Todas foram caracterizadas como pertencentes ao subtipo B. Pela dedução da seqüência de aminoácido foi possível observar que duas amostras apresentaram códons de parada prematuros, devido a mutações que levaram a mudança na fase de leitura do gene. Os motivos e resíduos associados às atividades biológicas de Nef também foram analisados. Os sítios de miristoilação, fosforilação por PKA e reconhecimento de Nef pela protease viral encontraram-se conservados em 100%, 66,6% e 69,7% das amostras, respectivamente. Em relação à modulação de CD4 por Nef, 36,4% das amostras apresentaram todos os motivos e resíduos conservados. Os motivos e resíduos associados à modulação negativa de MHC de classe I estiveram conservados em 57,6% das amostras analisadas, enquanto 54,5% dos isolados apresentaram os motivos envolvidos na modulação de MHC de classe II. Quanto à modulação de CD1d, 45,4% das amostras apresentaram a totalidade de motivos e resíduos associados a essa atividade conservados, enquanto aqueles associados à modulação de CD28 estiveram conservados em 81,8%. Enquanto 93,9% das amostras

apresentaram o motivo e o resíduo associados à sinalização para apoptose celular conservados. Em relação às alterações em vias de sinalização celular, 63,6% das amostras apresentaram os motivos e resíduos responsáveis pela interação de Nef com domínios SH3 conservados, enquanto 84,8% mostraram-se conservadas para aqueles necessários para a interação de Nef com proteínas Pak. Quanto aos epitopos de Nef reconhecidos por linfócitos T CD4, 18 dos 29 já descritos na literatura foram observados, sendo que o mais freqüente foi encontrado em 75,8% das amostras. Em relação aos epitopos de Nef reconhecidos por linfócitos T citotóxicos considerados ótimos, o mais freqüente foi observado em 84,8% das amostras. Pelo fato de Nef ser uma das regiões imunodominantes do HIV-1, bem como ser uma proteína da fase precoce da infecção, vacinas que utilizem suas porções antigênicas encontram-se em desenvolvimento. Dessa forma, a caracterização da variabilidade do gene *nef* pode ser de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de utilização de potenciais vacinas anti-HIV-1 futuramente no Distrito Federal e em Rondônia.

ABSTRACT

Nearly forty million people around the world were living with HIV/AIDS in 2005, about six hundred thousand in Brazil. Thus, the development of vaccines against this virus is a world public health priority. However, despite several studies concerning this virus, little is known about the relevance of its genetic variability to the efficacy of potential vaccines. Consequently, knowing the HIV-1 variability in different parts of the world, and also its antigenic profile, may be of high importance for the applicability of those vaccines. Nef is one of the most immunogenic proteins of HIV-1, it performs many important functions during the viral infection *in vivo*, such as increase the viral infectivity and replication, and down-modulate proteins of the cell surface. For these characteristics, Nef may have an important role in the immunization against the virus. The present study had as main objective the analysis of samples from a historical series of isolates of HIV-1 circulating in Federal District and *Rondônia*, and the contribution to the characterization of this virus, by the description of the variability of the *nef* gene. Additionally, the conservation of important motifs and residues related to the biological activities of Nef were also analyzed. With this purpose, thirty-three samples, seventeen from Federal District and sixteen from *Rondônia*, were amplified by *nested*-PCR for the *nef* gene and sequenced. All of them clustered with subtype B references isolates in the phylogenetic analysis. The motifs and residues associated to Nef biological activities were also analyzed. The miristoilation, fosforilation by PKA and recognition of Nef by the viral protease sites were conserved in 100%, 66,6% and 69,7% of the samples, respectively. Considering the CD4 modulation by Nef, 36,4% of the samples presented all the motifs and residues conserved. 57,6% and 54,5% of the samples had all motifs and residues associated to the down-modulation of MHC class I and to the modulation of MHC class II conserved, respectively. Considering the downmodulation of CD1d, 45,4% of the samples had all the motifs and residues associated to this activity, while 81,8% had those associated to the modulation of CD28. 93,9% of the samples had the motif and the residue associated to the signalization of cell apoptosis conserved. Considering Nef effects on cell signalization pathways, 63,6% of the samples presented the motifs and residues responsible for the interaction of Nef with SH3 domains, while 84,8% had those necessary to the interaction of Nef with Pak proteins. Considering the Nef epitopes recognized by T CD4 lymphocytes,

eighteen of the twenty-nine previously described were observed, the most frequent one occurred in 75,8% of the samples. Considering the Nef epitopes recognized by T cytotoxic lymphocytes, the most frequent one was observed in 84,8% of the samples. Because Nef is one of the most immunodominant regions of HIV-1 virus, as well one early phase protein, vaccines that use its antigenic regions are in development. In this way, the characterization of the variability of the *nef* gene may be of high importance to the development of utilization strategies for the potential anti-HIV-1 vaccines in Federal District and *Rondônia* in the future.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV – *Human Immunodeficiency Virus*). A doença é caracterizada pela redução no número de linfócitos T auxiliares e subsequente comprometimento da resposta imune do hospedeiro, o que permite o surgimento de infecções oportunistas. A progressão para a doença é lenta e a infecção pelo HIV é crônica (Prusiner S.R., 2002; Levy J.A., 1998).

Segundo dados do *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS), em 2005 cerca de 40 milhões de pessoas no mundo, pertencentes a diversas etnias e faixas etárias, viviam com HIV/AIDS, evidenciando a necessidade de controlar a disseminação do vírus (UNAIDS, 2005). Estudos sobre a biologia do HIV elucidaram as vias de transmissão do vírus, o que permitiu a adoção de medidas profiláticas de fácil acesso para a população. O desenvolvimento de drogas antivirais também foi possível graças às pesquisas sobre o HIV-1. No entanto, o custo do tratamento é alto, limitando sua utilização em larga escala (Gallo & Montagnier, 2002; Morgado *et al.*, 2002). Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas contra o HIV-1 é essencial para o controle efetivo da pandemia (Klein M., 2003).

Apesar dos estudos sobre a biologia desse vírus e dos esforços para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o HIV-1, ainda não se conhece a importância da diversidade genética viral e seu impacto sobre a eficácia de potenciais vacinas. Desse modo, conhecer e monitorar a variabilidade do HIV-1 em diferentes partes do mundo, bem como o seu perfil antigênico, pode ser importante para o planejamento de campanhas de vacinação com as vacinas que surgirem (Cerqueira *et al.*, 2004; Morgado *et al.*, 2002).

1.1. HISTÓRICO

O primeiro indício de que a AIDS poderia estar associada a um retrovírus foi obtido em 1983, quando o grupo do pesquisador Luc Montagnier isolou um vírus contendo transcriptase reversa de um indivíduo com síndrome de linfadenopatia persistente (Levy J.A., 1998; Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). As características do retrovírus descrito pelo grupo de Luc Montagnier incluíam algumas que eram semelhantes às características do vírus T linfotrópico

humano (HTLV). A idéia de que um HTLV estaria associado a AIDS foi fortalecida pelo grupo de pesquisa de Robert Gallo. Em 1983, Gallo *et al.* isolaram um HTLV de um indivíduo com AIDS (Levy J.A., 1998; Gallo *et al.*, 1983).

No entanto, parecia improvável que um HTLV fosse o agente etiológico da AIDS. A drástica perda de linfócitos T auxiliares observada em indivíduos com AIDS não poderia ser explicada pela infecção por um HTLV. Esses vírus em geral não destroem os linfócitos; ao contrário, eles induzem a imortalização dos linfócitos infectados (Levy J.A., 1998).

Ainda em 1983, o grupo de pesquisa de Luc Montagnier mostrou que aqueles retrovírus isolados de pacientes com AIDS, apesar de similares ao HTLV, possuíam características distintas. Eles causavam a morte de linfócitos T auxiliares em cultura, e por isso foram batizados de LAV (*Lymphadenopathy-Associated Virus*) (Levy J.A., 1998).

Continuando a busca do agente responsável pela AIDS, em 1984 o grupo do pesquisador Robert Gallo caracterizou um outro retrovírus distinto do HTLV, que foi denominado de HTLV-III. Este foi isolado de células mononucleadas do sangue periférico de adultos e crianças com AIDS. No mesmo ano, Levy e colaboradores também identificaram um retrovírus, chamado de ARV (*AIDS-Associated Retrovirus*), isolado tanto de pacientes com AIDS com diferentes comportamentos de risco quanto de pessoas assintomáticas (Levy J.A., 1998; Levy *et al.*, 1984).

Os três protótipos virais encontrados, LAV, HTLV-III e ARV, foram reconhecidos como sendo um mesmo vírus, pertencente à família *Retroviridae*. Em 1986, com o intuito de evitar a sinonímia para o vírus responsável pela AIDS, o Comitê Internacional para Taxonomia dos Vírus (ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*) recomendou nomear esse agente de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Levy J.A., 1998).

Em 1986, um outro vírus associado à AIDS foi identificado no oeste africano. Esse novo vírus apresentava diferenças sorológicas e filogenéticas em relação ao HIV. Por esse motivo, o vírus HIV passou, desde então, a ser denominado HIV-1, e o segundo vírus identificado foi denominado HIV-2. Ambos podem causar AIDS; no entanto, a progressão da doença é mais lenta em indivíduos infectados pelo HIV-2 (Levy J.A., 1998).

1.2. A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA ADQUIRIDA (AIDS)

De acordo com o UNAIDS, aproximadamente 40,3 milhões de pessoas estavam vivendo com HIV/AIDS no mundo em 2005. A maioria dos infectados, cerca de 60%, se encontram na África Sub-Saariana, enquanto na América Latina se encontram cerca de 5% dos casos de HIV/AIDS, como pode ser observado na Figura 1 (UNAIDS, 2005). No Brasil existem cerca de 600 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS, o equivalente a menos de 1% do número de casos mundiais (UNAIDS, 2005). No Distrito Federal, foram relatados cerca de 3700 casos de AIDS no ano de 2005 (Brasil, 2005).



Figura 1. Estimativa do número de adultos e crianças no mundo portadores do vírus HIV-1, até o final de 2005 (UNAIDS, 2005).

Até o final de 2005, foram registrados aproximadamente 4,1 milhões de novas infecções por HIV e cerca de 2,8 milhões de óbitos (UNAIDS, 2005). No Brasil foram registrados 10.895 óbitos decorrentes de AIDS no ano de 2004, dos quais 112 ocorreram no Distrito Federal (Brasil, 2005).

A AIDS é uma doença de progressão lenta, que pode ser dividida em três fases clínicas distintas. A primeira, chamada de fase aguda, ocorre poucos dias após a infecção primária. Nessa fase, ocorre intensa replicação viral nos tecidos linfóides, como por exemplo os linfonodos. Alguns sintomas podem ocorrer em alguns indivíduos nessa fase, tais como: febre, dor de cabeça, dor de garganta acompanhada de faringite e linfadenopatia generalizada. Entretanto, a ausência de qualquer sintoma também pode ocorrer (Abbas & Lichtman, 2003; Levy J.A., 1998).

O aumento da viremia, decorrente da replicação viral nos órgãos linfóides, permite a infecção de tecidos linfóides periféricos. Entretanto, a resposta imune adaptativa, tanto celular como humoral, controla parcialmente a infecção e a produção de partículas virais. Esse controle leva a uma queda na viremia para níveis baixos, porém detectáveis, por volta de doze semanas após a exposição inicial (Abbas & Lichtman, 2003; Levy J.A., 1998).

Após o primeiro estágio, observa-se a fase assintomática e crônica da infecção. Durante esse período, poucos vírus podem ser produzidos, a quantidade de partículas virais presentes no plasma é menor do que a observada nas outras fases e poucas células infectadas são encontradas no sangue periférico. O sistema imune permanece competente e é capaz de controlar a infecção pelo HIV e por outros patógenos oportunistas. Praticamente nenhum sintoma é observado. No entanto, nos tecidos linfóides há uma progressiva infecção e destruição de linfócitos T CD4, o que é refletido pelo declínio gradual e progressivo no número dessas células circulantes no sangue. Essa fase dura, em média, 10 anos. No entanto, alguns pacientes são frequentemente chamados de não progressores devido a um lento declínio na população de linfócitos T CD4 e também a uma baixa carga viral por um tempo maior. Esses indivíduos podem permanecer nesse estágio da infecção por até 17 anos (Abbas & Lichtman, 2003; Levy J.A., 1998).

O último estágio da doença é denominado AIDS, ou fase sintomática, que é caracterizado pela perda da competência do sistema imune devido à destruição maciça dos tecidos linfóides. A contagem de linfócitos T CD4 no sangue cai para menos de 300 células por mm^3 de sangue e a viremia aumenta drasticamente. Surgem as infecções oportunistas, causadas por patógenos como *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma* sp., *Candida* sp., entre outros. O surgimento de alguns tumores também está associado à AIDS, como o sarcoma de Kaposi e linfomas. Outros sintomas frequentes dessa doença são perda de peso e surgimento

de distúrbios neurológicos. Esses sintomas caracterizam a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e levam à morte do indivíduo infectado (Abbas & Lichman, 2003; Levy J.A., 1998).

No Brasil, são adotados alguns critérios para definição de casos de AIDS. O indivíduo com suspeita de AIDS deve possuir dois testes de triagem positivos para o HIV bem como evidência de imunodeficiência. Tal evidência é o diagnóstico de pelo menos uma doença indicativa de AIDS e/ou contagem de linfócitos T CD4 menor do que 350 células por mm³ de sangue. Dentre as doenças indicativas de AIDS são exemplos: o câncer cervical invasivo, candidíase de esôfago, criptococose extrapulmonar, linfoma primário do cérebro, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, toxoplasmose cerebral, entre outras, (Brasil, 2003).

1.3. CLASSIFICAÇÃO E VARIABILIDADE DO HIV-1

O HIV-1 pertence à família *Retroviridae*. Todos os vírus dessa família fazem a transcrição reversa, processo onde o RNA viral é utilizado como molde para síntese de um DNA viral complementar (cDNA). Esse processo é inverso ao que usualmente é observado nas entidades biológicas, onde o DNA é utilizado como molde para síntese de RNA, que por sua vez é utilizado como guia para síntese de proteínas. Outra característica desses vírus é sua integração ao genoma da célula hospedeira, que precede a produção de vírions. O nome da família tem origem no radical latim *retro*, que significa de trás para frente, em alusão a transcriptase reversa, enzima responsável pela transcrição reversa (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Os vírus dessa família são esféricos, com diâmetro entre 80-100 nm. Possuem um envelope, derivado da membrana plasmática celular, com glicoproteínas virais. O genoma viral consiste de um dímero de RNA fita simples, onde cada monômero possui entre 7 e 11 quilobases (kb). Ambos são poliadenilados em sua extremidade 3' terminal e possuem um *cap* na extremidade 5'. Cada monômero também está associado a um RNA transportador (tRNA) de origem celular, importante para a transcrição reversa (Flint *et al.*, 2004; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Todos os vírus dessa família possuem três genes, *gag*, *pol* e *env*, que se encontram dispostos nessa ordem no genoma viral. Alguns retrovírus possuem genes celulares em seu

genoma, que podem ou ser inseridos no genoma viral completo, como observado no vírus do Sarcoma de Rous (RSV – *Rous Sarcoma virus*), ou substituir genes virais, como observado no vírus do sarcoma de murinos (MSV – *Murine Sarcoma Virus*). Os genes de origem celular podem ser importantes para a patogênese viral (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

A entrada dos retrovírus na célula ocorre através da interação entre as glicoproteínas virais do envelope e receptores celulares. Essa interação inicia o processo de fusão entre o envelope viral e a membrana celular. Uma vez dentro da célula, ocorre o desnudamento viral parcial, cujo mecanismo ainda não foi completamente elucidado. A replicação tem início com a transcrição reversa do RNA viral, utilizando o tRNA celular como iniciador. Após a síntese do DNA viral, este é integrado ao genoma da célula hospedeira e passa a ser denominado provírus. O provírus é transcrito pela enzima RNA polimerase II. Todos os transcritos virais são poliadenilados e possuem um *cap* na extremidade 5' (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

A síntese das proteínas virais envolve *splicing* alternativo e clivagem de polipeptídeos precursores por proteases celulares e virais. A expressão de algumas proteínas envolve mudança de fase de leitura ribossomal (*frameshift* ribossomal) ou leitura através de códons de parada (*read-through*), de acordo com o gênero do vírus. Os capsídeos virais são montados na membrana plasmática ou no citoplasma, o último na minoria dos vírus, e são liberados da célula por brotamento. O processamento das poliproteínas pela protease viral, ou seja, a maturação do vírion, é concomitante ou subsequente ao brotamento da partícula viral (Flint *et al.*, 2004; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Muitos retrovírus são parasitas de vertebrados e estão amplamente distribuídos nesse grupo. Em geral eles são agentes etiológicos de muitas enfermidades, como leucemias, linfomas, sarcomas, tumores e imunodeficiências; alguns, no entanto, não são patogênicos. Os retrovírus podem ser transmitidos de três formas: (i) horizontalmente, pelo contato com fluídos corpóreos, como sangue, saliva, sêmen, entre outros; (ii) verticalmente, pelo parto, aleitamento ou transmissão embrionária; (iii) e de forma endógena, pela herança de provírus resultantes da infecção de células germinativas (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

A família *Retroviridae* é composta por sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*. A relação filogenética dos gêneros dessa família pode ser observada na Figura 2. O HIV-1 pertence ao grupo *Lentivirus*. O nome desse gênero tem origem no radical latino *Lenti*, que significa lento,

em alusão ao estágio de latência clínica observado em indivíduos infectados pelos vírus desse grupo (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

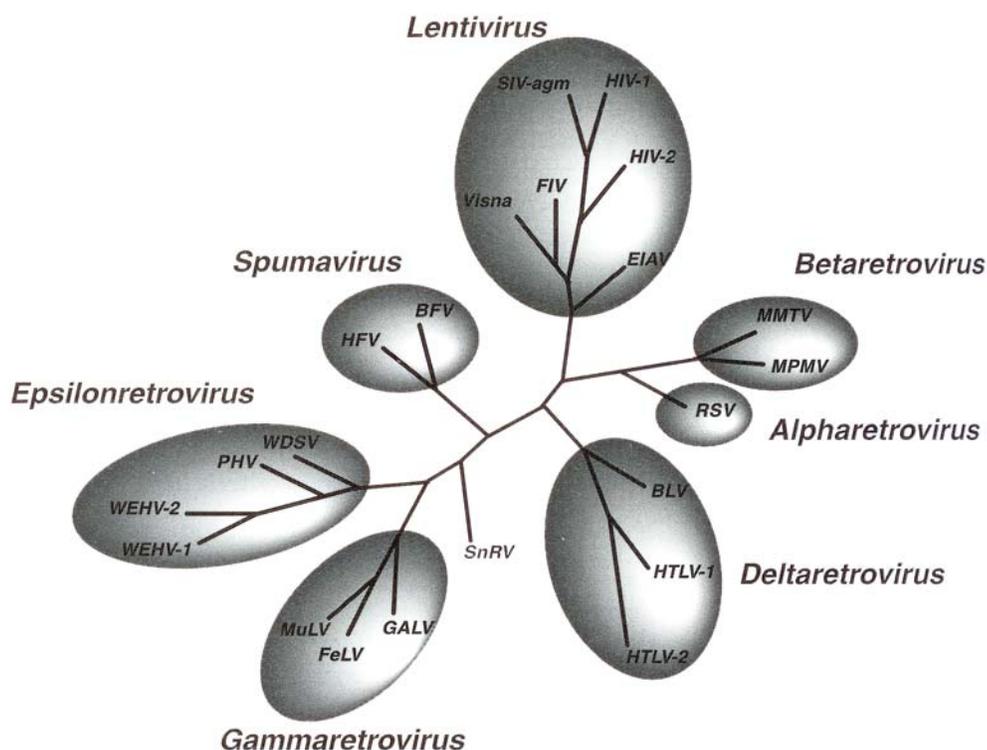


Figura 2. Relação filogenética entre os gêneros da família Retroviridae. Adaptado de Van Regenmortel *et al.* (2000).

Os lentivírus possuem o capsídeo em forma de barra ou cone, e os vírions são montados na membrana plasmática celular. Atualmente, não são conhecidos vírus endógenos ou que contenham genes celulares nesse gênero. Os lentivírus podem ser separados em cinco grupos, de acordo com o seu hospedeiro, a saber: bovinos, caprinos e ovinos, eqüinos, felinos e, por fim, primatas (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

O HIV-1 é um vírus com alta variabilidade genética. Estudos de filogenia com amostras de vírus das diferentes regiões geográficas levaram à sua classificação em três grandes grupos: M (*Major*), O (*Outlier*) e N (*Non-M, Non-O*). O grupo M é o responsável pela pandemia de AIDS. Nesse grupo já foram descritos doze subtipos e sub-subtipos, que são: A1, A2, A3, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K. Também foram descritas 32 formas recombinantes

circulantes (CRF – *Circulating Recombinant Form*); no entanto, desse total 14 ainda não foram publicadas (Leitner *et al.*, 2005).

Os subtipos do HIV-1 possuem distribuição geográfica heterogênea, como é possível notar na Figura 3. No continente africano, já foi relatada a presença de todos os subtipos do HIV-1, sendo os subtipos A, C e a CRF02_AG os mais predominantes. Na Ásia, o subtipo C e a CRF01_AE são os mais prevalentes. Na Europa, Oceania e América do Norte o subtipo B é o mais prevalente (Geretti A.M., 2006; Berzofsky *et al.*, 2004; Takebe *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2003; Osmanov *et al.*, 2002; Peeters M., 2000).

Na América do Sul observa-se uma maior prevalência do subtipo B, seguida pelo subtipo F. Casos isolados do subtipo A também foram relatados. No entanto, estudos de seqüenciamento do genoma completo do HIV-1 mostraram que a maioria desses vírus genotipados como pertencentes ao subtipo F eram, na realidade, formas recombinantes entre os subtipos B e F e entre a CRF_12BF e o subtipo F (Geretti A.M., 2006; Hierholzer *et al.*, 2002; Morgado *et al.*, 2002; Carr *et al.*, 2001; Peeters M., 2000). A Figura 3 indica a distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1 no mundo.

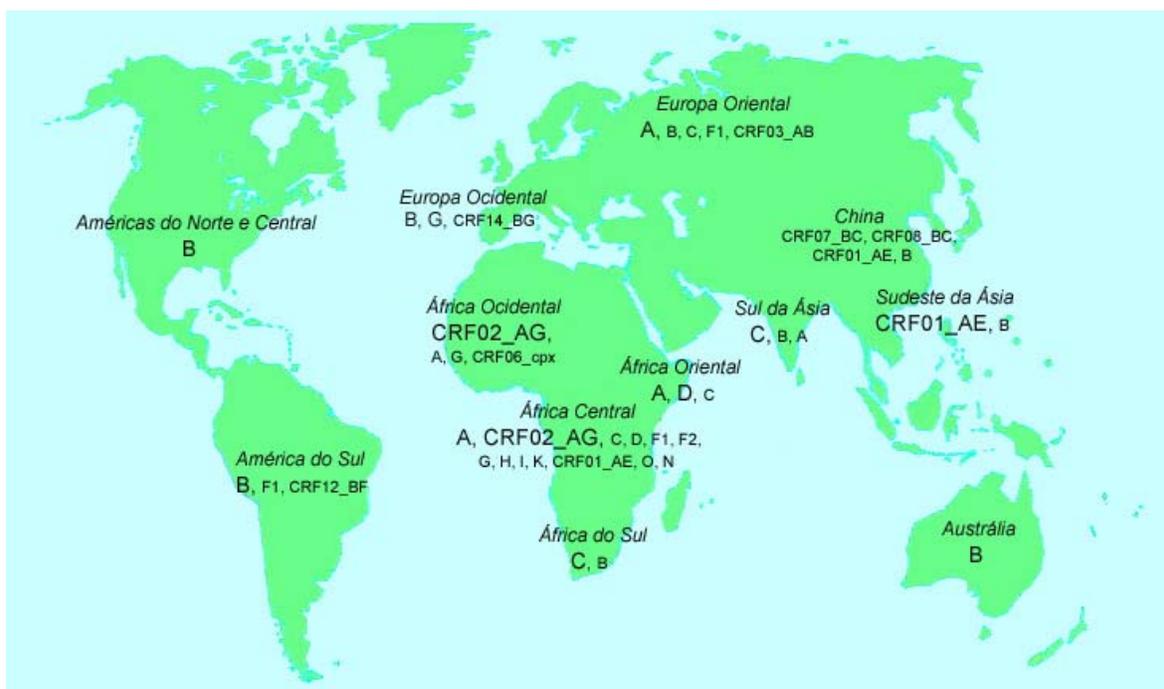


Figura 3. Distribuição geográfica do HIV-1 no mundo. Adaptado de Thomson *et al.* (2002).

No Brasil, o subtipo mais prevalente é o B, seguido pelo F1 e pelo C. No entanto, os subtipos A e D e formas recombinantes entre os subtipos B/C, B/D e B/F1 também já foram relatados. No Rio Grande do Sul e no Paraná, a prevalência do subtipo C foi de 45% e 30%, respectivamente. A prevalência desse subtipo também aumentou nos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. Nas regiões Sul e Sudeste também foi descrita a presença dos subtipos B e F1 e de formas recombinantes entre os subtipos B/F1, B/D e B/C. Na região Nordeste, além do subtipo B, cuja prevalência é de 94%, também já foram relatados os subtipos F1, C e formas recombinantes entre B/F1. Na região Norte, a prevalência do subtipo B é de 38,7%, seguido pela forma recombinante B/F com 35,5% e pelo subtipo F com 16%. Um estudo realizado no Distrito Federal encontrou uma prevalência do subtipo B de 94%, e de formas recombinantes entre B/F de 6% (Véras N.M.C., 2006; Veras V.S., 2006; Cerqueira *et al.*, 2004; Gadelha *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003a; Soares *et al.*, 2003b; Guimarães *et al.*, 2002a; Morgado *et al.*, 2002; Tanuri *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2000).

Foi observado que entre 30% e 57% dos vírus definidos como sendo do subtipo B no Brasil, na realidade, pertencem a uma forma variante deste, denominada B^{''}. Esse variante foi definido por apresentar a substituição de um resíduo de aminoácido em um motivo conservado da proteína gp120. O variante B^{''} foi descrito pela primeira vez no Japão, tendo sido relatado também na França e em alguns países da América Latina. A Figura 4 demonstra a distribuição dos subtipos do HIV-1 nas diferentes regiões do Brasil (Morgado *et al.*, 2002; Bongertz *et al.*, 2000; Vicente *et al.*, 2000; Covas *et al.*, 1998; Morgado *et al.*, 1998).

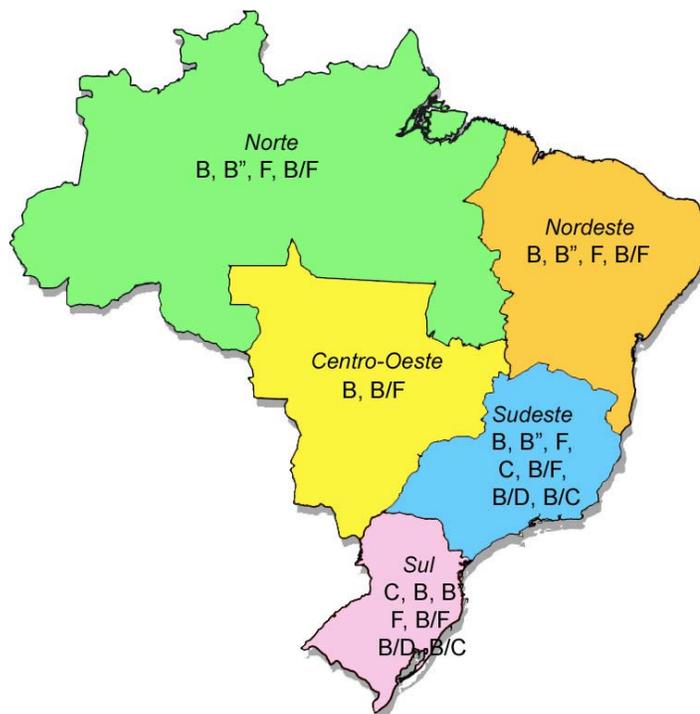


Figura 4. Distribuição dos subtipos e das formas recombinantes nas cinco regiões brasileiras (Morgado *et al.*, 2002).

A divergência nucleotídica entre os subtipos varia de acordo com a região genômica analisada, chegando a 30% de divergência no gene *env*, que é o gene mais variável do HIV-1, 16% para o gene *gag* e 13% para o gene *pol*, o mais conservado do HIV-1. A divergência genética entre os sub-subtipos varia entre 11-16% para o gene *env* e entre 7-12% para o gene *gag* (Wigg M.D., 2002; Costa *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 1999). No entanto essa divergência, que define os diferentes subtipos, parece não influir na virulência dos mesmos (Morgado *et al.*, 2002). As características de cada gene do HIV-1 serão descritas posteriormente.

1.4. VACINAS

1.4.1. Vacinas profiláticas

A melhor estratégia para conter a pandemia do HIV-1 é o desenvolvimento de uma vacina profilática (Klein M., 2003). Apesar da variabilidade genética do HIV-1 não possuir

relevância clara na patogênese dos diferentes subtipos, ela influencia diretamente a constituição antigênica dos vírus. No entanto, ainda não está esclarecido se uma vacina desenhada contra um subtipo específico será eficaz contra subtipos diferentes (Morgado *et al.*, 2002).

Há alguns aspectos problemáticos para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV-1. Entre eles, os mais relevantes são: o aumento da diversidade viral, a falta de um modelo animal para realização dos testes iniciais e o surgimento de variantes capazes de escapar da resposta imune, mesmo após a vacinação (Klein M., 2003).

Novas estratégias para o desenho de vacinas contra o HIV-1 foram idealizadas e continuam em desenvolvimento. A ativação da resposta imune celular, mais especificamente a ativação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, parece ser uma estratégia interessante (Klein M., 2003). Experimentos utilizando o SIV como modelo mostraram que primatas não humanos com uma forte resposta de linfócitos T citotóxicos foram capazes de controlar a infecção viral (Amara *et al.*, 2005). Uma forte resposta de linfócitos T citotóxicos também está associada à lenta progressão da doença em soropositivos e a não infecção em algumas mulheres africanas (Liang *et al.*, 2002; Tobery & Siliciano, 1997).

A ativação de linfócitos T auxiliares também é importante para a efetiva proteção contra o HIV-1, influenciando tanto na resposta humoral (Planz *et al.*, 1997), quanto na resposta de linfócitos T citotóxicos (Kaufmann *et al.*, 2004). A observação de que soropositivos não progressores e indivíduos em tratamento apresentam uma resposta intensa de linfócitos T auxiliares confirma a importância dessas células na contenção da infecção viral (Kaufmann *et al.*, 2004).

Espera-se que uma vacina capaz de ativar a resposta celular contra o HIV-1 induza a produção de linfócitos T citotóxicos capazes de eliminar as células infectadas antes da produção de novas progêneses virais. Para isso, seria interessante ativar linfócitos contra as proteínas regulatórias e acessórias que ocorrem no início do ciclo replicativo do vírus, como é o caso da proteína acessória Nef, que é abundante no início do ciclo infeccioso e é expressa antes mesmo da integração do genoma proviral (Cosma *et al.*, 2003; Klein M., 2003; Wu & Marsh, 2001).

Atualmente, há 33 vacinas candidatas contra o HIV-1 em teste. A primeira triagem de larga escala utilizou mais de 8000 voluntários residentes na América do Norte, Europa e

Tailândia. Os estudos com essa vacina protótipo iniciaram em 1987 e foram concluídos em 2003. No entanto, ela não foi capaz de prevenir a infecção, não teve efeito na carga viral de infectados e não foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes nos voluntários (IAVI, 2004).

1.4.2. Vacinas terapêuticas

As vacinas, além de serem utilizadas para imunizar pessoas não portadoras do vírus, também podem ser utilizadas para ajudar a controlar a infecção viral. Estudos indicam que vacinas terapêuticas são bem toleradas, além de poderem restaurar a resposta de linfócitos citotóxicos e a proliferação de células linfóides em pessoas recém infectadas e em indivíduos na fase crônica que estejam em tratamento (Klein M., 2003). Além disso, a vacinação terapêutica poderia ajudar a controlar a replicação basal observada em indivíduos sob tratamento. Cosma *et al.* (2003) vacinaram pacientes em tratamento e observaram um aumento na contagem de linfócitos T auxiliares para níveis próximos aos observados em soropositivos com lenta progressão da doença.

1.5. O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA 1

A partícula do HIV-1 possui cerca de 100 nm de diâmetro. O envelope viral, uma bicamada lipídica derivada da membrana plasmática celular, contém proteínas de membrana da célula hospedeira e glicoproteínas virais. No interior do envelope encontram-se as proteínas estruturais, que formam a matriz, o capsídeo e o nucleocapsídeo. Essas estruturas virais envolvem duas cópias de RNA fita simples e enzimas virais essenciais para a replicação viral (Larder *et al.*, 2001). A Figura 5 é um esquema da estrutura da partícula viral do HIV-1.

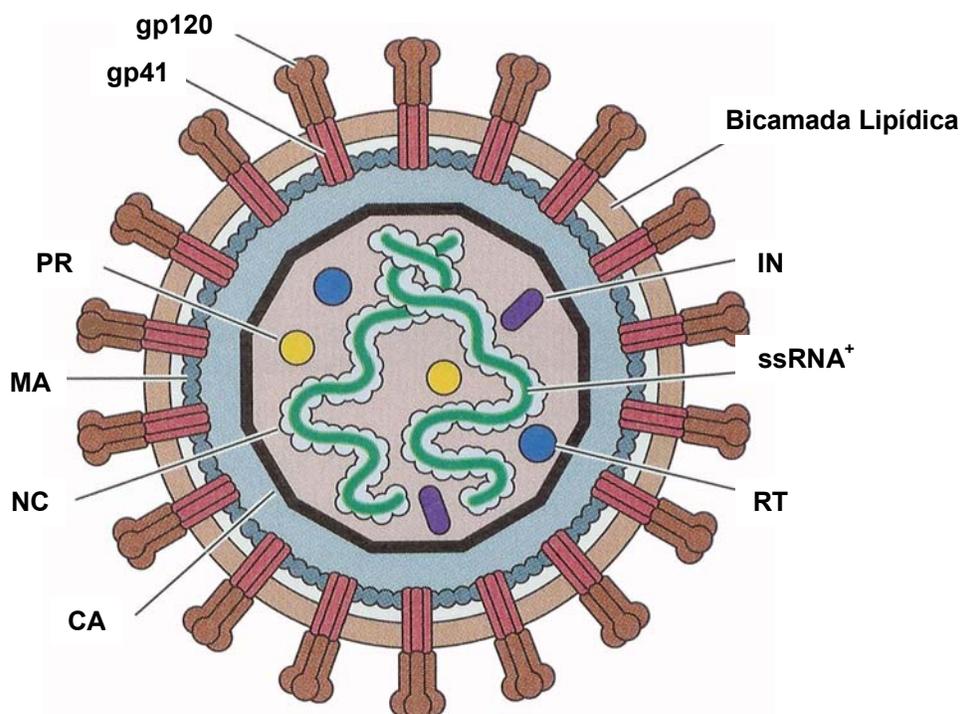


Figura 5. Estrutura da partícula viral do HIV-1. CA – capsídeo, IN – integrase, MA – matriz, NC – nucleocapsídeo, PR – protease, RT – transcriptase reversa, ssRNA⁺ - RNA fita simples positivo. Adaptado de Flint *et al.* (2004).

1.5.1. Organização genômica

O genoma do HIV-1 possui nove genes e cerca de 9,8 kb, conforme pode ser observado na Figura 6. Três genes são ditos estruturais, dois são regulatórios e quatro são acessórios. Os genes *gag*, *pol* e *env* são os estruturais. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais p17, p24, p7 e p6. O gene *pol* codifica as enzimas virais necessárias no ciclo replicativo do vírus, que são a protease, a transcriptase reversa, a RNase e a integrase. O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope, que são a glicoproteína de superfície (gp120) e a glicoproteína transmembrânica (gp41) (Larder *et al.*, 2001).

Os genes *rev* (*REgulator of Virus expression*) e *tat* (*TransAcTivation protein*) codificam proteínas que regulam a expressão gênica e a taxa de transcrição do HIV-1, respectivamente, e por isso são chamados genes regulatórios. Esses dois genes, juntamente com os três genes estruturais, são indispensáveis para a replicação viral em cultura de células (Wigg M.D., 2002).

Os outros quatro genes – *nef* (NEgative Factor), *vif* (Virion Infective Factor), *vpr* (Virus Protein R) e *vpu* (Virus Protein U) - são considerados acessórios, por serem dispensáveis à replicação em cultura de células. Entretanto, eles desempenham funções essenciais durante o ciclo viral no hospedeiro. Dentre essas funções, destacam-se a modulação da interação entre o vírus e a célula e o aumento da infectividade do vírion e da taxa de replicação viral (Das & Jameel, 2005; Emerman & Malim, 1998).

Ainda na Figura 6 é possível observar que nas extremidades 3' e 5' do cDNA viral existem duas longas seqüências repetidas (LTR – *Long Terminal Repeat*). Essas seqüências são importantes para a integração do cDNA viral no genoma da célula hospedeira, o início e o término da transcrição do DNA proviral, além de ser sítio de ligação da proteína regulatória Tat (Wigg M.D., 2002; Levy J.A., 1998).

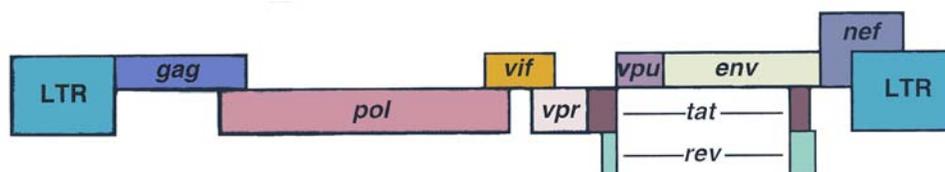


Figura 6. Organização genômica do HIV-1. LTR – *long terminal repeat*; *gag* – codifica proteínas estruturais; *pol* – codifica enzimas virais; *vif* – *virion infective factor*; *vpr* – *virion protein r*; *vpu* – *virion protein r*; *tat* – *transactivating protein*; *rev* – *regulator of virus expression*; *env* – codifica proteínas do envelope; *nef* – *negative factor* (Abbas & Lichtman, 2003).

1.5.2. Proteínas virais

O gene *gag* codifica quatro proteínas responsáveis pela estruturas protéicas da partícula viral, que são p24, p17, p7 e p6. Inicialmente, esse gene é traduzido como uma poliproteína – p55 – por ribossomos livres no citoplasma. Essa poliproteína é miristoilada em sua extremidade N-terminal, e por isso se associa rapidamente a membrana plasmática da célula hospedeira. A p55 se associa ao RNA viral para formar capsídeos imaturos. A poliproteína é clivada pela protease viral durante ou após o brotamento da partícula viral, gerando quatro proteínas menores - p24, p17, p7 e p6 - e promovendo a maturação do vírion (Larder *et al.*, 2001).

As proteínas p17, ou proteínas da matriz (MA), permanecem presas à superfície interna do envelope, estabilizando a partícula viral. Uma pequena porcentagem de p17 se associa à

integrase e facilita o transporte do genoma viral para o núcleo celular, após a entrada do vírion na célula (Larder *et al.*, 2001). As proteínas p24, ou proteínas do capsídeo (CA), formam uma estrutura cônica que envolve os RNAs virais, a qual pode ser visualizada por microscopia eletrônica no interior da partícula viral (Larder *et al.*, 2001). As proteínas p7, ou proteínas do nucleocapsídeo (NC), reconhecem o sinal de empacotamento no RNA viral, o qual está localizado na porção 5' terminal dos RNAs e é importante para a incorporação destes nos vírions. A proteína p7 possui dois domínios dedo de zinco, que são os responsáveis pela sua interação com o sinal de empacotamento. Além disso, a p7 também facilita o processo de transcrição reversa (Larder *et al.*, 2001). O papel das proteínas p6 consiste em mediar a interação entre a poliproteína p55 e a proteína viral Vpr, levando à incorporação de Vpr nos vírions (Larder *et al.*, 2001).

O segundo gene estrutural, *pol*, codifica um polipeptídeo precursor das enzimas virais integrase (IN), protease (PR) e transcriptase reversa (RT). A extremidade 5' desse gene se sobrepõe parcialmente a extremidade 3' do gene *gag*, como pode ser observado na Figura 6. No entanto, *pol* é traduzida em uma fase de leitura diferente de *gag*. Como o gene *pol* não possui códon de iniciação, a síntese do polipeptídeo ocorre através de um *frameshift* ribossomal a partir de ribossomos que estavam traduzindo a poliproteína Gag. O produto desse *frameshift* é o precursor fusionado Gag-Pol, também chamado p160. A protease viral é responsável por clivar os dois polipeptídeos precursores e também Pol, gerando a integrase, a protease e a transcriptase reversa. Essa clivagem ocorre durante o brotamento das partículas, ou logo após a liberação do vírion (Flint *et al.*, 2004; Larder *et al.*, 2001).

A enzima transcriptase reversa (RT) é um heterodímero constituído das proteínas p66 e p51. A proteína p66 contém um domínio de DNA polimerase dependente de RNA e um domínio de RNase H, localizado na porção C-terminal da proteína. A proteína p51 é idêntica à proteína p66, exceto pela ausência do domínio RNase H, que é removido pela protease. Além disso, a estrutura terciária do domínio DNA polimerase de p51 é diferente do de p66, e por isso não é capaz de catalisar a reação de polimerização do DNA viral (Larder *et al.*, 2001).

A RT é responsável pela síntese do DNA viral de dupla fita, utilizando como molde o RNA de fita simples existente na partícula viral. A síntese da primeira fita de DNA utiliza o tRNA^{Lis}, de origem celular e presente no vírion, como iniciador. Após a síntese dessa fita observa-se uma forma híbrida de DNA-RNA. Em seguida, o RNA desse híbrido é clivado pelo

domínio RNase H da RT. Essa clivagem, no entanto, é parcial, e fragmentos de RNA permanecem associados ao DNA viral. Esses fragmentos são utilizados como iniciadores para síntese da segunda fita do DNA viral (Larder *et al.*, 2001).

Uma característica importante dessa enzima é a sua alta taxa de erros e ausência de mecanismos de verificação e reparo. Essa alta taxa, em conjunto com a grande produção de novos vírions, é a razão principal do HIV-1 possuir uma grande variabilidade genética e adquirir mutações com rapidez. A RT também pode ser deslocada para a outra fita de RNA existente no vírion, em função das estruturas secundárias dos RNAs, e utilizá-la na síntese do cDNA. Esse evento explica o surgimento de linhagens virais recombinantes e é mais um mecanismo para o aumento da variabilidade do HIV-1 (Larder *et al.*, 2001).

A protease viral (PR), também chamada p10, é um homodímero simétrico, responsável pela clivagem dos peptídeos precursores Gag-Pol, Gag e Pol, bem como pela maturação do vírion. Essa enzima se auto-ativa somente no interior de partículas virais, em brotamento ou que foram liberadas no meio extracelular. Logo, os vírions se tornam infecciosos, ou maduros, apenas no momento de sua liberação ou quando já estão no meio extracelular (Flint *et al.*, 2004; Larder *et al.*, 2001).

A enzima integrase (IN), ou p32, é responsável pela inserção do cDNA viral no DNA nuclear. Essa inserção não é sítio específica, e pode ocorrer em qualquer região do genoma celular. Essa proteína possui três domínios: o N-terminal, o catalítico central e o C-terminal. Os domínios existentes nas extremidades da proteína estão envolvidos na interação da IN com os DNAs viral e celular. O domínio catalítico é responsável pelas reações de integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira (Flint *et al.*, 2004; Larder *et al.*, 2001).

O terceiro e último gene estrutural é o *env*, que codifica duas glicoproteínas, a gp120 e a gp41. A glicoproteína gp120 ocorre na superfície externa do envelope viral associada, por interações não covalentes, a gp41, a glicoproteína transmembrânica. O gene *env* é traduzido no retículo endoplasmático rugoso na forma de um precursor, gp160, o qual é clivado no complexo de Golgi por proteases celulares, gerando gp41 e gp120 (Larder *et al.*, 2001).

O início da infecção celular ocorre pelo reconhecimento de gp120 pela glicoproteína celular CD4, com subsequente associação entre as duas. Essa associação promove alterações conformacionais em gp120, expondo sítios de associação a quimiocinas existentes nessa glicoproteína. Esses sítios se associam aos co-receptores celulares CCR5 ou CXCR4,

provocando alterações conformacionais em gp41. Essas alterações expõem uma região hidrofóbica de gp41, denominada peptídeo de fusão, que se insere na membrana plasmática da célula alvo. Esse evento aproxima o envelope viral da membrana celular, permitindo a fusão das mesmas e a entrada do capsídeo viral no citoplasma (Larder *et al.*, 2001).

O gene regulatório *tat* codifica um ativador transcricional essencial para a replicação do HIV-1, a proteína Tat. Na ausência desse ativador há uma redução de pelo menos mil vezes na quantidade de transcritos virais (Larder *et al.*, 2001). Tat reconhece e interage com uma seqüência na LTR 5' terminal do HIV-1, denominada TAR (*Tat Activating Region*), que por sua vez possui um sítio de interação com a ciclina T. Além disso, Tat também se liga diretamente a ciclina T. A proteína quinase Cdk9 (*Cyclin dependent kinase 9*) é recrutada e interage com a ciclina T. Essa interação ativa Cdk9, que hiperfosforila o domínio C-terminal (CTD) da RNA polimerase II (RNA Pol II), aumentando a elongação dos transcritos virais do HIV-1. Outras proteínas celulares também participam do processo de ativação da transcrição por Tat (Lodish *et al.*, 2003). A Figura 7 mostra um modelo esquemático da atuação de Tat.

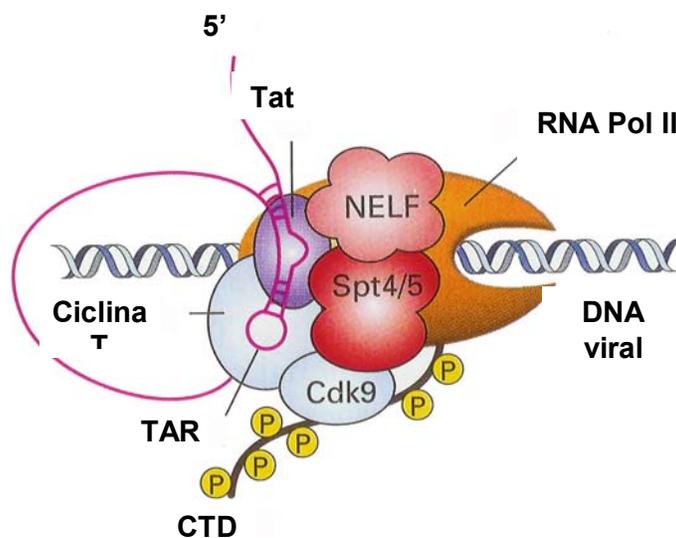


Figura 7. Modelo esquemático da atuação de Tat. Tat interage com TAR e ciclina T, e recruta Cdk9. Cdk9 hiperfosforila o CTD (domínio C-terminal) da RNA Pol II, aumentando a transcrição do genoma viral. NELF e Spt4/5 são proteínas celulares que também participam desse processo. Adaptado de Lodish *et al.* (2003).

O segundo gene regulatório é *rev*, que codifica a proteína Rev. Essa proteína possui afinidade por seqüências de RNA e um sinal para exportação nuclear. Além disso, Rev regula a expressão diferencial dos genes do HIV-1. As proteínas regulatórias Rev e Tat e a proteína acessória Nef são sintetizadas no início do ciclo infeccioso do HIV-1, e por isso são chamadas de proteínas da fase precoce. Essas três proteínas são traduzidas a partir de RNAs mensageiros (mRNAs) que sofreram múltiplos eventos de processamento do RNA (*splicing*). No início da infecção, Rev acumula no núcleo e se associa aos mRNAs virais recém-transcritos. Essa ligação ocorre em uma região chamada RRE (*Rev Responsive Element*) localizada dentro da região de *env* (Larder *et al.*, 2001).

A ligação de Rev aos mRNAs recém-transcritos promove a saída destes do núcleo antes de serem processados completamente, ou seja, antes de sofrerem múltiplos eventos de *splicing*. Dessa forma, Rev promove o surgimento de mRNAs que não sofreram *splicing* ou que sofreram *splicing* parcial fora do núcleo. Esses mRNAs dão origem às proteínas virais Gag-Pol, Gag, gp160, Vpu, Vpr e Vif, e estas, por surgirem em uma etapa posterior, são chamadas de proteínas da fase tardia. Logo, o acúmulo de Rev no núcleo induz a transição da fase precoce para a fase tardia da infecção. A ausência de Rev causa a ausência das proteínas tardias e a conseqüente não produção de vírions (Flint *et al.*, 2004; Abbas & Lichtman, 2003; Larder *et al.*, 2001).

O gene acessório *vpr* (*Virus Protein R*) codifica uma proteína que é incorporada nas partículas virais. Essa proteína é importante na infecção de células que não estão em processo de divisão celular. Vpr facilita o transporte do complexo pré-integração, PIC (*Pre-Integration Complex*), para o núcleo. PIC é constituído pelo DNA viral e a enzima integrase. Vpr também pode interferir no ciclo de divisão celular de células infectadas, provocando a parada do ciclo na fase G2 (Larder *et al.*, 2001).

Outro gene acessório é *vpu* (*Virus Protein U*), que codifica uma proteína localizada nas membranas das organelas celulares. Durante a infecção viral, glicoproteínas CD4 recém sintetizadas se complexam a gp160 no retículo endoplasmático, causando o aprisionamento de ambas nessa organela. A formação dos complexos CD4-gp160 interfere na produção dos novos vírions, por reduzir a quantidade de glicoproteínas do envelope disponíveis para montagem das partículas virais. Vpu promove a liberação de gp160, induzindo a degradação de CD4. Além disso, Vpu aumenta a liberação de vírions da superfície celular. Na ausência de

Vpu, observa-se um acúmulo de partículas virais na região do córtex celular (Larder *et al.*, 2001).

O terceiro gene acessório, *vif* (*Virion Infective Factor*), codifica uma proteína importante para a infectividade da partícula viral. Vif é necessária no momento da montagem do vírion. Na ausência de Vif, há fusão entre as membranas celular e viral, porém não há síntese do DNA proviral (Larder *et al.*, 2001).

1.6. A PROTEÍNA NEF

O gene *nef* (NEgative Factor) é formado por um único éxon, que se inicia no nucleotídeo 8797 e termina no nucleotídeo 9417, de acordo com o isolado de referência HXB2. Como pode ser observado na Figura 6, *nef* sobrepõem-se parcialmente a LTR 3' terminal. Seu nome originou-se de experimentos onde essa proteína regulou negativamente a LTR viral, o que inibiria a replicação viral do HIV-1 (Larder *et al.*, 2001; Ahmad & Venkatesan, 1988). No entanto, foi demonstrado que a proteína Nef promove aumento na replicação viral, dentre outras atividades biológicas (Kumar & Mitra, 2005).

Nef, também chamada de p27, é a principal proteína acessórias do HIV-1 e é a primeira proteína viral a se acumular na célula. É uma proteína com cerca de 27 kDa e, como é N-miristoilada, encontra-se associada à membrana citoplasmática. Uma representação da proteína Nef pode ser observada na Figura 8. Essa proteína é abundante no início da replicação do HIV-1 e também pode ser encontrada dentro da partícula viral. Nef desempenha diversas funções importantes durante a infecção viral *in vivo*, tais como aumentar a infectividade e a replicação viral, modular negativamente proteínas presentes na superfície celular (CD4, MHC I), alterar as vias de sinalização celular, induzir apoptose em células efectoras do sistema imune e inibir apoptose nas células hospedeiras dos vírus (Das & Jameel, 2005; Kumar & Mitra, 2005; Campbell *et al.*, 2004; Schiavoni *et al.*, 2004; Swingler *et al.*, 2003; Geleziunas *et al.*, 2001; Larder *et al.*, 2001; Piguet *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1999; Manninen *et al.*, 1998; Oldridge & Marsh, 1998; Lim *et al.*, 1994).

A seguir, serão descritas em mais detalhes algumas funções de Nef. As posições dos motivos discutidos a seguir estão de acordo com o isolado de referência HXB2 (número de acesso K03455).

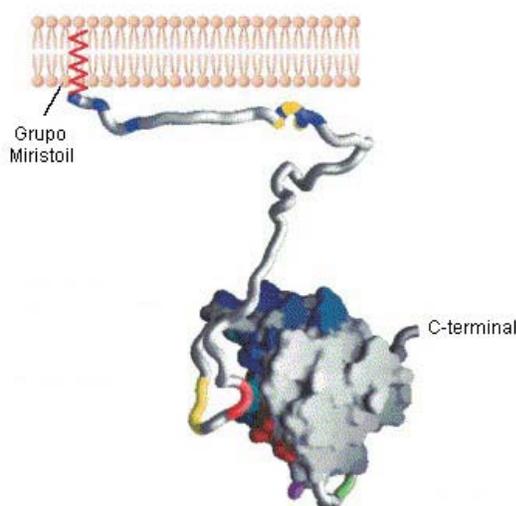


Figura 8. Representação da proteína Nef associada à membrana plasmática. Em amarelo estão destacados motivos associados à modulação negativa de MHC I. Em azul estão destacados motivos envolvidos na interação com domínios SH3. Em vermelho estão destacados resíduos envolvidos na interação com CD4. Em verde está destacado o motivo associado à interação com coatômeros. Em roxo está destacado o motivo associado à interação com AP-2. Adaptado de Arold & Baur (2001).

1.6.1. Modificações pós-traducionais

A proteína Nef sofre algumas modificações pós-traducionais que são importantes para o desempenho de suas atividades biológicas, como por exemplo, a adição de miristato, um ácido graxo de 14 carbonos, à sua região N-terminal. A miristoilação de Nef é necessária para sua associação com membranas celulares e é importante em diversas de suas atividades *in vitro* e *in vivo*. O sítio de miristoilação é o motivo MGxxxS¹⁻⁶. A substituição G2A, nesse sítio, compromete a localização celular de Nef e sua capacidade de modular negativamente CD4 e MHC I (Das & Jameel, 2005; Geyer *et al.*, 2001).

Outra modificação pós-traducional em Nef é a sua clivagem pela protease viral. O sítio de reconhecimento da protease é o motivo CAWLEA⁵⁵⁻⁶⁰. A clivagem ocorre entre os resíduos W⁵⁷ e L⁵⁸ e determina sua organização modular, distinguindo-a em dois grandes domínios: o de ancoramento e o central. O domínio de ancoramento estaria associado à interação de Nef com membranas, enquanto o domínio central estaria relacionado às atividades biológicas de Nef (Pandori *et al.*, 1996; Welker *et al.*, 1996). O resíduo W⁵⁷

também interage com uma fenda hidrofóbica existente na região central de Nef, estabilizando o *loop* PxxP formado pelos resíduos W⁵⁷ até T⁸⁰ (Grzesiek *et al.*, 1997).

A proteína Nef também é modificada por fosforilação. A proteína quinase A (PKA) fosforila o resíduo de serina na posição nove (S⁹) de Nef. Essa modificação covalente é importante para o aumento da replicação viral em células quiescentes. A substituição S9A, que elimina o sítio de fosforilação de PKA, reduz consideravelmente a replicação viral (Li *et al.*, 2005).

1.6.2. Modulação de CD4

A mais estudada das funções de Nef é a habilidade de modular negativamente o receptor celular CD4, existente na superfície das células infectadas. O receptor CD4 é uma glicoproteína transmembrânica que ocorre na superfície de linfócitos T CD4, fagócitos mononucleares e em algumas células dendríticas. Essa glicoproteína possui duas funções biológicas. A primeira é a adesão entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T CD4. A segunda é a participação no início da cascata de sinalização, que ocorre logo após o reconhecimento de epitopos antigênicos (Abbas & Lichtman, 2003).

Quando uma célula apresentadora de antígeno, apresentando peptídeos por meio de MHC de classe II, interage com algum linfócito T que reconheça esse epitopo, o receptor de célula T, do linfócito reconhece o epitopo antigênico e se associa ao mesmo. Nesse instante, CD4 age como co-receptor reconhecendo um sítio na molécula de MHC de classe II. Essa interação provoca alterações conformacionais em CD4, que ativam a proteína quinase p56^{Lck}. Essa quinase inicia uma cascata de fosforilação, ativando o linfócito T CD4. A quinase p56^{Lck} é uma tirosina quinase, que está fortemente associada a CD4 de forma não-covalente. (Abbas & Lichtman, 2003).

A modulação negativa de CD4, causada pela proteína Nef, ocorre pela alteração dos mecanismos celulares de endocitose. A endocitose de CD4 é dependente de clatrina. A interação entre clatrina e CD4 é mediada pelo complexo protéico AP-2. Os complexos AP (*Adapter Protein*) estão envolvidos na formação de vesículas para o tráfego intracelular de moléculas, sendo que existem quatro complexos AP diferentes: AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4 (Bonifacino & Traub, 2003). O complexo AP-2 interage com resíduos hidrofóbicos existentes

na porção citoplasmática de CD4, iniciando a formação da vesícula endocítica revestida por clatrina. No entanto, esses resíduos hidrofóbicos em CD4 estão associados à p56^{Lck}, impedindo sua interação com o complexo AP-2 e, conseqüentemente, inibindo a endocitose. A fosforilação do resíduo S408 na porção citoplasmática de CD4 induz a dissociação de p56^{Lck}, o que promove a interação entre CD4 e o complexo AP-2, iniciando a endocitose (Oldridge & Marsh, 1998).

Nef interage com os resíduos hidrofóbicos no domínio citoplasmático de CD4, especificamente dois resíduos de leucina, removendo a proteína quinase p56^{Lck} sem a necessidade de fosforilação do resíduo S408 de CD4. Em seguida, Nef interage com a subunidade catalítica do complexo V-ATPase (*Vacuolar membrane ATPase complex*) (Geyer *et al.*, 2002), necessário na acidificação de endossomos e lisossomos (Stevens & Forgac, 1997). Como o complexo AP-2 encontra-se associado à clatrina, Nef promove a associação entre a glicoproteína CD4 e o complexo AP-2, causando a endocitose desse receptor, como pode ser observado na Figura 9 (Lu *et al.*, 1998).

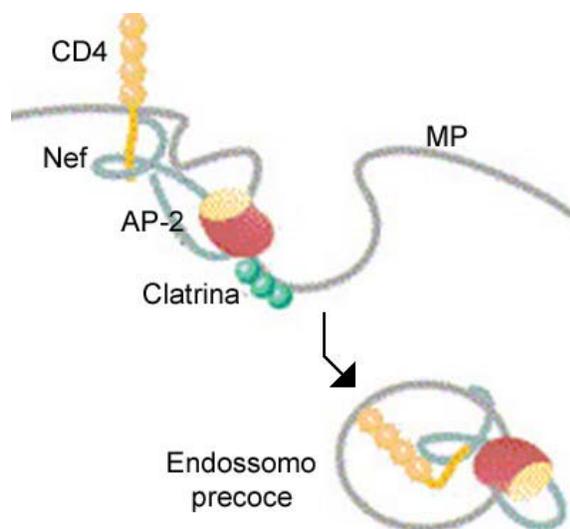


Figura 9. Esquema da interação entre CD4, AP-2, Clatrina e Nef. MP – membrana plasmática. AP-2 em vermelho, CD4 está em amarelo, clatrina em verde e Nef em azul. Adaptado de Arold & Baur (2001).

Vários resíduos da proteína Nef são importantes na endocitose de CD4: WL^{57,58}, G⁹⁵, G⁹⁶, L⁹⁷, R¹⁰⁶, I¹⁰⁹ e L¹⁰⁰ (Grzesiek *et al.*, 1996a; Grzesiek *et al.*, 1996b). O motivo dileucina

(D/E)xxxLL¹⁶⁰⁻¹⁶⁵ e os resíduos DD^{174,175} são essenciais na interação com AP-2 e com o complexo V-ATPase, respectivamente (Janvier *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 1998; Greenberg *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998).

Após a endocitose, a proteína Nef promove o endereçamento de CD4, dos endossomos precoces para os endossomos tardios e, posteriormente, lisossomos, onde ocorre sua degradação. Esse transporte acontece através de vesículas cobertas por coatômeros (Piguet *et al.*, 1999). Coatômeros são complexos protéicos formados por sete subunidades diferentes, chamadas COPs (*COatomer Protein*). Eles revestem vesículas envolvidas no tráfego celular não seletivo. A montagem e a desmontagem dos revestimentos de coatômeros são reguladas pela proteína ARF (*ADP-Ribosilation-Factor*) (Alberts *et al.*, 1997).

Nef interage com ARF1. A associação entre Nef e ARF1 favorece a ligação das subunidades formadoras do coatômero COP1. As vesículas revestidas por coatômeros transportam CD4 para endossomos tardios e lisossomos, onde ela é degradada. Os resíduos EE^{155,156} em Nef mostraram-se importantes no processo de endereçamento para endossomos tardios e lisossomos. Porém, mutações nesses resíduos afetam parcialmente a interação de Nef com os coatômeros, indicando que outros resíduos devem participar desse processo (Fauré *et al.*, 2004).

A modulação negativa do receptor CD4 é importante no curso da infecção viral. As proteínas gp120 de vírions recém formados podem interagir com CD4, causando a retenção dos vírus. Essa retenção diminui significativamente a quantidade de partículas infecciosas liberadas. A expressão de Nef inibe esse efeito, aumentando a dispersão dos vírions *in vivo* (Ross *et al.*, 1999). A redução de CD4 na superfície celular também auxilia na proteção contra superinfecção pelo HIV, ou seja, contra a entrada de múltiplos vírus na mesma célula. Essa superinfecção traz efeitos citotóxicos, como acúmulo de genomas virais não integrados (Michel *et al.*, 2005). Provavelmente esses mecanismos estão relacionados ao aumento da patogênese viral causada por Nef (Argañaraz *et al.*, 2003; Stoddart *et al.*, 2003).

Carl *et al.* (2001) mostraram que a proteína Nef encontrada em indivíduos não progressores é menos eficiente na modulação negativa de CD4 do que Nef encontrada em indivíduos com AIDS. Essa diferença está associada a resíduos específicos nas proteínas Nef de progressores: P¹¹, A¹⁵, R³⁹, T⁵¹, T¹⁵⁷, C¹⁶³, N¹⁶⁹, Q¹⁷⁰ e M¹⁸², quando comparada a Nef de não progressores: T¹⁵, N⁵¹, H¹⁰², L¹⁷⁰ e E¹⁸² (Kirchhoff *et al.*, 1999). Kirchhoff *et al.* (1999)

também mostraram que essas substituições tendem a surgir ao longo da progressão da doença. Argañaraz *et al.* (2003) mostraram que essas substituições, encontradas em Nef de indivíduos com AIDS e que acarretam em modulação negativa de CD4 mais eficiente, estão associadas ao aumento na incorporação de gp120 nas partículas virais, e conseqüente aumento na infectividade viral. Provavelmente, a modulação de CD4 é mais importante na fase de AIDS do que na fase assintomática, e por isso haveria uma pressão seletiva para o surgimento dessas substituições (Carl *et al.*, 2001).

1.6.3. Modulação de MHC classe I

O complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC I) é expresso em todos os tipos celulares. Essas moléculas se complexam a epitopos provenientes das proteínas presentes no interior celular. Quando a célula apresenta algum epitopo identificado como estranho, por estar infectada com algum patógeno, ela é eliminada (Abbas & Lichtman, 2003).

A proteína Nef interage com MHC I presente na superfície celular, causando sua endocitose e seu acúmulo na região trans do complexo de Golgi. Entretanto, sua atuação nesse processo ocorre de maneira distinta ao da modulação de CD4 (Das & Jameel, 2005).

Inicialmente, Nef se associa a PACS-1 (*Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein-1*) e AP-1 e é direcionada à região trans do complexo de Golgi. No complexo de Golgi, Nef adquire a habilidade de se associar a PI3K (fosfatidil inositol-3 quinase). Nef ativa PI3K, que catalisa a síntese de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), na membrana plasmática. A proteína ARNO (*ADP-ribosylation factor nucleotide binding site opener*) é recrutada para a membrana e interage com PIP3. ARNO complexada a PIP3 ativa ARF6 (*ADP-Ribosylation Factor 6*), substituindo GDP por GTP nessa proteína. A proteína ARF6 ativa promove a internalização do MHC de classe I (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002). Uma representação desse modelo pode ser observada na Figura 10. Entretanto, há controvérsias sobre a endocitose de MHC I mediada por ARF6. Larsen *et al.* (2004) mostraram que a endocitose de MHC I observada por Blagoveshchenskaya *et al.* (2002) ocorreu devido a perturbações não específicas na maquinaria de transporte de vesículas, refutando o modelo proposto por Blagoveshchenskaya *et al.* (2002). As regiões de Nef importantes na modulação de MHC I são MGxxxS¹⁻⁶, M²⁰, EEEE⁶²⁻⁶⁵ e PxφPxR⁷²⁻⁷⁷ (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002).

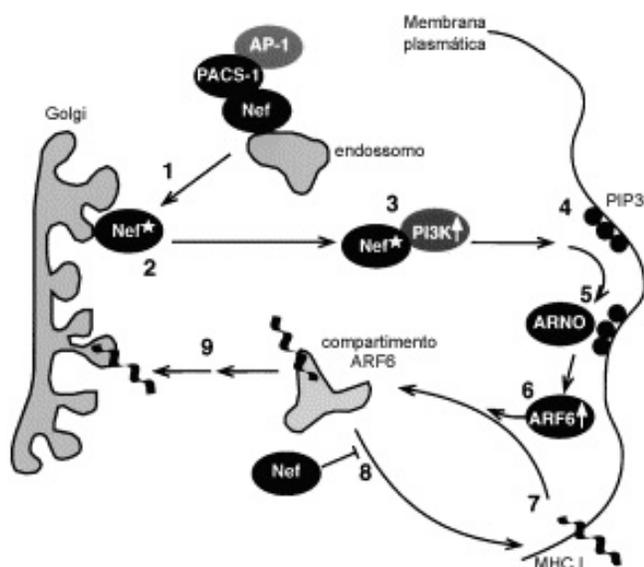


Figura 10. Modelo proposto por Blagoveshchenskaya *et al.* (2002). 1 – Nef se associa a PACS-1 e AP-1 através do motivo EEEE⁶²⁻⁶⁵ e é translocada para o Complexo de Golgi. 2 – No complexo de Golgi, Nef adquire afinidade por PI3K, mostrado pela estrela, devido a alterações conformacionais no motivo P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷. 3 – Nef ativa PI3K, estado ativado de PI3K evidenciado pela seta. 4 – PI3K catalisa a síntese de PIP3 na membrana plasmática. 5 – ARNO é recrutada para a membrana e interage com PIP3. 6 – ARNO ativa ARF6, estado ativado de ARF-6 evidenciado pela seta. 7 – ARF6 ativada induz a internalização de MHC I, para compartimentos intracelulares. 8 – Nef impede o retorno de MHC I para a membrana plasmática, o resíduo M²⁰ de Nef participa desse processo. 9 – MHC I é encaminhado e acumula no complexo de Golgi.

A proteína Nef também promove a retenção do complexo MHC I na rede *trans*-Golgi, provavelmente por meio da interação com a proteína PACS-1 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein-1*). Essa proteína controla o tráfego de algumas moléculas entre o complexo de Golgi e os endossomos. Desse modo, Nef dificulta a renovação do complexo MHC I na superfície celular (Piguet *et al.*, 2000; Geyer *et al.*, 2001). A modulação negativa do complexo MHC I promove o escape da resposta imune celular (Collins *et al.*, 1998). No entanto, Nef não protege totalmente a célula infectada, visto que há uma forte resposta por linfócitos T citotóxicos contra a infecção pelo HIV (Das & Jameel, 2005).

Assim como foi observado na modulação de CD4, alguns estudos mostraram que há diferença na capacidade de modulação de MHC I de Nef isolada de indivíduos progressores e não progressores. A proteína Nef encontrada em indivíduos não progressores é mais eficiente na modulação negativa de MHC de classe I do que Nef encontrada em indivíduos com AIDS. A forte resposta imune por linfócitos T citotóxicos contra o vírus, observada em pacientes não

progressores, exerceria uma pressão seletiva sobre Nef para a eficiente modulação negativa de MHC de classe I, o que favoreceria o escape do sistema imune. No entanto, durante a fase de AIDS, o sistema imune está comprometido e não existiria mais essa pressão seletiva, permitindo o surgimento de variantes com menor capacidade de modulação negativa de MHC de classe I (Carl *et al.*, 2001). Kirchhoff *et al.* (1999) mostraram que essa diferença está associada a resíduos específicos nas proteínas Nef de não progressores: T¹⁵, N⁵¹, H¹⁰², L¹⁷⁰ e E¹⁸², quando comparada a Nef de progressores: P¹¹, A¹⁵, R³⁹, T⁵¹, T¹⁵⁷, C¹⁶³, N¹⁶⁹, Q¹⁷⁰ e M¹⁸². Esse estudo também mostrou que essas substituições tendem a surgir ao longo da progressão da doença.

1.6.4. Modulação de MHC classe II

O complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) ocorre em células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas e macrófagos. Essas células, através do MHC de classe II, apresentam epitopos para linfócitos T auxiliares. Essa etapa é essencial para o início da resposta imune, bem como para estabelecer uma resposta imune secundária eficiente (Abbas & Lichtman, 2003).

As moléculas de MHC II seguem uma via intracelular específica. As cadeias α e β se associam a cadeia invariável Ii no retículo endoplasmático, de onde são direcionadas para o complexo de Golgi. O complexo $\alpha\beta Ii$ é direcionado para a membrana plasmática, devido a sinais existentes na cadeia Ii. Durante esse direcionamento, ainda nos compartimentos endocíticos, a cadeia Ii é degradada, permitindo que a molécula de MHC II, agora madura, se associe ao antígeno peptídico gerado nos lisossomos (Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001).

Nef aumenta a expressão da cadeia invariável Ii, causando um acúmulo de moléculas MHC II imaturas na superfície celular. Nef também provoca a redução de moléculas MHC II maduras na superfície celular, porém o mecanismo ainda não foi elucidado. Nef poderia causar o aprisionamento de MHC II maduro, no processo de reciclagem, no complexo de Golgi. Nef também poderia causar a internalização dessas moléculas de MHC II, ou ambos simultaneamente. A modulação negativa de MHC II pode contribuir para a habilidade do HIV-1 de escapar do sistema imune (Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001).

Os motivos de Nef importantes para o aumento na expressão da cadeia invariável Ii são WL^{57,58} e LL^{164,165}. O motivo EEEE⁶²⁻⁶⁵ é importante para a endocitose de MHC II, enquanto os motivos MGxxxS¹⁻⁶ e PxφPxR⁷²⁻⁷⁷ são importantes para as duas atividades (Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001).

1.6.5. Modulação de CD1a e CD1d

A família CD1 (CD1a, CD1b, CD1c e CD1d) compõe uma terceira linhagem de moléculas apresentadoras de antígenos, além dos MHC de classe I e MHC de classe II. Essas moléculas são frequentes em células dendríticas e linfócitos, e estão envolvidas na apresentação de antígenos de natureza lipídica ou glicolipídica para linfócitos T citotóxicos e linfócitos T “*natural killer*”. Até o momento, poucos antígenos apresentados por CD1 são conhecidos (Shinya *et al.*, 2004).

Nef promove a redistribuição de CD1a da superfície celular, causando seu acúmulo em endossomos tardios e lisossomos. Desse modo, Nef poderia alterar a apresentação de possíveis antígenos lipídicos (Shinya *et al.*, 2004). Zheng *et al.* (2003) mostraram que Nef aumenta a síntese de colesterol e o seu transporte para “*lipid rafts*”, locais na membrana plasmática ricos em receptores e onde ocorre a montagem e brotamento da partícula viral do HIV-1. Esse colesterol é essencial para a formação da partícula viral. Se esses lipídeos vírus-específicos forem alvos para o sistema imune, a modulação negativa de CD1a por Nef poderia interferir na apresentação desses antígenos pelas células dendríticas, auxiliando no escape do vírus da resposta imune (Shinya *et al.*, 2004).

Nef também promove a internalização de CD1d de modo dependente de AP-2. CD1d internalizado e as moléculas de CD1d recém sintetizadas são retidas na região trans do complexo de Golgi, de modo dependente de AP-1. Os motivos MGxxxS¹⁻⁶, EEEE⁶²⁻⁶⁵, PxφPxR⁷²⁻⁷⁷, LL^{164,165} e DD^{174,175} são importantes para a modulação negativa de CD1d (Chen *et al.*, 2006). A redução de moléculas CD1d na superfície celular pode afetar o reconhecimento pelos linfócitos T “*natural killer*”. Desse modo, Nef poderia evitar que antígenos de natureza lipídica sejam apresentados aos linfócitos T “*natural killer*”, facilitando o escape da resposta imune (Chen *et al.*, 2006).

1.6.6. Modulação de CD28

CD28 é uma glicoproteína de superfície que ocorre em linfócitos T auxiliares. A interação entre CD28 e seu ligante, a molécula B7 existente em células apresentadoras de antígenos, prolonga a sinapse entre os dois tipos celulares, melhorando o reconhecimento dos epitópos apresentados. Em células T virgens, a interação entre CD28 e B7 gera o segundo sinal necessário para ativação dessas células. Desse modo, CD28 age como co-estimulador da ativação de linfócitos T virgens (Abbas & Lichtman, 2003).

Nef modula CD28 de modo dependente de AP-2. Aparentemente, Nef aumenta afinidade de CD28 pela maquinaria endocítica, formando um complexo entre Nef, CD28 e AP-2. Nef redistribui CD28 para locais na membrana plasmática ricos em AP-2. Provavelmente, provoca a retenção de CD28 nos compartimentos envolvidos em sua endocitose fisiológica e reciclagem. Os motivos de Nef importantes nessa modulação são WL^{57,58} e LL^{164,165} (Swigut *et al.*, 2001).

A modulação negativa de CD28 poderia interferir na sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T CD4. Esse distúrbio poderia limitar a adesão entre essas células, promovendo a separação do linfócito T ativado (Swigut *et al.*, 2001).

1.6.7. Aumento da replicação e infectividade viral

Nef aumenta a capacidade infecciosa das partículas virais, por meio de dois mecanismos. O primeiro e mais estudado desses mecanismos é a modulação negativa de moléculas CD4 na célula hospedeira. A existência de moléculas de CD4 na superfície celular diminui a infectividade dos vírions liberados pela célula. CD4 é capaz de se associar a glicoproteína viral gp120, reduzindo a quantidade de receptores livres e funcionais na partícula viral. A modulação negativa de CD4 por Nef diminui a quantidade dessas glicoproteínas na superfície celular, aumentando a quantidade de gp120 livre para a formação de vírions, o que aumenta a capacidade de infecção das partículas virais liberadas (Schiavoni *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 1999).

O segundo mecanismo envolve a desorganização de fibras de actina nas proximidades do sítio de fusão do vírion. Após a fusão com a membrana plasmática, Nef induz o

remodelamento local de fibras de actina, facilitando o movimento do capsídeo viral através de uma potencial barreira física. A ausência de Nef na partícula viral causaria o não rearranjo das fibras de actina, o que poderia resultar em retenção do capsídeo viral no córtex celular (Campbell *et al.*, 2004).

Nef também está relacionada ao aumento da capacidade de replicação do vírus. No entanto, o mecanismo ainda não foi completamente elucidado. Um dos mecanismos para esse aumento envolve a HSP-40 (*Heat Shock Protein 40*). As proteínas da família HSP são chaperonas, conhecidas por auxiliarem o dobramento de proteínas bem como seu transporte (Alberts *et al.*, 1997). Nef provoca o aumento da expressão de HSP-40, que é acumulada no citoplasma. Essa chaperona interage com Nef existente no citoplasma e ambas são translocadas para o núcleo da célula. No núcleo, o complexo HSP-40 e Nef modulam a atividade do complexo Cdk9-ciclina T, também chamado pTEFb (*positive transcription elongation factor b*), que se encontra associado à LTR viral (Figura 7), causando aumento na taxa de transcrição viral e sua replicação (Kumar & Mitra, 2005).

1.6.8. Alterações na sinalização para apoptose

Nef é capaz de induzir apoptose em células vizinhas àquela infectada, eliminando possíveis linfócitos T citotóxicos e contribuindo para escape da resposta imune. A proteína Nef induz a expressão do receptor Fas (CD95) e de seu ligante FasL, envolvidos na sinalização para apoptose nas células infectadas (Xu *et al.*, 1999). Quando o ligante Fas (FasL) se associa ao receptor Fas, presente na superfície de linfócitos T e outros tipos celulares, é desencadeando o processo de apoptose das células não infectadas (Abbas & Lichtman, 2003). O motivo P χ P χ R⁷²⁻⁷⁷ de Nef é importante no aumento a expressão do ligante Fas (Xu *et al.*, 1999).

Porém, o aumento na expressão de Fas e FasL pode desencadear um processo de apoptose na própria célula infectada, o que prejudicaria o curso da infecção viral. A proteína Nef impede essa e outras vias de apoptose ao inibir a proteína quinase ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*). ASK-1 é fundamental em pelo menos duas vias apoptóticas, sendo a via Fas/FasL uma delas. Nef impede ativação de ASK-1, protegendo a célula infectada

(Geleziunas *et al.*, 2001). Essa atividade está associada ao resíduo R¹⁰⁶ em Nef (Das & Jameel, 2005).

1.6.9. Alterações em vias de sinalização celular

Nef também é capaz de interagir com moléculas envolvidas na sinalização celular, o que pode desencadear diversos efeitos nas células infectadas e em outras células. Em macrófagos infectados, Nef promove a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que induz a secreção de citocinas ativadoras de linfócitos T quiescentes (Swingler *et al.*, 2003).

O motivo rico em prolina, Px ϕ PxR⁷²⁻⁷⁷, é o responsável pela mediação das interações entre Nef e moléculas sinalizadoras com domínios do tipo SH3 (*Src homology 3*). Esse domínio é freqüente em quinases e proteínas envolvidas em cascatas de sinalização celular. O sítio consenso de ligação a SH3 é definido como Px ϕ PxR, onde ϕ é um aminoácido hidrofóbico, geralmente uma valina (Lim *et al.*, 1994). Diversos resíduos em Nef afetam a interação entre esse motivo e as moléculas sinalizadoras. Os resíduos Q⁷³, (K/R)⁸², D⁸⁶, F⁹⁰, W¹¹³, (I/V)¹¹⁴, T¹¹⁷ e Y¹²⁰ estabilizam essa interação (Grzesiek *et al.*, 1996a; Grzesiek *et al.*, 1996b).

Outro sítio de interação com moléculas envolvidas na ativação celular é formado pelos resíduos (R/K)R^{105,106}. Esses são necessários na interação de Nef com as proteínas Pak1 e Pak2 (*p21-activated kinase 1 e 2*, respectivamente), membros da família de quinases ativadas por p21. Essas quinases são importantes na ativação celular de linfócitos T (Geyer *et al.*, 2001). Outros quatro resíduos afetam a ligação a Pak (P⁶⁹, L⁷⁶, L¹¹², F¹²¹) (Manninen *et al.*, 1998).

É intrigante como uma proteína relativamente pequena é capaz de desempenhar diversas funções. Procurando compreender o funcionamento dessa proteína, foram realizados diversos experimentos de deleções e mutações no gene *nef*. Através desses estudos foram mapeados vários domínios em Nef associados às atividades dessa proteína (Geyer *et al.*, 2001, Geyer & Peterlin, 2001).

1.6.10. Caracterização da variabilidade de *nef*

Estudos sobre a variabilidade do gene *nef* mostraram que essa é a segunda região mais variável do HIV-1. No entanto, vários motivos são conservados na proteína Nef, como pode ser observado na Figura 11 (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Korber *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996).

Artenstein *et al.* (1996) caracterizaram o gene *nef* de dezessete pacientes da Tailândia, e compararam a definição do subtipo baseada em *nef* com a baseada em *env*. Do total, dezesseis possuíam *nef* e *env* pertencentes ao subtipo E, e um possuía *nef* e *env* pertencentes ao subtipo B. Nesse estudo, não foi encontrado indício de recombinação pela análise dessas duas regiões genômicas. No entanto, foi demonstrado, por estudos de seqüenciamento do genoma completo do HIV-1, que todos os isolados definidos como sendo do subtipo E são, na realidade, recombinantes entre os subtipos A e E, pertencendo à CRF01_AE. Ainda não foi descrito um isolado puro pertencente ao subtipo E, ou seja, não recombinante (Peeters M., 2000). Logo, as dezesseis amostras definidas como pertencentes ao subtipo E por esses autores são, provavelmente, pertencentes a CRF01_AE

Também foram caracterizados quatorze isolados de indivíduos indianos. Nesse caso, todos foram definidos como pertencentes ao subtipo C. No entanto, análises filogenéticas mostraram que esses isolados tendem a formar um sub-grupo dentro do ramo de isolados do subtipo C de outras regiões geográficas. Essa observação sugere que os vírus circulantes na Índia possuem características próprias (Jere *et al.*, 2004).

Um estudo conduzido no Quênia caracterizou *nef* de trinta e duas crianças. Desse total, dezenove isolados foram caracterizados como pertencentes ao sub-subtipo A1, dez pertencentes ao subtipo D, um ao sub-subtipo A2, um ao subtipo C e um revelou ser uma forma recombinante de *nef* entre os subtipos A e D. Dessa forma, os subtipos A e D mostraram-se os mais prevalentes no leste da África (Chakraborty *et al.*, 2006).

Alguns estudos caracterizando a variabilidade de *nef* já foram realizados também na Europa. Na Itália, um estudo realizado com 13 crianças infectadas com HIV-1 mostrou que todos os isolados avaliados eram pertencentes ao subtipo B (Casartelli *et al.*, 2003). Parreira *et al.* (2005) caracterizaram a variabilidade de *nef* e definiram o subtipo de quarenta e seis isolados provenientes de Portugal. Foram relatados treze isolados pertencentes ao subtipo B, treze pertencentes ao subtipo G, cinco pertencentes ao subtipo J, dois pertencentes ao sub-subtipo F1, dois pertencentes ao subtipo H, um pertencente ao sub-subtipo A1 e um pertencente ao subtipo D. Os mesmos autores caracterizaram ainda cinco isolados como pertencentes a CRF02_AG, apresentando o gene *nef* como um mosaico entre os subtipos A e G. Além disso, outros três isolados também mostraram-se como formas recombinantes na região de *nef*; entretanto, um deles era recombinante entre os subtipos D e G, outro entre os subtipos B e G e o terceiro entre a CRF02_AG e o subtipo H.

Parreira *et al.* (2005) também compararam a definição do subtipo baseada na região de *nef* com a baseada em *env*, e encontraram discordância nos cinco isolados definidos como pertencentes ao subtipo J. Isso sugere que esses isolados na realidade são formas recombinantes entre o subtipo A, para o gene *env*, e o subtipo J, para o gene *nef*. Os autores ainda mostraram que pode ocorrer mais de um evento de recombinação dentro do gene *nef*. Observou-se que o isolado definido como recombinante B/G em *nef* possuía dois pontos de recombinação, gerando uma estrutura B/G/B, ou seja, o início e término do gene são definidos como sendo do subtipo B, e a região central como do subtipo G.

Nos Estados Unidos, estudos de caracterização de *nef* de isolados norte-americanos identificaram todos como pertencentes ao subtipo B, refletindo a prevalência observada nesse país (Hahn *et al.*, 2003; McNearney *et al.*, 1995). Sierra *et al.* (2005) caracterizaram o genoma completo de oito isolados recombinantes, provenientes de pacientes do Chile, Espanha e Venezuela, e não encontraram eventos de recombinação dentro do gene *nef*. No entanto Thomson *et al.* (2002), analisando o genoma completo de oito isolados argentinos, encontraram três amostras com pontos de recombinação dentro do gene *nef*.

No Brasil, Guimarães *et al.* (2002b) caracterizaram a variabilidade de *nef* e definiram o subtipo, com base nessa região, para vinte e quatro amostras. Os autores encontraram dezessete amostras pertencentes ao subtipo B, três pertencentes ao subtipo C, duas pertencentes ao subtipo D e duas pertencentes ao subtipo F. Do total de amostras, cinco apresentaram discordância com relação à genotipagem realizada com o gene *env*. Três delas mostraram-se *Fenv/Bnef*, uma *Benv/Cnef* e uma *Cenv/Bnef*, sugerindo que essas amostras são formas recombinantes.

1.6.11. Potencial imunogênico de Nef

Estudos mostraram que Nef é uma das proteínas mais imunogênicas do HIV-1, sendo reconhecida pela maioria dos linfócitos de indivíduos soropositivos (Frahm *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2004). Segundo o banco de dados *HIV Molecular Immunology Database* (<http://hiv-web.lanl.gov/>), existem 150 epitopos reconhecidos por linfócitos T citotóxicos e 29 epitopos reconhecidos por linfócitos T auxiliares descritos em Nef.

Frahm e Brander (2005) compilaram uma relação dos epitopos reconhecidos por linfócitos T citotóxicos e definidos como ótimos para as proteínas do HIV-1. Um epitopo ótimo já foi definido como o peptídeo que resulta em máxima lise na menor concentração (Brander & Walker, 1995). Entretanto, Frahm e Brander (2005) consideraram outras características para definir um determinado peptídeo como um epitopo ótimo, a saber: (i) quando o epitopo estava reduzido à menor seqüência necessária para ser reconhecido; (ii) quando foram eluídos do MHC de classe I experimentalmente; e (iii) quando o alelo de MHC capaz de se ligar ao mesmo é conhecido. Com base nessas características, foram descritos

mais de 200 epitopos definidos com ótimos, sendo que 33 ocorrem na proteína Nef (Frahm & Brander, 2005).

Grupos de pesquisa utilizaram alguns desses epitopos no desenho experimental de vacinas (Cosma *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2002; Pialoux *et al.*, 2001; Gahéry-Ségard *et al.*, 2000; Mortara *et al.*, 1999) e todos chegaram a resultados promissores. Coplan *et al.* (2005) mostraram que epitopos de Nef pertencentes a um subtipo são reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos de pessoas infectadas por outros subtipos.

Frahm *et al.* (2004) mostraram que a região entre os aminoácidos 57 e 157 de Nef foi a mais reconhecida por linfócitos T citotóxicos de indivíduos norte-americanos infectados por HIV-1 do subtipo B, pertencentes a diferentes etnias. O epitopo EVGFPVRPQVPLRPMTYK⁶⁰⁻⁸² foi reconhecido na maioria dos casos, o equivalente a 44.7% dos indivíduos amostrados. Um estudo semelhante foi realizado por Kaufmann *et al.* (2004). Esses autores, entretanto, analisaram a resposta de linfócitos T auxiliares e observaram que epitopos de Nef também estão entre os mais reconhecidos do HIV-1. O epitopo PEKEVLVWKFDSRLAFHH¹⁷⁶⁻¹⁹³ foi reconhecido por 36% dos indivíduos amostrados.

Todos esses estudos indicam que regiões imunogênicas de Nef podem ter papel importante na imunização contra o HIV-1. Atualmente há 9 vacinas em teste que incluem epitopos de Nef (IAVI, 2004). Como consequência dos resultados obtidos pelos estudos de Nef como potencial imunógeno e pelo número de vacinas em teste, iniciou-se a caracterização dos epitopos de Nef de vírus circulantes na população mundial. Na maioria dos isolados analisados por esses estudos, é possível verificar que há pelo menos um epitopo ótimo conservado (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Korber *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995).

O conhecimento da variabilidade de Nef nas diferentes regiões do mundo pode ser importante para a eficácia de possíveis vacinas que utilizem essa proteína. Do mesmo modo, o monitoramento dessa variabilidade, em especial de regiões antigênicas, pode ser determinante para o uso dessas vacinas (Frahm *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar amostras de uma série histórica de isolados do HIV-1 que circulavam em 2002 no Distrito Federal e no estado de Rondônia e, desse modo, contribuir para a caracterização desses vírus, descrevendo a variabilidade do gene *nef*. Assim, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Descrever os subtipos do HIV-1 com base nas seqüências do gene *nef* para as amostras analisadas;
- Relacionar a definição do subtipo baseada em *nef* com aquela realizada para outras regiões genômicas das mesmas amostras, a saber: *gag*, protease, transcriptase reversa e a região C2-C3 de *env*;
- Descrever a conservação de motivos e resíduos, já descritos como importantes para as atividades biológicas de Nef, a partir da seqüência deduzida de aminoácidos;
- Descrever a freqüência de alguns epitopos já descritos na literatura como ótimos, utilizando a seqüência deduzida de aminoácidos da proteína Nef;
- Realizar a análise filogenética das seqüências obtidas para o gene *nef*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM

Para a realização do exame de carga viral do HIV-1 nos serviços públicos de assistência à saúde no Distrito Federal e no estado de Rondônia, coletou-se uma amostra de sangue do indivíduo submetido ao exame. O sangue foi processado para a obtenção do plasma e encaminhado ao Laboratório Central da Secretaria de Saúde do governo do Distrito Federal (LACEN-DF). Nesse laboratório, o RNA viral foi extraído do plasma em um volume final de 50 μ L. Desse volume, 5 μ L foram utilizados na reação de amplificação baseada em seqüências de ácidos nucleicos, ou NASBA (*Nucleic Acid Sequence Base Amplification*), para determinação da carga viral, e os 45 μ L restantes foram armazenados em freezer a -80° C.

Em nossos experimentos, utilizamos os 45 μ L restantes de 33 amostras de pacientes com carga viral acima de 50000 cópias/mL de sangue, sendo 17 do Distrito Federal (DF) e 16 de Rondônia (RO), para a realização dos procedimentos descritos a seguir. Trata-se de um estudo anônimo, transversal e descritivo, de série histórica, onde foram analisadas amostras coletadas no ano de 2002, de indivíduos com indícios de falha na terapia anti-retroviral. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Distrito Federal.

3.2. TRANSCRIÇÃO REVERSA

A reação de transcrição reversa foi realizada em um volume final de 25 μ L, a partir das amostras de RNA anteriormente mencionadas. Inicialmente, uma solução contendo 5 μ L de RNA viral, 0,2 μ g de oligonucleotídeos randômicos, 0,625 mM de cada dNTP (*Invitrogen, Life Technologies*) e água Milli Q para um volume final de 13 μ L, foi mantida a 65° C por 5 minutos e, imediatamente, transferida para um recipiente com gelo por um minuto. Adicionou-se, em seguida, 0,75X de tampão *first-strand* (*Invitrogen, Life Technologies*), 5 mM de ditioneitol (DTT), 40 unidades (U) de inibidor de RNase (*Pharmacia Biotech*) e 200 U da enzima SuperScriptTM transcriptase reversa (*Invitrogen, Life Technologies*). Esta reação foi inicialmente incubada a 25° C por 5 minutos e então a 55° C por 60 minutos. Em seguida, a

reação foi interrompida, com a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

3.3. AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

O cDNA obtido foi amplificado por meio de *nested*-PCR, utilizando-se iniciadores específicos para o gene *nef*. No primeiro ciclo, foram usados os iniciadores externos Outer3-3e/Outer5-1e (*Integrated DNA Technologies*) (Artenstein *et al.*, 1996) e, no segundo ciclo, os iniciadores internos Inner3-7e/Inner5-1e (*Integrated DNA Technologies*). A seqüência dos iniciadores e o local de alinhamento no genoma do isolado HXB-2 podem ser observados na Tabela 1 (Artenstein *et al.*, 1996).

Tabela 1. Iniciadores externos (*outer*) e internos (*inner*) para o gene *nef*. Os números entre parênteses indicam a posição genômica de cada iniciador em relação ao isolado HXB2.

Iniciador	Seqüência genômica
Outer 5-1e (8513 a 8533)	GTGCCTCTTCAGCTACCACCG
Outer 3-3e (9488 a 9508)	AGCATCTGAGGGTTAGCCACT
Inner 5-1e (8697 a 8717)	TGGACAGAYAGGGTTATAGAA
Inner 3-7e (9448 a 9469)	CACCTCCCCTGGAAAGTCCCC

O primeiro ciclo de amplificação foi realizado em um volume final de 25 µL, contendo 4 µL de cDNA, 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,8 µM dos iniciadores Outer3-3e/Outer5-1e (*Integrated DNA Technologies*), 1,25 U da enzima *Taq DNA* polimerase (*Invitrogen, Life Technologies*), 1X de tampão da enzima (*Invitrogen, Life Technologies*) e 5 mM de cloreto de magnésio (*Invitrogen, Life Technologies*). A reação foi realizada em termociclador (PTC-100 Research INC) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 3 minutos, anelamento dos *iniciadores* a 48°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos *iniciadores* a 50°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A segunda amplificação foi realizada em um volume final de 50 μL , contendo 1 μL do produto de PCR gerado na primeira amplificação, 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,8 μM dos iniciadores Inner3-7e/Inner5-1e (*Integrated DNA Technologies*), 1,25 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen, Life Technologies*), 1X de tampão da enzima (*Invitrogen, Life Technologies*) e 5 mM de cloreto de magnésio (*Invitrogen, Life Technologies*), nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 3 minutos, anelamento dos iniciadores a 43°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 45°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amostras amplificadas pelo *Nested-PCR* foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%. Brometo de etídeo foi utilizado para a visualização dos fragmentos de DNA. Controles negativos foram incluídos durante os procedimentos de amplificação, para monitorar possíveis contaminações.

3.4. CLONAGEM

3.4.1. Obtenção do plasmídeo recombinante

A reação de ligação dos produtos de PCR no plasmídeo pGEM[®]-T easy (*Promega*) foi realizada seguindo as instruções do fabricante (*Promega*, n° de catálogo do produto: A1360).

3.4.2. Transformação

Os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α , pelo método do choque térmico. Inicialmente, 10 μL da solução contendo os plasmídios foram incubados com 300 μL das células competentes, em tubos do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, no gelo por 40 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a 42 °C por 1 minuto e 30 segundos, em banho-maria, e novamente transferidas para o banho de gelo por 5 minutos. Foram adicionados ao tubo do tipo *Eppendorf* 700 μL de meio líquido 2xYT (1,6 mg/mL de triptona, 1,0 mg/mL de extrato de levedura e 85,6 mM de NaCl), que em seguida

foi incubado a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm (Jouan S.A. A14/V1), e 700 µL foram removidos por aspiração. As bactérias foram espalhadas em placas de Petri contendo meio sólido 2xYT, com 16,7 µmol de IPTG, 800 ng de X-Gal e 4mg/mL de ampicilina.

As placas de Petri foram incubadas *overnight* em estufa a 37 °C. Os clones transformantes foram selecionados e incubados *overnight* a 37°C sob agitação em meio líquido 2xYT, contendo 4mg/mL de ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o *Kit Sephaglas FlexiPrep™* (GE Healthcare - número de catálogo do produto: 27-9281-01) seguindo as instruções do fabricante.

3.4.3. Amplificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi utilizado como molde para amplificação por reação em cadeia da polimerase, utilizando os iniciadores universais M13.

A reação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo: 1 µL do DNA plasmidial, 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,4 µM dos iniciadores M13F/M13R (*Integrated DNA Technologies*), 1,25 U da enzima Taq DNA Polimerase (*Invitrogen, Life Technologies*), 1X de tampão da enzima (*Invitrogen, Life Technologies*) e 1 mM de cloreto de magnésio (*Invitrogen, Life Technologies*). As seguintes condições foram adotadas: desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 56°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

Os clones amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%. Brometo de etídeo foi utilizado para a visualização dos fragmentos de DNA. Controles negativos foram incluídos durante os procedimentos de amplificação, para monitorar possíveis contaminações.

3.5. PURIFICAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR que apresentaram ampliações inespecíficas, em adição ao fragmento desejado, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% de onde o fragmento desejado foi eluído e purificado por meio do *Kit GFX™ PCR DNA and gel purification (GE Healthcare)*, de acordo com as instruções do fabricante, e ressuspensos em 20 µL de água Mili-Q.

Os demais produtos de PCR foram transferidos para tubos do tipo *Eppendorf* e precipitados adicionando-se 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto. As soluções foram mantidas a -80°C por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 14000 rpm (Jouan S.A. A14/V1) por 40 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados aos tubos 100 µL de etanol 70%, com cuidado para não ressuspender o precipitado. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm (Jouan S.A. A14/V1) por 5 minutos, o sobrenadante descartado e os tubos mantidos a 37°C por uma hora. Finalmente, foram adicionados 15 µL de água Mili-Q em cada tubo.

3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS

3.6.1. Seqüenciamento automático

Os produtos de PCR foram seqüenciados automaticamente, em ambas as direções, utilizando-se os iniciadores internos Inner3-7e/Inner5-1e (Artenstein *et al.*, 1996) ou os iniciadores universais M13. As reações de seqüenciamento nucleotídico foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, utilizando-se o *Kti ET-Terminator*, no Sistema *Molecular Dynamics MegaBACE 500 plus (GE Healthcare)*, e na plataforma de seqüenciamento da EMBRAPA – CENARGEN utilizando-se o *Kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems)*.

3.6.2. Análise das seqüências

A qualidade das seqüências obtidas nas reações de seqüenciamento automático foi verificada pelo programa PHRED (Ewing *et al.*, 1998). As homologias das seqüências nucleotídicas foram determinadas pelo programa HIV-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), disponível no sítio *HIV Databases* (<http://hiv-web.lanl.gov/>). Nesse programa, as seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências de HIV-1 disponíveis no banco genômico *HIV Databases* (<http://hiv-web.lanl.gov/>). O alinhamento das seqüências em ambas as direções foi realizado pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) e otimizado por inspeção visual. Após a correção das divergências, o subtipo das amostras foi determinado utilizando o programa REGA (*REGA HIV-1 Automated Subtyping Tool - Beta 1.0*) (Oliveira *et al.*, 2005). As seqüências de aminoácidos foram deduzidas e comparadas à seqüência consenso e à seqüência de referência correspondente ao subtipo dos isolados virais.

3.6.3. Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada utilizando o conjunto de programas PHYLIP versão 3.6 (Felsenstein J., 2005). As seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências referência de vários subtipos do grupo M do HIV-1, obtidas no sítio do *HIV Databases* (<http://hiv-web.lanl.gov/>), utilizando o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Foi utilizado um fragmento de no mínimo 614 nucleotídeos, correspondendo ao gene *nef* inteiro.

A distância evolutiva foi calculada utilizando o programa *DNA*dist, pelo método de correção de dois parâmetros de Kimura (Kimura M., 1980). As relações filogenéticas foram determinadas pelo método de *neighbor joining*. A reprodutibilidade de cada ramo da árvore foi estimada por um valor de *bootstrap* de 1000 réplicas. O programa *Consensus Tree* foi utilizado para gerar uma árvore consenso. A árvore foi obtida pelo programa *TreeView*. A seqüência consenso do grupo O foi utilizada como grupo externo. Um valor de *bootstrap* de 70% foi considerado confiável para determinação dos subtipos (Hillis & Bull, 1993).

4. RESULTADOS

4.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nef*

No presente trabalho, 33 amostras de RNA, sendo 17 do Distrito Federal e 16 de Rondônia, foram transcritas reversamente e amplificadas por *Nested-PCR*. A Figura 12 mostra um gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, onde foram observados os produtos de PCR obtidos com os iniciadores Inner5'-1e e Inner3'-7e. Como esperado, os fragmentos amplificados apresentaram aproximadamente 770 pares de base.

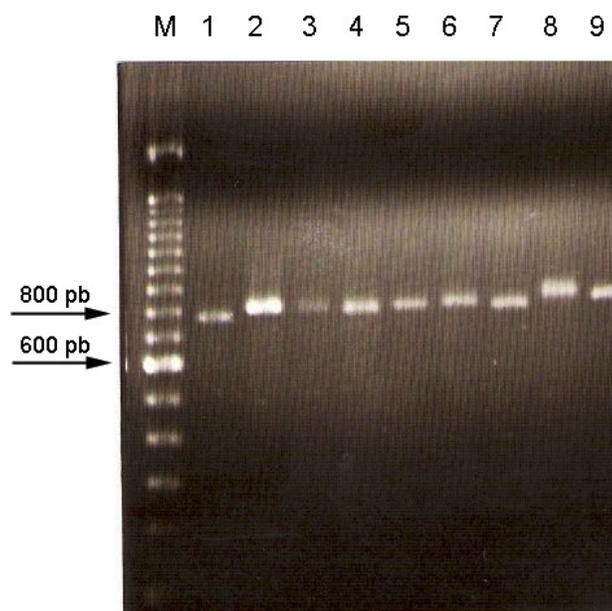


Figura 12. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo para o gene *nef*. “M” é o marcador de pares de base de 100pb (Promega). Os números de 1 a 9 referem-se aos fragmentos amplificados para o gene *nef*, com aproximadamente 770 pb.

4.2. DEFINIÇÃO DOS SUBTIPOS COM BASE NO GENE *nef*

Todas as 33 amostras foram caracterizadas como pertencentes ao subtipo B no gene *nef*. Esses resultados foram comparados à caracterização das regiões genômicas de *env* (Veras S.R., 2006), *gag*, PR e RT (Véras N.M.C., 2006), obtidas pelo Grupo de Virologia Humana,

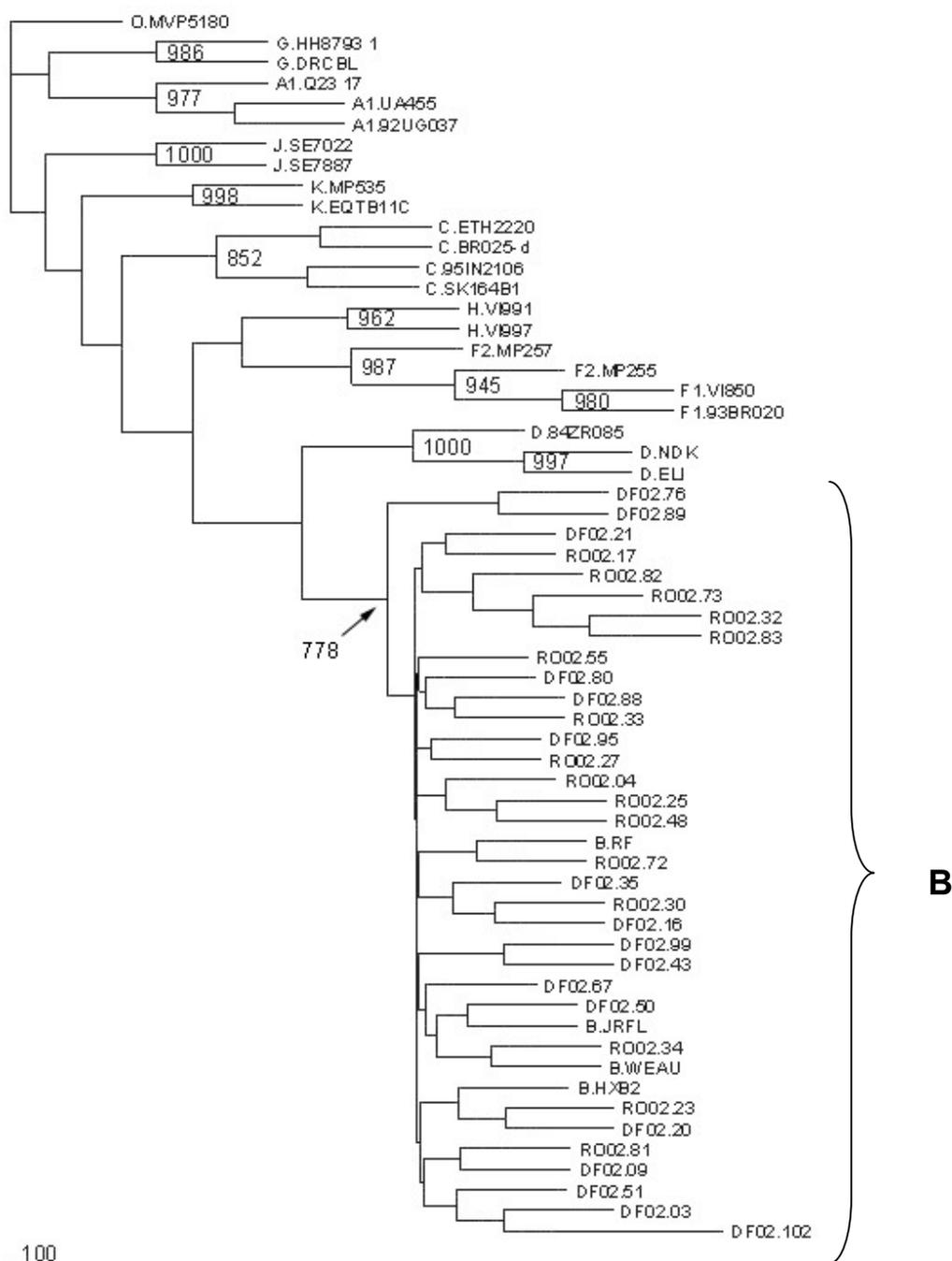
da Universidade de Brasília. Como pode ser observado na Tabela 2, sete amostras de RO (21,2%) apresentaram discordância entre as regiões genômicas analisadas.

Tabela 2. Caracterização dos subtipos para as regiões genômicas de *gag* (nucleotídeos 837-1690 em HXB2), protease (2253-2549 em HXB2), transcriptase reversa (2604-3250 em HXB2), obtidos por Vêras N.M.C. (2006), de *env* (6816-7380 em HXB2), obtidas por Veras V.S. (2006), e de *nef* (8797-9417 em HXB2), estudadas no presente trabalho.

Amostra	<i>gag</i> (837-1690)	PR (2253-2549)	RT (2604-3250)	<i>env</i> (6816-7380)	<i>nef</i> (8797-9417)
DF02.03	B	B	B	B	B
DF02.09	B	B	B	B	B
DF02.16	-	B	B	-	B
DF02.20	-	B	B	B	B
DF02.21	B	B	B	B	B
DF02.35	B	B	B	B	B
DF02.43	B	B	B	B	B
DF02.50	B	B	B	B	B
DF02.51	B	B	B	B	B
DF02.67	-	B	B	B	B
DF02.76	B	B	B	B	B
DF02.80	-	B	B	B	B
DF02.88	B	B	B	B	B
DF02.89	B	B	B	B	B
DF02.95	B	B	B	B''	B
DF02.99	-	B	-	B	B
DF02.102	-	B	B	B	B
RO02.04	-	B	B	-	B
RO02.17	B/F	B/F	F1	B	B
RO02.23	B	B	B	B	B
RO02.25	B/F	B	B	B	B
RO02.27	B	B	B	-	B
RO02.30	B	B	B	B	B
RO02.32	-	B	B/F	B	B
RO02.33	B	B	B	B	B
RO02.34	B	B	B	B	B
RO02.48	-	D	B	B/F	B
RO02.55	B	B	B	B	B
RO02.72	B	B	B	B	B
RO02.73	-	B	B/F	B	B
RO02.81	B	B	B	B''	B
RO02.82	B	B	B/F	-	B
RO02.83	B/F	F	B/F	B''	B

4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA

As 33 amostras analisadas no presente trabalho foram utilizadas na análise filogenética. A árvore foi gerada utilizando seqüências de no mínimo 614 nucleotídeos, correspondendo ao gene *nef* inteiro. Os isolados de referência dos subtipos A, B, C, D, F, G, H, K e J também foram usados na análise. Como grupo externo, utilizou-se o isolado de referência do grupo O - MVP5180 (número de acesso: L20571). Como pode ser observado na Figura 13, todas as amostras agruparam com os isolados de referência do subtipo B, com um valor de *bootstrap* de 778, confirmando a definição do subtipo realizada pelo programa REGA. Também pode ser observado que os isolados do DF e de RO não formaram subgrupos dentro do ramo do subtipo B. Além disso, todos os isolados de referência do mesmo subtipo formaram grupos bem caracterizados, com valores de *bootstrap* acima de 750, evidenciando a confiabilidade da análise.



_100

Figura 13. Relações filogenéticas pelo método *neighbor joining* entre os isolados de HIV-1 circulantes no Distrito Federal (DF02.n) e em Rondônia (RO02.n) e seqüências de isolados de referência dos subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K do grupo M do HIV-1. O grupo O foi utilizado como grupo externo. Valores de *bootstrap* significativos encontram-se indicados ao lado do ramo respectivo (1000 replicações).

4.3. CARACTERIZAÇÃO DE *nef*

4.3.1. Sequência deduzida de aminoácidos de *Nef*

A sequência deduzida de aminoácidos das 33 amostras foi gerada e comparada à sequência consenso do subtipo B e ao isolado de referência HXB2, como pode ser observado na Figura 14. As posições dos nucleotídeos, aminoácidos e motivos descritos a seguir são de acordo com o isolado de referência HXB2 (número de acesso K03455).

Duas amostras de RO apresentaram códon de parada prematuro, gerando proteínas truncadas. A amostra RO02.73 apresentou a inserção de uma adenina entre os nucleotídeos 316 e 317, enquanto a amostra RO02.81 apresentou a deleção de uma guanina na posição 263, como pode ser observado na Figura 15. Essas alterações foram responsáveis por uma mudança na fase de leitura nos genes, o que gerou os códons de parada prematuros observados nas posições 111, no caso da amostra RO02.73, e 91, na amostra RO02.81, como pode ser observado na Figura 14.

Cons B	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95	105	115
HXB2	ATGGGTGGCA	AGTGGTCAA	ACGTAGTGTG	GTTGGATGGC	CTACTGTAAG	GAAAGAATG	AGACGAGC--	----TGAGCC	AGCAGCAGAT	GGGTGGGAG	CAGTATCTCG	AGACCTGGAA
RO02.73
RO02.81	.A.....	.C.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..	..G.A..
Cons B	125	135	145	155	165	175	185	195	205	215	225	235
HXB2	AAACATGGAG	CAATCACAAG	TAGCAATACA	GCAGCTAACA	ATGCTGATTTG	TGCCTGGCTA	GAAGCACAAG	AGGAGGAGGA	---GGTGGGT	TTTCCAGTCA	GACCTCAGGT	ACCTTTAAGA
RO02.73
RO02.81	.G.....	.C.....	TGA..A..C
Cons B	245	255	265	275	285	295	305	315	325	335	345	355
HXB2	CCAATGACTT	ACAAGGGAGC	TTTAGATCTT	AGCCACTTTT	TAAAAGAAAA	GGGGGACTG	GAAGGCTAA	TTTACTCCA	AAAAA-GACA	AGATATCCTT	GATCTGTGG	TCTACCACAC
RO02.73
RO02.81
Cons B	365	375	385	395	405	415	425	435	445	455	465	475
HXB2	ACAAGSCTAC	TTCCTTGATT	GGCAGAACTA	CACACCAGGG	CCAGGGATCA	GATATCCACT	GACCTTGGG	TGGTCTTCA	AGCTAGTACC	AGTTGAGCCA	GAGAAGGTAG	AAGAGCCCAA
RO02.73
RO02.81
Cons B	485	495	505	515	525	535	545	555	565	575	585	595
HXB2	TGAAGGAGAG	AACACACAGT	TGTTACACCC	TATGAGCCTG	CATGGGATGG	ATGACCCCGA	GAGAGAAGTG	TTAGTGTGGA	AGTTTGACAG	CCGCCTAGCA	TTTCATCACA	TGGCCCCGAGA
RO02.73
RO02.81
Cons B	605	615	625									
HXB2	GCTGCATCCG	GAGTACTACA	AGGACTGCTG	A								
RO02.73								
RO02.81								

Figura 15. Alinhamento da sequência de nucleotídeos das amostras RO02.73 e RO02.81 com o consenso do subtipo B e o isolado HXB2. A adenina inserida entre os nucleotídeos 316 e 317 da amostra RO02.73, e a deleção de uma guanina na posição 263, da amostra RO02.81 estão destacados em azul. Os pontos representam resíduos de aminoácidos concordantes com o consenso do subtipo B. Os traços representam espaços inseridos para otimizar o alinhamento das seqüências.

4.3.2. Motivos e resíduos associados às atividades biológicas de Nef

4.3.2.a. Modificações pós-traducionais em Nef

Todas as amostras estudadas apresentaram o sítio de miristoilação de Nef (MGxxxS¹⁻⁶) conservado. Já o sítio de fosforilação de Nef por PKA, o resíduo de serina na posição nove (S⁹), encontrou-se conservado em 22 amostras (66,6%), 11 do DF (64,7%) e 11 de RO (68,8%). Seis amostras de RO apresentaram uma deleção desse resíduo, enquanto cinco do DF apresentaram as substituições não conservativas: S9V (DF02.16 e DF02.35), S9I (DF02.09 e DF02.99) e S9K (DF02.67). A Figura 16 apresenta o alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, para os sítios de miristoilação e de fosforilação.

O motivo de reconhecimento pela protease viral, CAWLEA⁵⁵⁻⁶⁰, mostrou-se conservado em 23 amostras (69,7%), 13 do DF (76,5%) e 10 de RO (62,5%). Seis amostras apresentaram as substituições não conservativas C55V (RO02.04 e RO02.55), C55R (DF02.88), A56V (RO02.34), A56T (RO02.81) e E59A (DF02.50), enquanto quatro apresentaram as substituições conservativas L58V (DF02.20, RO02.48 e RO02.99) e E59Q (RO02.32), como pode ser observado na Figura 17.

```

      . . . . | . . . .
              5
      MGxxxS
CONS_B  MGGKWSKRS
HXB2    . . . . .S.
DF02.03 . . . . .H.
DF02.09 . . . . .I
DF02.16 . . . . .V
DF02.20 . . . . .S.
DF02.21 . . . . .P.
DF02.35 . . . . .V
DF02.43 . . . . .S.
DF02.50 . . . . .
DF02.51 . . .G..S.
DF02.67 . . . . .SK
DF02.76 . . . . .S.
DF02.80 . . . . .
DF02.88 . . .G..C-
DF02.89 . . . . .S.
DF02.95 . . . . .S.
DF02.99 . . . . .NI
DF02.102 . . . . .

RO02.04 . . . . .S.
RO02.17 . . . . .S.
RO02.23 . . . . .S.
RO02.25 . . . . .
RO02.27 . . . . .S.
RO02.30 . . . . .S.
RO02.32 . . . . .P-
RO02.33 . . . . .
RO02.34 . . . . .S.
RO02.48 . . . . .L.
RO02.55 . . . . .-
RO02.72 . . . . .W.
RO02.73 . . . . .P-
RO02.81 ..S...S.
RO02.82 . . . . .--
RO02.83 . . . . .P-

```

Figura 16. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, para os sítios de miristoilação (MGxxxS¹⁻⁶) e de fosforilação (S⁹). Os resíduos em vermelho representam substituições não-conservativas. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B. Os traços representam espaços inseridos para otimizar o alinhamento das seqüências.

	55	60
CONS_B	
HXB2	
DF02.03	
DF02.09	
DF02.16	
DF02.20	...V..	
DF02.21	
DF02.35	
DF02.43	
DF02.50	...A.	
DF02.51	
DF02.67	
DF02.76	
DF02.80	
DF02.88	R.....	
DF02.89	
DF02.95	
DF02.99	...V..	
DF02.102	
RO02.04	V.....	
RO02.17	
RO02.23	
RO02.25	
RO02.27	
RO02.30	
RO02.32	...Q.	
RO02.33	
RO02.34	.V.....	
RO02.48	...V..	
RO02.55	V.....	
RO02.72	
RO02.73	
RO02.81	.T.....	
RO02.82	
RO02.83	

Figura 17. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, para o sítio de clivagem pela protease viral, CAWLEA⁵⁵⁻⁶⁰. Os resíduos em azul representam substituições conservativas, enquanto aqueles em vermelho representam as não-conservativas. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B.

4.3.2.b. Sítios envolvidos na modulação de moléculas de superfície celular

Modulação de CD4

A associação de Nef a CD4 é influenciada por oito resíduos de aminoácidos: WL^{57,58}, G⁹⁵, G⁹⁶, L⁹⁷, R¹⁰⁶, I¹⁰⁹ e L¹¹⁰. Como pode ser observado na Figura 18, 27 amostras (81,8%), 15 do DF (88,2%) e 12 de RO (75%), apresentaram esses resíduos conservados. As amostras

DF02.20, DF02.99 e RO02.48 apresentaram a substituição conservativa L58V, enquanto a amostra RO02.25 apresentou a substituição conservativa G96E. A amostra RO02.73 apresentou a substituição conservativa R160K e as substituições não conservativas I109Y e L110P. A amostra RO02.81 não possui os resíduos: G⁹⁵, G⁹⁶, L⁹⁷, I¹⁰⁹ e L¹¹⁰, devido ao códon de parada prematuro na posição 91.

O motivo (D/E)xxxLL¹⁶⁰⁻¹⁶⁵, responsável pela interação entre Nef e AP-2, apresentou-se conservado em 30 amostras (90,9%), 17 do DF (100%) e 13 de RO (81,2%). Na amostra RO02.33 foi observada a substituição conservativa L164V. As amostras RO02.73 e RO02.81 mais uma vez não apresentaram esse motivo, por codificarem proteínas truncadas. A interação de Nef com o complexo V-ATPase ocorre através dos resíduos DD^{174,175}, os quais se mostraram conservados em 23 amostras (69,7%), 12 do DF (70,6%) e 11 de RO (68,8%). Nas amostras DF02.50, DF02.76, DF02.80, DF02.88, DF02.89, RO02.33, RO02.34 e RO02.72, ocorreu a substituição conservativa D174E. As amostras RO02.73 e RO02.81 também não apresentaram esses resíduos.

Os resíduos EE^{154,155}, que interagem com subunidades do coatômero e são importantes para a degradação de CD4 mediada por Nef, se mostraram conservados em 18 amostras (54,5%), 11 do DF (64,7%) e 7 de RO (43,8%). Nas amostras DF02.09, DF02.21, DF02.50, DF02.67, DF02.76, DF02.89, RO02.25, RO02.32, RO02.48, RO02.82 e RO02.83, observou-se a substituição conservativa E155K, enquanto as amostras RO02.55 e RO02.72 apresentaram a substituição conservativa E155Q. As amostras RO02.73 e RO02.81 não apresentaram esses resíduos. Como mostrado pela Figura 18, 12 amostras (36,4%), 7 do DF (41,2%) e 5 de RO (31,2%), apresentaram todos os motivos envolvidos com a modulação negativa de CD4 conservados.

Os resíduos P¹¹, A¹⁵, R³⁹, T⁵¹, T¹⁵⁷, C¹⁶³, N¹⁶⁹, Q¹⁷⁰ e M¹⁸² foram associados à proteína Nef de indivíduos progressores, e modulam CD4 negativamente de modo mais eficiente do que Nef isolada de indivíduos não progressores (Carl *et al.*, 2001; Kirchhoff *et al.*, 1999). Como mostrado na Tabela 3, nenhuma das amostras apresentou todos esses resíduos: uma apresentou seis resíduos, cinco apresentaram cinco resíduos, sete apresentaram quatro resíduos, outras sete apresentaram três resíduos, nove apresentaram dois resíduos e quatro apresentaram um resíduo.

	57	95	109	154	160 165	174
		CD4		Coatômero	AP-2	V-ATPase
CONS_B	WL	GGL	IL		ExxxLL	DD
HXB2	EE	..T...	..
DF02.03	D.VC..	..
DF02.09I...	..
DF02.16K	..C..	..
DF02.20	.V
DF02.21
DF02.35K	..C..	..
DF02.43
DF02.50V..	E.
DF02.51K	..C..	..
DF02.67C..	..
DF02.76K	..C..	E.
DF02.80K	E.
DF02.88SR..	E.
DF02.89C..	E.
DF02.95K	..KC..	..
DF02.99	.VC..	..
DF02.102C..	..
RO02.04C..	..
RO02.17C..	..
RO02.23C..	..
RO02.25	..	.E.IN..	..
RO02.27K	..C..	..
RO02.30C..	..
RO02.32C..	..
RO02.33K	..V.	E.
RO02.34C..	E.
RO02.48	.VC..	..
RO02.55K
RO02.72Q	E.
RO02.73	YP	.Q
RO02.81
RO02.82
RO02.83K	..C..	..
				.K		

Figura 18. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, para os resíduos de Nef importantes para modulação negativa de CD4. Os resíduos em azul representam substituições conservativas, enquanto aqueles em vermelho representam as não-conservativas. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B.

Tabela 3. Resíduos de aminoácidos da proteína Nef observados em amostras do DF e de RO. A literatura associa os resíduos destacados a Nef isolada de pacientes progressores.

Amostra	11	15	39	51	157	163	169	170	182
DF02.03	S	T	E	T	N	C	S	K	Q
DF02.09	D	A	E	T	N	S	S	Q	P
DF02.16	V	A	K	N	N	C	S	Q	M
DF02.20	F	A	E	T	N	S	S	L	Q
DF02.21	G	A	K	N	N	S	S	Q	I
DF02.35	D	A	R	N	T	C	S	Q	I
DF02.43	A	T	R	T	T	S	N	Q	V
DF02.50	N	A	K	T	N	V	S	L	K
DF02.51	K	A	K	N	N	C	S	L	Q
DF02.67	T	T	R	T	N	C	S	L	V
DF02.76	I	Q	K	N	N	C	S	L	M
DF02.80	A	A	K	T	N	S	S	L	R
DF02.88	G	A	R	T	N	R	S	L	M
DF02.89	V	Q	D	N	N	C	S	L	Q
DF02.95	G	A	Q	T	N	C	S	Q	M
DF02.99	S	A	R	N	T	C	N	Q	V
DF02.102	P	T	E	T	N	C	S	L	Q
RO02.04	I	T	S	T	N	C	S	Q	M
RO02.17	V	A	R	N	N	C	S	Q	V
RO02.23	I	T	E	T	N	C	S	Q	Q
RO02.25	S	T	K	T	N	N	S	Q	M
RO02.27	V	A	K	T	N	C	S	Q	M
RO02.30	V	A	K	N	N	C	S	Q	M
RO02.32	K	A	R	N	N	C	S	Q	V
RO02.33	E	A	K	N	N	S	S	L	V
RO02.34	V	A	K	N	N	C	S	L	V
RO02.48	G	T	R	T	N	C	S	Q	V
RO02.55	D	A	S	T	N	S	S	L	V
RO02.72	-	A	E	N	N	S	R	L	E
RO02.73	R	A	R	T					
RO02.81	V	A	A	N					
RO02.82	R	A	R	T	N	S	S	Q	M
RO02.83	R	T	R	N	N	C	S	Q	Q

Modulação de MHC de classe I

Três regiões em Nef são importantes na modulação de MHC de classe I: o resíduo M²⁰ e os motivos EEEE⁶²⁻⁶⁵ e PxφPxR⁷²⁻⁷⁷. Como pode ser observado na Figura 19, o resíduo M²⁰ encontrou-se conservado em 29 amostras (87,9%), 15 do DF (88,2%) e 14 de RO (87,5%), enquanto nas amostras DF02.09, DF02.95, RO02.17 e RO02.72 observou-se a substituição conservativa M20I.

Vinte amostras (60,6%), 11 do DF (64,7%) e 9 de RO (56,2%), apresentaram o motivo EEEE⁶²⁻⁶⁵ conservado. Três amostras apresentaram substituições duplas nesse motivo: DF02.21 (E63D, E65D), DF02.35 (E63D, E65D) e RO02.73 (E63A, E64D). Dez amostras apresentaram substituição de um resíduo: E62D em DF02.99; E62R em DF02.03; E63D em DF02.76, RO02.25, RO02.33 e RO02.81; E63K em RO02.83; E64D em DF02.09 e RO02.72; e E65D em RO02.17. Cinco amostras apresentaram a inserção de um quinto resíduo de ácido glutâmico nesse motivo: DF02.20, DF02.88, RO02.34, RO02,72 e RO02.88.. Como pode ser observado na Figura 19, as substituições E62R e E63A, observadas nas amostras DF02.03 e DF02.73, respectivamente, são não conservativas, enquanto as demais substituições são conservativas.

Todas as amostras apresentaram o motivo PxφPxR⁷²⁻⁷⁷ conservados. Como pode ser observado na Figura 19, o resíduo hidrofóbico valina foi observado na posição φ⁷⁴ de todas as amostras. Um total de 19 amostras (57,6%), 10 do DF (58,8%) e 9 de RO (56,2%), apresentou todos os motivos envolvidos com a modulação negativa de MHC I conservados (Figura 19).

Os resíduos T¹⁵, N⁵¹, H¹⁰², L¹⁷⁰ e E¹⁸² foram associados à proteína Nef de indivíduos não progressores, e modulam MHC I de modo mais eficiente do que Nef isolada de indivíduos progressores. Nenhuma amostra apresentou a totalidade desses resíduos. Entretanto, duas amostras apresentaram três resíduos, nove apresentaram dois resíduos e vinte e duas apresentaram um resíduo (Tabela 4).

	
	20	62 65	72 77
			PxφPxR
CONS_B	M	EEEE-	PQVPLR
HXB2-
DF02.03	.	R-
DF02.09	I	.. D .-
DF02.16-
DF02.20E
DF02.21	.	.. D .. D -
DF02.35	.	.. D .. D -
DF02.43-
DF02.50-
DF02.51-
DF02.67-
DF02.76	.	.. D .-
DF02.80-
DF02.88E	...V.
DF02.89-
DF02.95	I-
DF02.99	.	D-
DF02.102-
RO02.04-
RO02.17	I	... D -
RO02.23-
RO02.25	.	.. D .-
RO02.27-
RO02.30-
RO02.32-
RO02.33	.	.. D .-
RO02.34E
RO02.48-
RO02.55-
RO02.72	I	.. D ..E
RO02.73	.	.. AD .-
RO02.81	.	.. D .-
RO02.82E
RO02.83	.	.. K .-

Figura 19. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, mostrando os motivos e os resíduos de Nef envolvidos na modulação negativa de MHC I. As substituições não conservativas estão representadas em vermelho, e as inserções estão sombreadas. Os traços representam espaços, e os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B.

Tabela 4. Resíduos de aminoácidos da proteína Nef observados em amostras do DF e de RO. A literatura associa os resíduos destacados a Nef isolada de pacientes não progressores.

Amostra	15	51	102	170	182
DF02.03	T	T	Y	K	Q
DF02.09	A	T	Y	Q	P
DF02.16	A	N	Y	Q	M
DF02.20	A	T	Y	L	Q
DF02.21	A	N	Y	Q	I
DF02.35	A	N	Y	Q	I
DF02.43	T	T	H	Q	V
DF02.50	A	T	Y	L	K
DF02.51	A	N	H	L	Q
DF02.67	T	T	Y	L	V
DF02.76	Q	N	Y	L	M
DF02.80	A	T	Y	L	R
DF02.88	A	T	H	L	M
DF02.89	Q	N	W	L	Q
DF02.95	A	T	Y	Q	M
DF02.99	A	N	W	Q	V
DF02.102	T	T	Y	L	Q
RO02.04	T	T	Y	Q	M
RO02.17	A	N	Y	Q	V
RO02.23	T	T	Y	Q	Q
RO02.25	T	T	Y	Q	M
RO02.27	A	T	Y	Q	M
RO02.30	A	N	Y	Q	M
RO02.32	A	N	Y	Q	V
RO02.33	A	N	W	L	V
RO02.34	A	N	Y	L	V
RO02.48	T	T	Y	Q	V
RO02.55	A	T	H	L	V
RO02.72	A	N	Y	L	E
RO02.73	A	T	H		
RO02.81	A	N			
RO02.82	A	T	H	Q	M
RO02.83	T	N	Y	Q	Q

Modulação de MHC de classe II

Os motivos WL^{57,58} e LL^{164,165}, necessários para o aumento na expressão da cadeia invariável Ii, mostraram-se conservados em 30 amostras (90,9%), sendo que o primeiro foi observado em 15 amostras do DF (88,2%) e 15 de RO (93,8%) e o segundo em 17 do DF (100%) e 13 de RO (81,2%), respectivamente (Figura 18). O motivo EEEE⁶²⁻⁶⁵, importante para a endocitose de MHC de classe II mediada por Nef, foi observado em 20 amostras (60,6%), 11 do DF (64,7%) e 9 de RO (56,2%). Já o motivo PxφPxR⁷²⁻⁷⁷ apresentou-se conservado em todas as amostras do estudo. No total, 18 amostras (54,5%), 10 do DF (58,8%) e 8 de RO (50%), apresentaram todos os motivos associados à modulação de MHC de classe II conservados (Figura 19).

Modulação de CD1d

O motivo EEEE⁶²⁻⁶⁵ (Figura 19), necessário para a modulação negativa de CD1d, mostrou-se conservado em 20 amostras (60,6%), 11 do DF (64,7%) e 9 de RO (56,2%). Quanto ao motivo PxφPxR⁷²⁻⁷⁷ (Figura 19), todas as amostras do estudo apresentaram-no conservado. Os motivos LL^{164,165} e DD^{174,175} (Figura 18) apresentaram-se conservados, respectivamente, em 30 amostras (93,9%), 17 do DF (100%) e 13 de RO (81,2%), e em 23 amostras (69,7%), 12 do DF (70,6%) e 11 de RO (68,8%). Quinze amostras (45,4%), 7 do DF (41,2%) e 8 de RO (50%), apresentaram todos os motivos associados à modulação de CD1d conservados (Figuras 18 e 19).

Modulação de CD28

Os motivos WL^{57,58} e LL^{164,165}, envolvidos na modulação de CD28, encontraram-se conservados em 30 amostras (90,9%), sendo que o primeiro foi observado em 15 amostras do DF (88,2%) e 15 de RO (93,8%) e o segundo em 17 do DF (100%) e 13 de RO (81,2%), respectivamente. No total, 27 amostras (81,8%), 15 do DF (88,2%) e 12 de RO (75%), apresentaram esses dois motivos conservados, como pode ser visto na Figura 18.

4.3.2.c. Sítios envolvidos na alteração de vias de sinalização

Alterações na sinalização para apoptose

O motivo P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷, importante para o aumento da expressão de FasL, mostrou-se conservado em todas as amostras do estudo (Figura 19). O resíduo R¹⁰⁶, associado à interação de Nef com Ask-1, por sua vez encontrou-se conservado em 31 amostras (93,9%), 17 do DF (100%) e 14 de RO (87,5%), como pode ser observado na Figura 20.

Alterações em vias de sinalização celular

O motivo P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷, responsável pela interação de Nef com domínios SH3, encontrou-se conservado em todas as amostras analisadas. Os resíduos Q⁷³, (K/R)⁸², D⁸⁶, F⁹⁰, W¹¹³, (I/V)¹¹⁴, T¹¹⁷ e Y¹²⁰ auxiliam a interação entre esse motivo e o domínio SH3. Como pode ser observado na Figura 20, 21 amostras (63,6%), 16 do DF (94,1%) e 5 de RO (31,2%), apresentaram todos esses resíduos conservados. A amostra RO02.55 apresentou as substituições conservativas K/R82Q, D86N e Y120F, tendo sido esta última substituição também observada em outras nove amostras. A amostra RO02.32 apresentou a substituição não conservativa Y120C. As amostras RO02.73 e RO02.81, por constituírem proteínas truncadas, não apresentaram nenhum dos resíduos.

O motivo (R/K)R^{105,106}, necessário para a interação de Nef com proteínas Pak, apresentou-se conservado em 28 amostras (84,8%), 15 do DF (88,2%) e 13 de RO (81,2%). As substituições conservativas K/R105Q (nas amostras DF02.88, DF02.89 e RO02.27) e R106K (na amostra RO02.73) também foram observadas. A amostra RO02.81 não apresentou esse motivo. Os resíduos P⁶⁹, L⁷⁶, L¹¹², F¹²¹, que influem na interação de Nef com Pak, encontraram-se conservados em 30 amostras (90,9%), 16 do DF (94,1%) e 14 de RO (87,5%). A substituição conservativa L76V foi observada na amostra DF02.88. As amostras RO02.73 e RO02.81 não apresentaram alguns desses resíduos (Figura 20).

	69	72	77	82	86	90	105	112	117	120
	
		PQϕPLR								
CONS_B	P	PQVPLR	K	D	F	KR	LWV	T	YF	
HXB2	R.	..I	.	..	
DF02.03	R.	
DF02.09	
DF02.16	
DF02.20	R.	..I	.	..	
DF02.21	
DF02.35	
DF02.43	
DF02.50	
DF02.51	
DF02.67	
DF02.76I	.	..	
DF02.80	R.	F.	
DF02.88 V.	.	.	.	Q.	
DF02.89	
DF02.95	
DF02.99	Q.	
DF02.102	
RO02.04	F.	
RO02.17	R.	F.	
RO02.23I	.	..	
RO02.25	
RO02.27	Q.	
RO02.30	F.	
RO02.32	R.	C.	
RO02.33	
RO02.34	F.	
RO02.48	
RO02.55	Q	N	F.	
RO02.72	F.	
RO02.73K		.	..	
RO02.81	F.	
RO02.82	F.	
RO02.83	R.	F.	

Figura 20. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras estudadas com o consenso do subtipo B e com o isolado de referência HXB2, mostrando o motivo P χ ϕP χ R⁷²⁻⁷⁷ e os resíduos que interagem com moléculas sinalizadoras. As substituições não conservativas estão representadas em vermelho, e as conservativas em azul. Os pontos representam resíduos concordantes com o consenso do subtipo B.

4.3.3. Epitopos descritos em Nef

Dos 29 epitopos reconhecidos por linfócitos T CD4, descritos no banco genômico de *Los Alamos* (<http://hiv-web.lanl.gov/>), 18 foram encontrados nas amostras analisadas, 15 nas amostras do DF e 12 nas amostras de RO. O epitopo VGFPVRPQ⁶⁶⁻⁷³ foi o mais freqüente,

tendo sido encontrado em 25 amostras (75,8%), 13 do DF (76,5%) e 12 de RO (75%). As amostras RO02.34, RO02.72 e RO02.81 não apresentaram nenhum dos epitopos descritos. A frequência dos 29 epitopos pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5. Frequência dos epitopos reconhecidos por linfócitos T CD4, descritos no banco genômico de Los Alamos, nas amostras do DF e de RO. ^a Posição relativa em Nef, referente ao isolado HXB2. ^b Subtipo no qual o epítopo foi descrito.

Epítopo	Posição em Nef ^a	Subtipo ^b	DF	RO
MGGKWSKSSVVGWPTVRERM	1-20	B	0%	0%
MGGKWSKSSVIGWPTVRERM	1-20	B	0%	0%
SAIRERMRR	14-22	B	0%	0%
VRERMRAEPAADGVGAASR	16-35	B	0%	0%
GAASRDLEKHGAITSSNTAA	31-50	B	5,9%	0%
ITSSNTA	43-50	B	41,2%	37,5%
SNTAATNAACAWLEAQEEEE	46-65	B	0%	6,25%
AWLEAQEEEEVGF	56-68	B	52,9%	37,5%
QEEEEVGFVTPQVPLRPMT	61-80	B	0%	6,25%
EEVGFVVRPQ	64-73	B	52,9%	43,8%
VGFPVRPQ	66-73	B	76,5%	75%
LRPMTYKAAVDLSHFLKEKG	76-95	B	41,2%	25%
YKAAVDLSHFLKEKGG	81-97	B	35,3%	25%
LKEKGGLEGLIHSQRRQDIL	91-110	B	0%	0%
EGLIHSQRRQDILDL	98-112	B	0%	0%
QKRQDILDLWVYHTQGYF	104-121	B	52,9%	25%
RQDILDLWIYHTQGYFPDWQ	106-125	B	11,8%	0%
LWVYHTQGYFPDWQNY	112-127	B	64,7%	18,8%
FPDWQNYTPGPGVRYPLTFG	121-140	B	35,3%	0%
PLTFGWICYKLVPEPDKVEE	136-155	B	0%	0%
DKVEEANKGENTSLHPVSL	151-170	B	0%	0%
NSLLHPMSLHGMDDEK	162-178	B	5,9%	0%
HPVSLHGMDDEPEREVLEWRF	166-185	B	0%	0%
PEKEVLVWKFDSRLAFHH	176-193	B	0%	0%
LVWRFDSK	181-188	B	0%	0%
KFDSRLAFHHMARELH	184-199	B	11,8%	0%
FDSRLAFHHVARELHP	185-200	B	11,8%	0%
AFHHMARELHPEYYKDC	190-206	B	0%	6,25%
FHHMARELH	191-199	B	11,8%	6,25%

Quanto aos 33 epitopos de Nef reconhecidos por linfócitos T citotóxicos e descritos como ótimos, 32 foram observados nas amostras analisadas, 27 nos isolados do DF e 29 nos isolados de RO. Os epitopos TQGYFPDWQNY¹¹⁷⁻¹²⁷ e YFPDWQNYT¹²⁰⁻¹²⁸ foram os mais frequentes no isolados do DF, sendo observados em 16 amostras (94,1%), enquanto o epítopo

VPLRPMTY⁷⁴⁻⁸¹ foi o mais freqüente nos isolados de RO, sendo encontrado em 14 amostras (87,5%) (Tabela 6). Cada amostra apresentou pelo menos um dos epitopos definidos com ótimos para linfócitos T citotóxicos. O epítipo VLEWRFDSRL¹⁸⁰⁻¹⁸⁹ não foi observado em nenhuma amostra.

Tabela 6. Frequência dos epitopos reconhecidos por linfócitos T CD8, descritos como ótimos e compliados por Frahm *et al.* (2005) e Frahm *et al.* (2004), nas amostras do Distrito Federal e Rondônia. As maiores frequências encontradas entre os isolados foram destacadas em vermelho. ^a Posição relativa em Nef, referente ao isolado HXB2. ^b Subtipo no qual o epítipo foi descrito.

Epítipo	Posição em Nef ^a	Subtipo ^b	DF	RO
WPTVRERM	13-20	B	0%	6,25%
RMRAEPAA	19-27	B	5,9%	6,25%
LEKHGAITS	37-45	B	29,4%	6,25%
FPVTPQVPL	68-76	B	0%	6,25%
FPVTPQVPLR	68-77	B	0%	6,25%
TPQVPLRPM	71-79	B	0%	6,25%
QVPLRPMTYK	73-82	B	82,4%	81,2%
VPLRPMTY	74-81	B	82,4%	87,5%
PLRPMTYK	75-82	B	82,4%	81,2%
RPMTYKAAL	77-85	B	11,8%	6,25%
AALDLSHFL	83-91	B	11,8%	12,5%
AVDLSHFLK	84-92	B	52,9%	37,5%
FLKEKGGL	90-97	B	94,1%	62,5%
KEKGGLEGL	92-100	B	88,2%	56,2%
RRQDILDLWI	105-114	B	5,9%	0%
KRQEILDLWVY	105-115	B	5,9%	18,8%
RRQDILDLWIY	105-115	B	5,9%	0,0%
RQDILDLWI	106-114	B	11,8%	6,25%
RQDILDLWIY	106-115	B	11,8%	6,25%
HTQGYFPDW	116-124	B	76,5%	25%
HTQGYFPDWQ	116-125	B	76,5%	18,8%
TQGYFPDWQNY	117-127	B	94,1%	25%
YFPDWQNYT	120-128	B	94,1%	25%
YTPGPGIRY	127-135	B	35,3%	31,2%
TPGPGVRYPL	128-137	B	35,3%	6,25%
TRYPLTFGW	133-141	B	5,9%	0%
RYPLTFGW	134-141	B	64,7%	43,8%
YPLTFGWCF	135-143	B	52,9%	37,5%
YPLTFGWCY	135-143	B	11,8%	12,5%
PLTFGWICYKL	136-145	B	11,8%	18,8%
LTFGWCFKL	137-145	B	64,7%	62,5%
VLEWRFDSRL	180-189	B	0,0%	0%
WRFDSRLAF	183-191	B	0,0%	6,25%

5. DISCUSSÃO

5.1. DEFINIÇÃO DOS SUBTIPOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

O Brasil é um país de dimensões continentais e diferenças na distribuição dos subtipos do HIV-1 já foram observadas nas cinco regiões geográficas. O subtipo mais prevalente é o B, com frequência de 38,7% no estado do Amazonas (Vicente *et al.*, 2000), 94% no estado do Ceará (Gadelha *et al.*, 2003), 91,2% no estado do Rio de Janeiro (Couto-Fernandez *et al.*, 2005), 79% no estado de São Paulo (Brígido *et al.*, 2005) e 42% no estado do Rio Grande do Sul (Soares *et al.*, 2005). No Distrito Federal, foi observada uma prevalência de 94% de subtipo B e 6% de recombinantes B/F (Véras N.M.C., 2006; Veras V.S., 2006; Cerqueira *et al.*, 2004). Uma baixa prevalência de amostras recombinantes também foi descrita no estado do Ceará e nas regiões Sudeste e Sul do país. Menos de 3% dos isolados encontrados nessas regiões mostraram-se formas recombinantes (Gadelha *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003a; Soares *et al.*, 2003b). No entanto, no estado do Amazonas foi observada a prevalência de 35,5% de formas recombinantes B/F (Vicente *et al.*, 2000).

Segundo a análise por meio do programa REGA, todas as amostras do presente trabalho foram caracterizadas como pertencentes ao subtipo B no gene *nef*. Quando se compara esse resultado à definição do subtipo baseada em *env* (Veras S.R., 2006), *gag* e *pol* (Véras N.M.C., 2006) para essas mesmas amostras, observa-se que não houve discordância entre a definição dos subtipos das amostras do DF. Dezesesseis amostras (94,1%) pertenciam ao subtipo B e uma amostra (5,9%) ao variante B⁺. Esse resultado foi similar ao observado por Cerqueira *et al.* (2004) no Distrito Federal, que encontraram uma prevalência de 94% do subtipo B analisando o gene *pol* do HIV-1.

Entretanto, a definição dos subtipos de 7 amostras (43,8%) de RO foram discordantes para pelo menos duas das quatro regiões genômicas (*nef*, *env*, *gag* e *pol*) analisadas, como observado na Tabela 2. As amostras RO02.17, RO02.25, RO02.32, RO02.73 e RO02.82 eram recombinantes B/F; a amostra RO02.83 recombinante B⁺/F, e, finalmente, a amostra RO02.48 era um recombinante entre os subtipos D/B/F. Vicente *et al.* (2000) também observaram uma prevalência mais alta de formas recombinantes no estado do Amazonas.

Estudos de caracterização de *nef* mostraram que eventos de recombinação nesse gene são incomuns (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995), tendo sido observados em apenas dois estudos: um realizado no Quênia, onde a prevalência observada para recombinantes em *nef* foi 3,1%, entre os subtipos A e D (Chakraborty *et al.*, 2006) e outro em Portugal, em que os autores encontraram uma prevalência de 17,4% de recombinantes nesse gene, entre os subtipos B e G, D e G e entre a CRF02_AG e o subtipo H (Parreira *et al.*, 2005).

No Brasil, Guimarães *et al.* (2002b) também não encontraram recombinação em *nef*. No entanto, Sanabani *et al.* (2006), analisando diversas regiões genômicas de HIV-1 isolado de 14 pacientes de São Paulo, encontraram quatro isolados com eventos de recombinação nesse gene. Esse resultado foi semelhante ao encontrado em um estudo na Argentina, onde em três amostras foram observados eventos de recombinação em *nef* (Thomson *et al.*, 2002).

A análise filogenética das amostras corroborou a definição dos subtipos obtida pelo programa REGA. Como pode ser observado na Figura 13, as amostras agruparam-se junto aos isolados de referência do subtipo B, com um valor de *bootstrap* (porcentagem de árvores permutadas) superior a 75%. Os isolados de referência de cada subtipo formaram clados separados, também com valores de *bootstrap* acima de 75%. Já foi descrito na literatura que o subtipo B encontra-se geneticamente mais próximo do subtipo D do que dos outros subtipos do HIV-1, inclusive para o gene *nef* (Leitner *et al.*, 2005). No presente trabalho, o ramo com as amostras analisadas também se mostrou mais próximo do ramo formado pelos isolados de referência do subtipo D.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DE *nef*

A análise das seqüências deduzidas de aminoácidos (Figura 14) mostrou que duas amostras de RO (15,2%), RO02.73 e RO02.81, apresentaram um códon de parada prematuro. De acordo com a literatura, isolados do gene *nef* que codificam proteínas com códon de parada prematuro são raros. Estudos de caracterização de *nef* mostraram uma freqüência baixa de isolados gerando proteínas truncadas, de no máximo 14,1% (Chakraborty *et al.*, 2006;

Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995).

A presença de Nef truncada foi associada à lenta progressão da doença. Mariani *et al.* (1996) observaram a presença de proteínas truncadas em pacientes não progressores de longa data. Entretanto, Huang *et al.* (1995), estudando outros pacientes com as mesmas características clínicas, ou seja, não progressores de longa data, encontraram proteínas Nef funcionais, sem códons de parada prematuros.

A região entre os aminoácidos 23 e 35 de Nef é chamada de região de tamanho variável, devido à freqüente inserção de resíduos nesse local. Como pode ser observado na Figura 14, 22 amostras, 11 do DF e 11 de RO, apresentaram inserções nessa região. Diversos estudos relataram a presença de inserções nessa região nos isolados analisados (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996). No entanto, a inserção dos resíduos RTVS entre os aminoácidos 34 e 35, observada na amostra DF02.102, ainda não foi descrita em isolados do subtipo B.

A inserção de resíduos de aminoácidos fora da região de tamanho variável também pode ser observada na Figura 14. A amostra DF02.80 apresenta a inserção de um aminoácido entre os resíduos 10 e 11, enquanto as amostras DF02.09, DF02.99 e RO02.73 apresentaram a inserção de um resíduo entre os aminoácidos 61 e 62. As amostras DF02.20, DF02.88, RO02.34, RO02.72 e RO02.82 apresentaram a inserção de um resíduo entre as posições 65 e 66. Todas essas inserções já foram descritas, sendo que a inserção de um resíduo entre os aminoácidos 65 e 66 é comum entre os isolados já descritos (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996).

Deleções foram observadas em 10 amostras, duas do DF e oito de RO (Figura 14). Exceto pelas deleções dos resíduos 52, 53 e 54 observadas na amostra RO02.32, todas as demais encontradas já foram previamente descritas (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996).

5.2.1. Motivos e resíduos associados às atividades biológicas de Nef

5.2.1.a. Modificações pós-traducionais em Nef

A associação de Nef a membranas celulares é essencial para praticamente todas as suas atividades biológicas conhecidas (Das & Jameel, 2005; Geyer *et al.*, 2001). Nef interage com bicamadas lipídicas através de um grupo miristoil presente em sua extremidade N-terminal. O miristato é um ácido graxo saturado de 14 carbonos, que é adicionado à região N-terminal de proteínas pela enzima *N*-miristoil transferase. Essa enzima reconhece a seqüência MGxxxS¹⁻⁶ em Nef, e catalisa a ligação do miristato ao resíduo de glicina, removendo o resíduo de metionina inicial (Geyer *et al.*, 2001).

Todas as amostras analisadas apresentaram o sítio de miristoilação conservado (Figura 16). Esse motivo é conservado nos isolados descritos na literatura em uma frequência acima de 90% (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995). O resíduo G² é crucial na miristoilação de Nef. A importância dessa modificação covalente é evidenciada por meio da substituição G2A. Essa substituição impede a miristoilação dessa proteína, causando perda na capacidade de modular negativamente moléculas de superfície, como CD4, MHC I, MHC II e CD28, e perda na capacidade de alterar vias de sinalização celular (Das & Jameel, 2005; Geyer *et al.*, 2001).

A fosforilação de Nef por PKA é importante para o aumento da replicação viral mediado por Nef, aumento observado em células quiescentes *ex vivo*. O sítio de fosforilação é o resíduo S⁹. Estudos mostraram que a substituição S9A reduz consideravelmente a replicação (Li *et al.*, 2005). Esse resíduo esteve conservado em 66,6% das amostras do presente trabalho, em 64,7% das amostras do DF e em 68,8% das amostras de RO, frequências semelhantes às observadas por Casartelli *et al.* (2003) e Hahn *et al.* (2004), que foram de 67,3% e 59,2%, respectivamente. No entanto, esse resíduo mostrou-se mais conservado em outros estudos, tendo sido encontrado entre 84,2% e 100% dos isolados (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995). Foram observadas substituições não-conservativas em 29,4% das amostras do DF, sendo que todas já foram descritas na literatura (Figura 16). Em 5,9% das amostras do DF e

em 31,2% das amostras de RO foi observada a deleção desse resíduo, o que também já havia sido relatado em alguns estudos, porém em um menor número de isolados (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996). Essa deleção também pode ser observada em 15,8% dos isolados do subtipo B depositados no banco de *Los Alamos* (HIV databases).

Uma pequena concentração de Nef é encontrada nos vírions do HIV-1. Pandori *et al.* (1996) sugerem que menos de 70 moléculas devem estar presentes em cada vírion, enquanto Welker *et al.* (1996) sugerem uma concentração variando entre 5 e 10 moléculas. Aproximadamente entre 50% e 70% dessas moléculas são clivadas pela protease viral (Pandori *et al.*, 1996; Welker *et al.*, 1996). O sítio de Nef reconhecido pela protease é o motivo CAWLEA⁵⁵⁻⁶⁰. A clivagem ocorre entre os resíduos W⁵⁷ e L⁵⁸, e separa a região N-terminal miristoilada, chamada de domínio de ancoramento, da porção C-terminal, chamada de domínio central (Figura 8) (Pandori *et al.*, 1996; Schorr *et al.*, 1996; Welker *et al.*, 1996; Gaedigk-Nitschko *et al.*, 1995; Freund *et al.*, 1994). Esse motivo apresentou-se conservado em 69,7% das amostras do presente estudo, em 76,5% das amostras do DF e em 62,5% das amostras de RO (Figura 17), semelhante ao que foi observado por Parreira *et al.* (2005) - 60,4% - e por Hahn *et al.* (2003) - 61,2%. Casartelli *et al.* (2003), Guimarães *et al.* (2002b) e McNearny *et al.* (1995) encontraram esse motivo conservado em 94%, 83,3 e 93,8% dos isolados, respectivamente. Entretanto, Chakraborty *et al.* (2006), Jere *et al.* (2004) e Artenstein *et al.* (1996) observaram esse mesmo motivo em menor frequência, em aproximadamente 46,9%, 14,3% e 0% dos isolados. Todas as substituições observadas nesse sítio já foram relatadas (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995).

5.2.1.b. Sítios envolvidos na modulação de moléculas de superfície celular

Modulação de CD4

Nef promove interação indireta entre CD4 e clatrina por meio de AP-2, sendo que esse processo é facilitado pela associação de Nef ao complexo V-ATPase (Janvier *et al.*, 2003; Lu

et al., 1998). Estudos de ressonância magnética nuclear mostraram que os resíduos WL^{57,58}, G⁹⁵, G⁹⁶, L⁹⁷, R¹⁰⁶, I¹⁰⁹ e L¹¹⁰ estão associados à interação de Nef com CD4 (Grzesiek *et al.*, 1996a; Grzesiek *et al.*, 1996b). Como pode ser observado na Figura 18, 81,8% das amostras, 88,2% dos isolados do DF e 75% dos isolados de RO, apresentaram esses resíduos conservados, frequência similar às encontradas por Chakraborty *et al.* (2006) - 84,4% -, Jere *et al.* (2004) - 85,7% -, Hahn *et al.* (2003) - 78,1% -, Artenstein *et al.* (1996) - 89,5% - e McNearny *et al.* (1995) - 89,1%.

A associação de Nef a AP-2 ocorre através do motivo (D/E)xxxLL¹⁶⁰⁻¹⁶⁵, sítio que se mostrou conservado nos isolados descritos, com frequências entre 87,5% e 100% (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995). Nas amostras analisadas no presente trabalho, esse motivo apresentou-se conservado em 90,9% dos isolados, 100% nos isolados do DF e 81,2% nos isolados de RO (Figura 18).

A afinidade de Nef por AP-2 aumenta quando ela está associada ao complexo V-ATPase (Lu *et al.*, 1998). O motivo DD^{174,175} é necessário para interação entre Nef e o complexo V-ATPase. Esse motivo esteve conservado em 69,7% das amostras, em 70,6% das amostras do DF e em 68,8% das amostras de RO, similar ao que foi descrito por Casartelli *et al.* (2003) - 64,7% - e por McNearny *et al.* (1995) - 67,2%. A substituição D174E, observada em 30,3% das seqüências analisadas, não impede a interação entre Nef e o complexo V-ATPase (Lu *et al.*, 1998).

Nef também promove a degradação de CD4 internalizada, induzindo o endereçamento dessas glicoproteínas para os lisossomos. Os resíduos EE^{154,155} são necessários para que esse endereçamento ocorra. Esse motivo apresentou-se conservado em 54,5% das amostras, em 64,7% das amostras do DF e em 43,8% das amostras de RO, similar ao que foi observado por Hahn *et al.* (2003), Guimarães *et al.* (2002b) e McNearny *et al.* (1995), em 58,2%, 50% e 56,2% dos isolados, respectivamente. A substituição E155K, observada em 30,3% das amostras, em 35,3% das amostras do DF e em 18,8% das amostras de RO (Figura 18), não interfere nessa atividade de Nef (Foster *et al.*, 2001).

Avaliando a totalidade dos motivos envolvidos na modulação negativa de CD4, observou-se que 36,4% das amostras, 41,2% das amostras do DF e 31,2% das amostras de RO, apresentaram todos os motivos conservados, semelhante ao encontrado por Hahn *et al.* (2003)

e Guimarães *et al.* (2002b), que encontraram todos conservados em 29,2% e 46% das seqüências estudadas, respectivamente. Outros trabalhos, contudo, encontraram um menor número de isolados em que todos esses motivos estavam conservados, aproximadamente 9,4% das seqüências no trabalho de Parreira *et al.* (2005) e 10,5% no de Artenstein *et al.* (1996). Nenhuma seqüência dos trabalhos de Chakraborty *et al.* (2006) e Jere *et al.* (2004) apresentou-se conservada para a totalidade de motivos. Contrariamente, Casartelli *et al.* (2003) e McNearny *et al.* (1995) observaram uma grande quantidade de isolados em que todos os motivos estavam conservados - 68% e 51,6%, respectivamente.

Como pode ser visto nas Tabelas 3 e 4, nenhuma amostra apresentou a totalidade de resíduos descritos e associados à Nef encontrada em indivíduos progressores (P¹¹, A¹⁵, R³⁹, T⁵¹, T¹⁵⁷, C¹⁶³, N¹⁶⁹, Q¹⁷⁰ e M¹⁸²) ou à encontrada em indivíduos não progressores (T¹⁵, N⁵¹, H¹⁰², L¹⁷⁰ e E¹⁸²). Entretanto, pode ser observado que todas as amostras apresentaram pelo menos um dos resíduos descritos na proteína Nef de progressores e não progressores. Kirchhoff *et al.* (1999) observaram que os resíduos associados a Nef de não progressores são substituídos por aqueles associados a Nef de progressores à medida que a doença avança. Dessa forma, os resíduos associados à progressores e não progressores poderiam ser encontrados em um mesmo isolado, desde que o paciente apresentasse progressão da doença. Seria interessante relacionar os resíduos encontrados nas amostras do presente trabalho com o estado clínico dos pacientes do qual o RNA viral foi extraído para averiguar se há associação significativa entre esses fatores.

Modulação de MHC I

Os motivos M²⁰, EEEE⁶²⁻⁶⁵ e P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷ são necessários para a modulação negativa de MHC de classe I (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002). O domínio EEEE⁶²⁻⁶⁵, também chamado de região ácida, se associa a PACS-1 iniciando esse processo (Piguet *et al.*, 2000). Esse motivo apresentou-se conservado em 60,6% das seqüências geradas, em 64,7% dos isoaldos do DF e em 56,2% dos isolados de RO, valor similar ao observado por Guimarães *et al.* (2002b) e McNearny *et al.* (1995), que o encontraram conservado em 54,2% e 50% dos isolados, respectivamente. No entanto, onze amostras, cinco do DF e seis de RO, apresentaram

substituições E→D nessa região (Figura 19). Substituições de ácido glutâmico para ácido aspártico são comuns nesse motivo, assim como a inserção de um quinto resíduo de ácido glutâmico ou aspártico (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995). Cinco amostras, duas do DF e três de RO, apresentaram a inserção de um quinto resíduo de ácido glutâmico, a qual não compromete a interação de Nef a PACS-1 (Geyer & Peterlin, 2001).

A interação de Nef com PACS-1 torna o motivo P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷ apto a interagir com PI3K, etapa importante na modulação de MHC I (Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002). Todas as amostras apresentaram esse motivo conservado (Figura 19). Jere *et al.* (2004), Casartelli *et al.* (2003) e Guimarães *et al.* (2002b) também observaram esse motivo conservado em todos os isolados analisados. Chakraborty *et al.* (2006), Parreira *et al.* (2005), Hahn *et al.* (2003), Artenstein *et al.* (1996) e McNearny *et al.* (1995) encontraram esse motivo conservado em 96,9%, 88,7%, 97,4%, 94,7% e 98,4% das seqüências geradas, respectivamente.

Nef também impede o retorno do MHC I internalizado para a superfície celular. O resíduo M²⁰ é importante nesse processo. Esse resíduo esteve conservado em 87,9% das amostras analisadas no presente trabalho, em 88,2% das amostras do DF e em 87,5% das amostras de RO, próximo ao observado por Guimarães *et al.* (2002b), que encontrou esse resíduo em 75% dos isolados. A substituição M20I, observada em 12,1% das seqüências analisadas, em 11,8% dos isolados do DF e em 12,5% dos siolados de RO, é encontrada com freqüência na literatura (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995).

Quanto ao conjunto de motivos associados a modulação negativa de MHC I, 57,6% das amostras apresentaram todos eles conservados, 58,8% das amostras do DF e 56,2% das amostras de RO. Casartelli *et al.* (2003) encontraram todos esses motivos em 75,3% das seqüências, enquanto Jere *et al.* (2004), Guimarães *et al.* (2002b), McNearny *et al.* (1995), Hahn *et al.* (2003) e Chakraborty *et al.* (2006) observaram esses motivos em 57,1%, 54,1%, 50%, 45,9% e 40,6% de suas amostras, respectivamente. Parreira *et al.* (2005) e Artenstein *et al.* (1996) encontraram esses motivos em apenas 18,9% e 5,3% dos isolados, respectivamente.

Modulação de MHC II

A proteína Nef também altera a concentração de MHC II na superfície celular, aumentando a quantidade de moléculas imaturas de MHC II e reduzindo a quantidade de MHC II maduro. Os motivos WL^{57,58}, EEEE⁶²⁻⁶⁵, P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷ e LL^{164,165}, associados a essa atividade, foram observados em 54,5% das seqüências geradas, em 58,8% dos isolados do DF e em 50% dos isolados de RO. Esse valor foi semelhante ao encontrado nos isolados estudados por Hahn *et al.* (2003), Jere *et al.* (2004), McNearny *et al.* (1995) e Guimarães *et al.* (2002b), que observaram esses motivos conservados em 58,1%, 57,1%, 54,7% e 54,2% dos isolados, respectivamente.

Modulação de CD1d

Nef é responsável pela internalização e retenção de CD1d no complexo de Golgi, e os motivos EEEE⁶²⁻⁶⁵, P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷, LL^{164,165} e DD^{174,175} estão associados a essa atividade (Chen *et al.*, 2006). Esses quatro motivos estiveram conservados em 45,4% das seqüências geradas, em 41,2% dos isolados do DF e em 50% dos isolados de RO (Figuras 18 e 19). Esse resultado foi semelhante ao observado por Guimarães *et al.* (2002b), McNearny *et al.* (1995) e Casartelli *et al.* (2003), que observaram o mesmo em 54,2%, 51,6% e 51,4% dos isolados, respectivamente.

Modulação de CD28

A proteína Nef também promove o acúmulo de CD28 em compartimentos intracelulares, o que poderia interferir na sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T citotóxicos. Os motivos WL^{57,58} e LL^{164,165} são importantes para essa atividade (Swigut *et al.*, 2001). Esses dois motivos encontraram-se conservados em 81,8% das amostras do presente trabalho, em 88,2% das amostras do DF e em 75% das amostras de RO. Artenstein *et al.* (1996), Chakraborty *et al.* (2006), Jere *et al.* (2004), McNearny *et al.* (1995) e

Hahn *et al.* (2003) obtiveram resultados semelhantes, sendo que esses resíduos mostraram-se conservados em 89,5%, 87,5%, 85,7%, 84,4% e 82,6% dos isolados, respectivamente.

5.2.1.c. Sítios envolvidos na alteração de vias de sinalização

Alterações na sinalização para apoptose

Nef é capaz de alterar os mecanismos envolvidos na apoptose celular e auxiliar o escape da resposta imune de duas maneiras: (i) auxiliando a sobrevivência de células infectadas mesmo na presença de condições indutoras de apoptose e (ii) induzindo a apoptose de células adjacentes àquela infectada (Geleziunas *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1999). O motivo P $\chi\phi$ P χ R⁷²⁻⁷⁷ e o resíduo R¹⁰⁶, necessários nessas atividades, apresentaram-se conservados em 93,9% das amostras analisadas, em 100% das amostras do DF e em 87,5% das amostras de RO, semelhante ao encontrado em seqüências descritas na literatura, onde foram observadas freqüências superiores a 94% (Chakraborty *et al.*, 2006; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearney *et al.*, 1995).

Alterações em vias de sinalização celular

As vias de sinalização celular também podem ser alteradas pela influência de Nef, o que pode gerar efeitos diversos. Os resíduos Q⁷³, (K/R)⁸², D⁸⁶, F⁹⁰, W¹¹³, (I/V)¹¹⁴, T¹¹⁷ e Y¹²⁰, que participam da interação do motivo P $\chi\phi$ P χ R⁷²⁻⁷⁷ com domínios SH3, estiveram conservados em 63,6% das amostras analisadas, em 94,1% das amostras do DF e em 31,2% das amostras de RO. Nos isolados descritos na literatura, esses motivos estiveram conservados em 10,5% (Artenstein *et al.*, 1996), 30,2% (Parreira *et al.*, 2005), 40,6% (McNearney *et al.*, 1995), 50% (Jere *et al.*, 2004), 53,1% (Chakraborty *et al.*, 2006), 78,7% (Casartelli *et al.*, 2003), 79,2% (Guimarães *et al.*, 2002b) e 84,2% (Hahn *et al.*, 2003) das amostras.

O sítio de interação com PAK é formado pelos resíduos (R/K)R^{105,106}. Além disso, essa associação é influenciada pelos resíduos P⁶⁹, L⁷⁶, L¹¹² e F¹²¹ (Manninen *et al.*, 1998). O conjunto desses resíduos mostrou-se conservado em 84,8% das amostras, em 88,2% das amostras do DF e em 81,2% das amostras de RO. Nos isolados descritos na literatura, esses motivos estiveram conservados em 50,9% (Parreira *et al.*, 2005), 74,5% (Hahn *et al.*, 2003), 78,6% (Jere *et al.*, 2004), 79,2% (Guimarães *et al.*, 2002b), 81,2% (Chakraborty *et al.*, 2006), 87,5% (McNearny *et al.*, 1995), 89,5% (Artenstein *et al.*, 1996), 87,5% (McNearny *et al.*, 1995) e 93,3% (Casartelli *et al.*, 2003) do total de amostras.

As seguintes observações sugerem que os vírus circulantes em 2002 no Distrito Federal e em Rondônia codificavam proteínas Nef funcionais: (i) somente duas amostras apresentaram códons de parada precoce, (ii) não foram encontrados isolados sem o códon de iniciação, (iii) vários motivos associados às atividades de Nef apresentaram-se conservados nas amostras analisadas. Os motivos mais conservados foram os sítios de miristoilação e o sítio P χ ϕ P χ R⁷²⁻⁷⁷, observados em todas as amostras. Os motivos menos conservados nas amostras do DF foram o sítio de fosforilação por PKA, a região ácida (EEEE⁶²⁻⁶⁵) e os resíduos EE^{154,155}, observados em 64,7% dos isolados. Enquanto para as amostras de RO os resíduos (K/R)⁸², D⁸⁶, F⁹⁰, W¹¹³, (I/V)¹¹⁴, T¹¹⁷ e Y¹²⁰ foram os menos conservados, estando presentes em 31,2% dos isolados.

Todas as substituições observadas nos motivos avaliados, bem como na proteína Nef de forma geral, já foram relatadas na literatura (Chakraborty *et al.*, 2006; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995). Os experimentos que permitiram determinar a importância dos motivos e resíduos em Nef foram realizados substituindo-os por resíduos de alanina ou pela deleção dos mesmos (Chen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Fauré *et al.*, 2004; Janvier *et al.*, 2003; Blagoveshchenskaya *et al.*, 2002; Geyer *et al.*, 2001; Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001; Swigut *et al.*, 2001; Greenberg *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998; Grzesiek *et al.*, 1996a; Grzesiek *et al.*, 1996b; Pandori *et al.*, 1996; Welker *et al.*, 1996). Dessa forma, o efeito das substituições desses resíduos por aminoácidos de características similares, como observado nas amostras analisadas e nos isolados descritos na literatura, ainda necessita ser elucidado.

5.2.2. Epitopos descritos em Nef

Nef é uma das proteínas mais imunogênicas do HIV-1. Estudos mostraram que ela é reconhecida pelos linfócitos da maioria dos indivíduos infectados (Frahm *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2004). Vários grupos de pesquisa utilizaram alguns desses epitopos no desenho experimental de vacinas e todos chegaram a resultados promissores, como por exemplo, aumento da resposta de linfócitos T auxiliares em indivíduos na fase crônica, indução de resposta humoral e celular em indivíduos soronegativos e a indução de resposta humoral e celular em primatas não-humanos (Cosma *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2002; Pialoux *et al.*, 2001; Gahéry-Ségard *et al.*, 2000; Mortara *et al.*, 1999).

Dos 29 epitopos reconhecidos por linfócitos T CD4, descritos no banco de dados de *Los Alamos* (HIV databases), 11 não foram encontrados no total de amostras analisadas, 14 nas amostras do DF e 17 nas amostras de RO. Esses epitopos também não foram observados nos isolados descritos por Chakraborty *et al.* (2006), Jere *et al.* (2004), Artenstein *et al.* (1996) e McNearny *et al.* (1995). O epitopo VGFPVRPQ⁶⁶⁻⁷³ foi o mais freqüente nas amostras analisadas, tendo sido encontrado em 75,8% dos isolados, em 76,5% dos isolados do DF e em 75% dos isolados de RO. Esse também foi epitopo mais encontrado por Chakraborty *et al.* (2006), Parreira *et al.* (2005), Jere *et al.* (2004), Casartelli *et al.* (2003), Guimarães *et al.* (2002b), Artenstein *et al.* (1996) e McNearny *et al.* (1995), que o observaram em 84,4%, 67,9%, 78,6%, 96,7%, 95,8%, 84,2% e 89,1% dos isolados, respectivamente.

Frahm e Brander (2005) descreveram 33 epitopos reconhecidos por linfócitos T citotóxicos. Desses, somente o epitopo VLEWRFDSSL¹⁸⁰⁻¹⁸⁹ não foi encontrado nas amostras analisadas. Nos isolados descritos por Chakraborty *et al.* (2006), Jere *et al.* (2004), Guimarães *et al.* (2002b), Hahn *et al.* (2003), Artenstein *et al.* (1996) e McNearny *et al.* (1995), esse epitopo também não foi observado. Os epitopos TQGYFPDWQNY¹¹⁷⁻¹²⁷ e YFPDWQNYT¹²⁰⁻¹²⁸ foram os mais freqüentes nos isolados do DF, observados em 94,1% das amostras. Guimarães *et al.* (2002b) observaram esses epitopos em 79,2% dos isolados, no entanto, Hahn *et al.* (2003) observaram esses epitopos em 22,4 % e 21,9% dos isolados, respectivamente. Para as amostras de RO, o epitopo VPLRPMTY⁷⁴⁻⁸¹ foi o mais freqüente, encontrado em 87,5% dos isolados. Esse epitopo também foi observado nos isolados descritos na literatura, sendo

encontrado entre 79% e 95% dos isolados descritos por Chakraborty *et al.* (2006), Casartelli *et al.* (2003), Hahn *et al.* (2003), Guimarães *et al.* (2002b) e McNearny *et al.* (1995).

Uma vez que Nef é alvo de forte resposta por linfócitos T citotóxicos e não é necessária para a replicação viral *ex vivo*, considerou-se a possibilidade do surgimento de variantes do HIV-1 apresentando uma proteína Nef defeituosa, truncada ou com grandes deleções em sua seqüência. Foi demonstrado que na presença de linfócitos T citotóxicos contra Nef, observa-se o surgimento de variantes com Nef truncada (Ali *et al.*, 2003). No entanto, a seleção de variantes de Nef defeituosos não é freqüentemente observada *in vivo*, provavelmente devido às suas atividades biológicas, mais especificamente a modulação negativa de MHC I, que auxilia no escape da resposta imune pelo vírus (Ali *et al.*, 2005). As amostras RO02.73 e RO02.81 apresentaram códons de parada prematuros, que foram também observados em variantes que escapavam da resposta de linfócitos T citotóxicos *ex vivo*. Esses variantes surgiram por eventos de inserção e deleção de nucleotídeos, que alteraram a fase de leitura de *nef*, similar ao que provavelmente ocorreu nessas duas amostras. Seria interessante averiguar o perfil de resposta dos linfócitos T citotóxicos dos indivíduos infectados por esses isolados, para verificar se são capazes de reconhecer essas proteínas truncadas. Contudo, mesmo nessas duas amostras epitopos ótimos reconhecidos por linfócitos T podem ser observados, e em cada amostra pelo menos um epitopo ótimo mostrou-se conservado, semelhante ao observado na literatura (Chakraborty *et al.*, 2006; Parreira *et al.*, 2005; Jere *et al.*, 2004; Casartelli *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2002b; Artenstein *et al.*, 1996; McNearny *et al.*, 1995).

A conservação desses diversos epitopos talvez seja explicada pela sobreposição com motivos associados às atividades biológicas de Nef. Isso dificultaria o surgimento de mutações que favoreceriam o escape da resposta imune do hospedeiro, uma vez que mutações nesses motivos podem ser cruciais para o curso da infecção viral (Das & Jameel, 2005). Além disso, a alta freqüência de alguns epitopos nos isolados caracterizados sugere que vacinas que utilizem esses epitopos seriam representativas dos vírus que circulavam no Distrito Federal e no estado de Rondônia em 2002.

6. CONCLUSÕES

- Todas as 33 amostras analisadas foram definidas como pertencentes ao subtipo B no gene *nef*; tanto pela análise de homologia quanto pela análise filogenética;
- A comparação da definição dos subtipos com base nas regiões de *gag*, protease, transcriptase reversa, a região C2-C3 de gp120 e *nef* permitiu a identificação de genomas mosaicos em 48,3% das amostras de RO. Foram observadas formas recombinantes entre os subtipos B, D e F1;
- Duas amostras apresentaram códons de parada prematuros. Não foram observadas amostras sem códons de iniciação;
- Com relação aos motivos associados às atividades biológicas de Nef, os menos conservados foram observados em 64,7% das amostras do DF e em 31,2% das amostras de RO, enquanto os mais conservados foram observados em todos os isolados;
- Dos 29 epitopos reconhecidos por linfócitos T auxiliares descritos em Nef, 15 foram identificados nas amostras do DF e 12 nas amostras de RO, sendo que o mais freqüente foi observado em 76,5% dos isolados do DF e em 75% dos isolados de RO. Três amostras de RO não apresentaram nenhum desses epitopos;
- Dos 33 epitopos ótimos reconhecidos por linfócitos T citotóxicos descritos em Nef, 27 foram identificados nas amostras do DF e 29 nas amostras de RO, sendo que o epitopo mais freqüente foi observado em 94,1% dos isolados do DF e em 87,5% dos isolados de RO. Além disso, pelo menos um epitopo ótimo foi observado em cada amostra desse estudo;
- A baixa freqüência de códons de parada prematuros e de genes sem códons de iniciação, e a alta freqüência de motivos conservados associados às atividades de Nef, indicam que os vírus circulantes em 2002 no DF e em RO codificavam proteínas Nef funcionais;

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho é parte integrante de um estudo de série histórica de amostras de HIV-1 de isolados brasileiros, que tem como objetivo principal avaliar a história evolutiva desse vírus no período de 2002 a 2006 nesta região geográfica.

Nesse contexto, o gene *nef* de amostras já coletadas, referentes ao período de 2003 a 2006 deverá ser analisado, seguindo a mesma abordagem do trabalho ora apresentado, sempre levando em consideração as atualizações da literatura.

Os dados gerados por meio dessa avaliação de série histórica deverão contribuir para o entendimento e para o monitoramento da diversidade de subtipos, perfil de resistência aos anti-retrovirais e variabilidade antigênica do HIV-1.

As análises da história evolutiva do HIV-1 em nossa região poderão ser comparadas com dados do restante do país, por meio de ferramentas de bioinformática, contribuindo possivelmente para um melhor entendimento da epidemia de HIV/AIDS no Brasil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K. & Lichtman, A.H. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia; WB Saunders Company. 576 pp.
- Ahmad, N. & Venkatesan, S. 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*, **241** (4872):1481-1485.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J.D. 1997. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ed. Porto Alegre; Artes Médicas. 1294 pp.
- Ali, A.; Ng, H.L.; Darang, M.D. & Yang, O.O. 2005. Evasion of cytotoxic T lymphocytes is a functional constraint maintaining HIV-1 Nef expression. *European Journal of Immunology*, **35** (11): 3221-3228.
- Ali, A.; Pillai, S.; Ng, H.L.; Lubong, R. Richman, D.D.; Jamieson, B;D; Ding, Y.; McElrath, M.J.; Guatelli, J.C. & Yang, O.O. 2003. Broadly increased sensitivity to cytotoxic T lymphocytes resulting from Nef epitope escape mutations. *Journal of Immunology*, **171** (8): 3999-4005.
- Altschul, S.F; Gish, W.; Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215** (3): 403-410.
- Amara, R.R.; Ibegbu, C.; Villinger, F.; Montefiori, D.C.; Sharma, S.; Nigam, P.; Xu, Y.; McClure, H.M. & Robinson, H.L. 2005. Studies using a viral challenge and CD8 T cell depletions on the roles of cellular and humoral immunity in the control of an SHIV-89.6P challenge in DNA/MVA-vaccinated macaques. *Virology*, **343** (2): 246-255.
- Argañaraz, E.; Schindler, M.; Kirchhoff, F. & Cortes, M.J. 2003. Enhanced CD4 down-modulation by late state HIV-1 *nef* alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, **278** (36): 33912-33919.

- Arold, S.T. & Baur, A.S. 2001. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends in Biochemical Science*, **26** (6): 356-363.
- Artenstein, A.W.; Hegerich, P.A.; Beyrer, C.; Rungruengthanakit, K.; Michael, N.L. & Natpratan, C. 1996. Sequences and phylogenetic analysis of the *nef* gene from Thai subjects harboring subtype E HIV-1. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **12** (6): 557-560.
- Barre-Sinoussi, 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. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220** (4599): 868-871.
- Berzofsky, J.A.; Ahlers, J.D.; Janik, J.; Morris, J.; Oh, S.; Terabe, M. & Belyakov, I.M. 2004. Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *Journal of Clinical Investigation*, **114** (4): 450-461.
- Blagoveshchenskaya, A.D.; Thomas, L.; Feliciangeli, S.F.; Hung, C.H. & Thomas, G. 2002. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1 and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell*, **111**: 853-866.
- Bongertz, V.; Bou-Habib, D.C.; Brigido, L.F.; Caseiro, M.; Chequer, P.J.; Couto-Fernandez, J.C.; Ferreira, P.C.; Galvao-Castro, B.; Greco, D.; Guimarães, M.L.; Linhares de Carvalho, M.I.; Morgado, M.G.; Oliveira, C.A.; Osmanov, S.; Ramos, C.A.; Rossini, M.; Sabino, E.; Tanuri, A. & Ueda, M. 2000. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, **23** (2):184-193.
- Bonifacino, J.S. & Traub, L.M. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry*, **72**: 395-447.

- Brander, C. & Walker, B.D. 1995. The HLA-class I Restricted CTL Response in HIV-1 Infection: Identification of Optimal Epitopes. In: *HIV Molecular Immunology Database 1995*. B. Korber; C. Brander; B.D. Walker; R. Koup; J.P. Moore; B.F. Haynes; G. Myers (Ed.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, pp. IV-1-9.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS. 2003. *Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças*. Série Manuais nº 60. Brasília; Ministério da Saúde, 56 pp.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS. 2005. *Boletim Epidemiológico AIDS DST 2005*. Ano II – nº 01. Brasília; Ministério da Saúde, 42 pp.
- Brigido LF, Franco HM, Custodio RM, Oliveira CA, P Ferreira JL, Eira M, Bergel F, Araujo F, Carvalheiro JR, Rodrigues R. 2005. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **21** (7): 673-682.
- Campbell, E.M.; Nunez, R. & Hope, T.J. 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *Journal of Virology*, **78** (11): 5745-5755.
- Carl, S.; Greenough, T.C.; Krumbiegel, M.; Greenberg, M.; Skowronski, J.; Sullivan, J.L. & Kirchhoff, F. 2001. Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *Journal of Virology*, **75** (8):3657-3665.
- Carr, J.K.; Ávila, M.; Carrilho, M.G.; Salomon, H.; Hierholzer, J.; Watanav-Radej, V.; Pando, M.A.; Negrete, M.; Russell, K.L.; Sanchez, J.; Birx, D.L.; Andrade, R.; Vinales, J. & McCutchan, F.E. 2001. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS*, **15**: F41-F47.
- Casartelli, N.; Di Matteo, G.; Argentini, C. ; Cancrini, C.; Bernardi, S.; Castelli, G.; Scarlatti, G.; Plebani, A.; Rossi, P. & Doria, M. 2003. Structural defects and variations in the

- HIV-1 *nef* gene from rapid, slow and non-progressor children. *AIDS*, **17** (9): 1291-1301.
- Cerqueira, D.M.; Amorim, R.M.; Silva, R.R.; Camara, G.N.; Brigido, M.M. & Martins, C.R. 2004. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99** (8): 877-882.
- Chakraborty, R.; Reinis, M.; Rostron, T.; Philpott, S.; Dong, T.; D'Agostino, A.; Musoke, R.; Silva, E.; Stumpf, M.; Weiser, B.; Burger, H. & Rowland-Jones, S.L. 2006. *Nef* gene sequence variation among HIV-1-infected African children. *HIV Medicine*, **7** (2): 75-84.
- Chen, N.; McCarthy, C.; Drakesmith, H.; Li, D.; Cerundolo, V.; McMichael, A.J.; Screaton, G.R. & Xu, X.N. 2006. HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *European Journal of Immunology*, **36**: 278-286.
- Collins, K.L.; Chen, B.K.; Kalams, S.A.; Walker, B.D. & Baltimore, D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, **391**: 397-401.
- Coplan, P.M.; Gupta, S.B.; Dubey, S.A.; Pitisuttithum, P.; Nikas, A.; Mbwewe, B.; Vardas, E.; Schechter, M.; Kallas, E.G.; Freed, D.C.; Fu, T.M.; Mast, C.T.; Puthavathana, P.; Kublin, J.; Collins, K.B.; Chisi, J.; Pendame, R.; Thaler, S.J.; Gray, G.; McIntyre, J.; Straus, W.L.; Condra, J.H.; Mehrotra, D.V.; Guess, H.A.; Emini, E.A. & Shiver, J.W. 2005. Cross-reactivity of anti-HIV-1 T cell immune responses among the major HIV-1 clades in HIV-1-Positive individuals from 4 continents. *The Journal of Infectious Diseases*, **191**: 1427-1434.
- Cosma, A.; Nagaraj, R.; Bühler, S.; Hinkula, J.; Busch, D.H.; Sutter, G.; Goebel, F.D. & Erfle, V. 2003. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 *nef* elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. *Vaccine*, **22**: 21-29.

- Costa, L. J.; Munerato, P.; Diaz, R. S. & Tanuri, A. 2000. Generation of intersubtype human immunodeficiency virus type 1 recombinants in *env* gene *in vitro*: influences in the biological behavior and in the establishment of productive infections. *Virology*, **268**: 440-451.
- Couto-Fernandez, J.C.; Silva-de-Jesus, C.; Veloso, V.G.; Rachid, M.; Gracie, R.S.; Chequer-Fernandez, S.L.; Oliveira, S.M.; Arakaki-Sanchez, D.; Chequer, P.J. & Morgado, M.G. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100** (1): 73-78.
- Covas, D.T.; Biscaro, T.A.; Kashima, S; Duarte, G. & Machado, A.A. 1998. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology*, **19** (1): 74-79.
- Craig, H.M.; Pandori, M.W. & Guatelli, J.C. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 11229-11234.
- Das, S.R. & Jameel, S. 2005. Biology of the HIV Nef protein. *Indian Journal of Medical Research*, **121**: 315-332.
- Emerman, M. & Malim, M.H. 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, **280** (5371): 1880-1884.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, **8** (3): 175-185.
- Fauré, J.; Stalder, R.; Borel, C.; Sobo, K.; Piguet, V.; Demareux, N; Gruenberg, J, & Trono, D. 2004. ARF1 regulates Nef-induced CD4 degradation. *Current Biology*, **14** (12):1056-1064.

- Felsenstein, J. 2005. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6*. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Flint, S.J.; Enquist, L.W.; Racaniello, V.R. & Skalka, A.M. 2004. *Principles of Virology – molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses*. Washington; ASM Press. 918pp.
- Foster, J.L.; Molina, R.P.; Luo, T.; Arora, V.K.; Huang, Y.; Ho, D.D. & Garcia, V. 2001. Genetic and functional diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtype B Nef primary isolates. *Journal of Virology*, **75** (4): 1672-1680.
- Frahm, N. & Brander, C. 2005. Optimal CTL epitope identification in HIV clade B and non-clade B infection. In: *HIV Molecular Immunology 2005*. B.T.M. Korber; C. Brander; B.F. Haynes; R. Koup; J.P. Moore; B.D. Walker; D.I. Watkins (Ed.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 3-20.
- Frahm, N.; Korber, B.T. ; Adams, C.M. ; Szinger, J.J.; Draenert, R.; Addo, M.M.; Feeney, M.E.; Yusim, K.; Sango, K.; Brown, N.V.; SenGupta, D.; Piechocka-Trocha, A.; Simonis, T.; Marincola, F.M.; Wurcel, A.G.; Stone, D.R.; Russell, C.J.; Adolf, P.; Cohen, D.; Roach, T.; StJohn, A.; Khatri, A.; Davis, K.; Mullins, J.; Goulder, P.J.R.; Walker, B.D. & Brander, C. 2004. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *Journal of Virology*, **78** (5): 2187-2200.
- Frahm, N.; Goulder, P.J.R. & Brander, C. Broad HIV-1 Specific CTL responses reveal extensive HLA class I binding promiscuity of HIV-derived, optimally defined CTL epitopes. In: *HIV immunology and HIV/SIV vaccine databases 2003*. B.T.M Korber; C. Brander; B.F. Haynes; R. Koup; J.P. Moore; B.D. Walker & D.I. Watkins (Ed.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 3-20.
- Freund, J.; Kellner, R.; Konvalinka, J.; Wolber, V.; Kräusslich, H.G. & Kalbitzer, H.R. 1994. A possible regulation of negative factor (Nef) activity of human immunodeficiency virus type 1 by the viral protease. *European Journal of Biochemistry*, **223**: 589-593.

- Gadelha, S.R.; Shindo, N.; Cruz, J.N.M.; Morgado, M.G. & Galvão-Castro, B. 2003. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98** (4): 461-464.
- Gaedigk-Nitschko, K.; Schon, A.; Wachinger, G.; Erfle, V. & Kohleisen, B. 1995. Cleavage of recombinant and cell derived human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Nef protein by HIV-1 protease. *FEBS Letters*, **357** (3):275-278.
- Gahéry-Ségard, H.; Pialoux, G.; Charmeteau, B.; Sermet, S.; Poncelet, H.; Raux, M.; Tartar, A.; Lévy, J.P.; Grass-Masse, H. & Guillet, J.G. 2000. Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine. *Journal of Virology*, **74** (4): 1694-1703.
- Gallo, R.C. & Montagnier, L. 2002. Prospects for the future. *Science*, **298** (5599): 1730-1731.
- Gallo, R.C.; Sarin, P.S.; Gelmann, E.P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V.S.; Mann, D.; Sidhu, G.D.; Stahl, R.E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J. & Popovic, M. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220** (4599): 865-867.
- Geleziunas, R.; Xu, W.; Takeda, K.; Ichijo, H. & Greene, W.C. 2001. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*, **410**: 834-838.
- Geretti, A.M. 2006. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **19**: 1-7.
- Geyer, M. & Peterlin, B.M. 2001. Domain assembly and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Letter*, **496**: 91-95.
- Geyer, M.; Fackler, O.T. & Peterlin, M. 2001. Structure-function in HIV-1 Nef. *EMBO reports*, **21** (71): 580-585.
- Geyer, M.; Yu, H.; Mandic, R.; Linnemann, T.; Zheng, Y.H.; Fackler, O.T. & Peterlin, B.M. 2002. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein

- complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *Journal of Biological Chemistry*, **277** (32): 28521-28529.
- Greenberg, M.; DeTulleo, L.; Rapoport, I.; Skowronski, J. & Kirchhausen, T. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Current Biology*, **8** (22): 1239-1242.
- Grzesiek, S.; Bax, A.; Clore, G.M.; Gronenborn, A.M.; Hu, J.S.; Kaufman, J.; Palmer, I.; Stahl, S.J. & Wingfield, P.T. 1996a. The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Nature Structural Biology*, **3** (4): 340-345.
- Grzesiek, S.; Bax, A.; Hu, J.S.; Kaufman, J.; Palmer, I.; Stahl, S.J.; Tjandra, N. & Wingfield, P.T. 1997. Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef. *Protein Science*, **6**: 1248-1263.
- Grzesiek, S.; Stahl, S.J.; Wingfield, P.T. & Bax, A. 1996b. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry*, **35** (32): 10256-10261.
- Guimarães, M.L.; Moreira, A.D.S.; Loureiro, R.; Galvão-Castro, B. & Morgado, M.G. 2002a. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian Southeastern and Southern regions. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **18** (17): 1261-1269.
- Guimarães, M.L.; Moreira, A.S. & Morgado, M.G. 2002b. Polymorphism of the human immunodeficiency virus type 1 in Brazil: genetic characterization of the *nef* gene and implications for vaccine design. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97** (4): 523-526.
- Hahn, T.; Ramakrishnan, R. & Ahmad, N. 2003. Evaluation of genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 *nef* gene associated with vertical transmission. *Journal of Biomedical Science*, **10**: 436-450.
- Hierholzer, J.; Montano, S.; Hoelscher, M.; Negrete, M.; Hierholzer, M.; Ávila, M.M.; Carrillo, M.G.; Russi, J.C.; Vinales, J.; Avala, A.; Acosta, M.E.; Gianella, A.;

- Andrade, R.; Sanchez, J.L.; Carrion, G.; Sanchez, J.L.; Russell, K.; Robb, M.; Birx, D.; Mccutchan, F. & Carr, J.K. 2002. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay and Argentina. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **18** (18): 1339-1350.
- Hillis, D.M. & Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, **42**: 182-192.
- HIV databases, website, <http://hiv-web.lanl.gov/>, acessado em 24 de Fevereiro de 2006.
- Huang, Y.; Zhang, L. & Ho, D.D. 1995. Characterization of *nef* sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, **69** (1): 93-100.
- IAVI, *International AIDS Vaccine Initiative*. 2004. *Scientific Blueprint 2004 : Accelerating global efforts in AIDS vaccine research and development*. XV International AIDS Conference, Bangkok, 29 pp. Disponível em: <http://www.iavi.org/>
- Janvier, K.; Craig, H.; Hitchin, D.; Madrid, R.; Sol-Foulon, N.; Renault, L.; Cherfils, J.; Cassel, D.; Benichou, S. & Guatelli, J. 2003. HIV-1 Nef stabilizes the association of adaptor protein complexes with membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **278** (10): 8725-8732.
- Jere, A.; Tripathy, S.; Agnihotri, K.; Jadhav, S. & Paranjape, R. 2004. Genetic analysis of Indian HIV-1 *nef*: subtyping, variability and implications. *Microbes and Infection*, **6**: 279-289.
- Kaufmann, D.E. ; Bailey, P.M.; Sidney, J.; Wagner, B.; Norris, P.J.; Johnston, M.N.; Cosimi, L.A.; Addo, M.M.; Lichterfeld, M.; Altfeld, M.; Frahm, N.; Brander, C.; Sette, A.; Walker, B.D. & Rosenberg, E.S. 2004. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of *gag* and *nef* and the presence of broadly recognized peptides. *Journal of Virology*, **78** (9): 4463-4477.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.
- Kirchhoff, F.; Easterbrook, P.J.; Douglas, N.; Troop, M.; Greenough, T.C.; Weber, J.; Carl, S.; Sullivan, J.L. & Daniels, R.S. 1999. Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. *Journal of Virology*, **73** (7): 5497-5508.
- Klein, M. 2003. Prospects and challenges for prophylactic and therapeutic HIV vaccines. *Vaccine*, **21**: 616-619.
- Korber, B.T.M.; Brander, C.; Haynes, B.F.; Koup, R.; Moore, J.P.; Walker, B.D. & Watkins, D.I.; editors. *HIV immunology and HIV/SIV vaccine databases 2003*. New Mexico; Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics.
- Kumar, M. & Mitra, D. 2005. Heat Shock Protein 40 is necessary for human immunodeficiency virus-1 Nef-mediated enhancement of viral gene expression and replication. *The Journal of Biological Chemistry*, **280** (48): 40041-40050.
- Larder, B.; Richman, D. & Vella, S. 2001. *HIV Resistance and Implications for Therapy*. 2nd ed. Atlanta; MediCom Inc, 95pp.
- Larsen, J.E.; Massol, R.H. ; Nieland, T.J.F. & Kirchhausen, T. 2004. HIV Nef-mediated Major Histocompatibility Complex Class I down-modulation is independent of Arf6 activity. *Molecular Biology of the Cell*, **15**: 323-331.
- Leitner, T.; Korber, B.; Daniels, M.; Calef, C. & Foley, B. 2005. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, 2005. In: *HIV Sequence Compendium 2005*. T. Leitner; B. Foley; B. Hahn; P. Marx; F. McCutchan; J. Mellors; S. Wolinsky & B. Korber (Ed). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 41-48.
- Levy, J.A. 1998. *HIV and the pathogenesis of AIDS*. Washington, DC. 588pp.

- Levy, J.A.; Hoffman, A.D.; Kramer, S.M.; Landis, J.A.; Shimabukuro, J.M. & Oshiro, L.S. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, **225** (4664): 840-842.
- Li, P.L.; Wang, T.; Buckley, K.A.; Chenine, A.L.; Popov, S. & Ruprecht, R.M. 2005. Phosphorylation of HIV Nef by cAMP-dependent protein kinase. *Virology*, **331**: 367-374.
- Liang, X.; Fu, T.; Xie, H.; Emini, E.A. & Shiver, J. W. 2002. Development of HIV-1 Nef vaccine components: immunogenicity study of Nef mutants lacking myristoylation and dileucine motif in mice. *Vaccine*, **20**: 3413-3421.
- Lim, W.A.; Richards, F.M. & Fox R.O. 1994. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*, **372**: 375-379.
- Lodish, H.; Berk, A.; Maturaid, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L. & Darnell, J. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York; WH Freeman and Company, 973 pp.
- Los Alamos HIV Immunology Database. Los Alamos Nacional Laboratory, website <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>. Acessado em julho de 2006.
- Lu, X.; Yu, H.; Liu, S.H.; Brodsky, F.M. & Peterlin, B.M. 1998. Interactions between HIV-1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity*, **8**:647-656.
- Manninen, A.; Hiipakka, M.; Vihine, M.; Lu, W.; Mayer, B.J. & Saksela, K. 1998. SH3-domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology*, **250**: 273-282.
- Mariani, R.; Kirchhoff, F.; Greenough, T.C.; Sullivan, J.L.; Desrosiers, R.C. & Skowronski, J. 1996. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, **70** (11): 7752-7764.

- McNearney, T.; Hornickova, Z.; Templeton, A.; Birdwell, A.; Arens, M.; Markham, R.; Saah, A. & Ratner, L. 1995. Nef and LTR sequence variation from sequentially derived human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Virology*, **208**: 388-398.
- Michel, N.; Allespach, I.; Venzke, S.; Fackler, O.T. & Keppler, O.T. 2005. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Current Biology*, **15** (8): 714-723.
- Morgado, M.G.; Guimarães, M.L. & Galvão-Castro, B. 2002. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97** (2): 143-150.
- Morgado, M.G.; Guimarães, M.L.; Neves, J.I.; dos Santos, V.G.; Linhares-de-Carvalho, M.I.; Castello-Branco, L.R.; Bastos, F.I.; Castilho, E.A.; Galvao-Castro, B. & Bongertz, V. 1998. Molecular epidemiology of HIV in Brazil: polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93** (3): 383-386.
- Mortara, L.; Gras-Masse, H. ; Rommens, C. ; Venet, A. ; Guillet, J.G. & Bourgault-Villada, I. 1999. Type 1 CD4⁺ T-cell help is required for induction of anti-peptide multispecific cytotoxic T lymphocytes by a lipopeptidic vaccine in Rhesus macaques. *Journal of Virology*, **73** (5): 4447-4451.
- Oldrige, J. & Marsh, M. 1998. Nef – an adaptor adaptor? *Trends in Cell Biology*, **8** (8): 302-305.
- Oliveira, T.; Deforche, K.; Cassol, S.; Salminen, M.; Paraskevis, D.; Seebregts, C.; Snoeck, J.; van Rensburg, E.J.; Wensing, A.M.J.; van de Vijver, D.A.; Boucher, C.A.; Camacho, R. & Vandamme, A.M. 2005. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics*, **21**(19): 3797-800.
- Osmanov, S.; Pattou, C.; Walker, N.; Schwarzländer, B. & Esparza, J. 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, **29** (2): 184-190.

- Pandori, M.W.; Fitch, N.J. Craig, H.M.; Richman, D.D.; Spina, C.A. & Guatelli, J.C. 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *Journal of Virology*, **70**: 4283-4290.
- Parreira, R.; Padua, E.; Piedade, J.; Venenno, T.; Paixao, M.T. & Esteves, A. 2005. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef in Portugal: subtyping, identification of mosaic genes, and amino acid sequence variability. *Journal of Medical Virology*, **77** (1): 8-16.
- Peeters, M. 2000. Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. In: *HIV Sequence Compendium 2000*. C. Kuiken; B. Foley; B. Hahn; F. Mccutchan; J. Mellors; S. Wolinsky & B. Korber (Ed.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 1-39.
- Perrin, L.; Kaiser, L. & Yerly, S. 2003. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *The Lancet Infectious Diseases*, **3**: 22-27.
- Pialoux, G.; Gahery-Segard, H.; Sermet, S.; Poncelet, H.; Fournier, S.; Gerard, L.; Tartar, A.; Gras-Masse, H.; Levy, J.P.; Guillet, J.G. & ANRS VAC 04 Study Team. 2001. Lipopeptides induce cell-mediated anti-HIV immune responses in seronegative volunteers. *AIDS*, **15** (10): 1239-1249.
- Piguet, V.; Gu, F.; Foti, M.; Demarex, N.; Gruenberg, J.; Carpentier, J.L. & Trono D. 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell*, **97** (1): 63-73.
- Piguet, V.; Wan, L.; Borel, C.; Mangasarian, A.; Demarex, N.; Thomas, G. & Trono, D. 2000. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nature Cell Biology*, **2**: 167-173.
- Planz, O.; Ehl, S.; Furrer, E.; Horvath, E.; Brundler, M.A.; Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. 1997. A critical role for neutralizing-antibody-producing B cells, CD4(+) T cells, and interferons in persistent and acute infections of mice with lymphocytic choriomeningitis virus: implications for adoptive immunotherapy of virus carriers.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94** (13): 6874-6879.
- Prusiner, S.R. 2002. Discovering the cause of AIDS. *Science*, **298** (5599): 1726-1727.
- 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.; Wolinsky, S. & Korber, B. 1999. HIV-1 nomenclature proposal: a reference guide to HIV-1 classification. In: *HIV Sequence Compendium 1999*. C. Kuiken; B. Foley; B. Hahn; P. Marx; F. Mccutchan; J. Mellors; S. Wolinsky & B. Korber (Ed.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 492-505.
- Ross, T.M.; Oran, A.E. & Cullen, B.R. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Current Biology*, **9** (12): 613-621.
- Sanabani, S.; Neto, W.K.; Kalmar, E.M.; Diaz, R.S.; Janini, L.M. & Sabino, E.C. 2006. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, **6** (5): 368-377.
- Schiavoni, I.; Trapp, S.; Santarcangelo, A.C.; Piacentini, V.; Pugliesi, K.; Bours, A. & Federico, M. 2004. HIV-1 Nef enhances both membrane expression and virion incorporation of Env products. *The Journal of Biological Chemistry*, **279** (22): 22996-23006.
- Schorr, J.; Kellner, R.; Fackler, O.; Freund, J.; Konvalinka, J.; Kienzle, N.; Krausslich, H.G.; Mueller-Lantzsch, N. & Kalbitzer, H.R. 1996. Specific cleavage sites of Nef proteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 for the viral proteases. *Journal of Virology*, **70** (12): 9051-9054.
- Shinya, E.; Owaki, A.; Shimizu, M.; Takeuchi, J.; Kawashima, T.; Hidaka, C.; Satomi, M.; Watari, E.; Sugita, M. & Takahashi, H. 2004. Endogenously expressed HIV-1 *nef*

- down-regulates antigen-presenting molecules, not only class I MHC but also CD1a, in immature dendritic cells. *Virology*, **326**: 79-89.
- Sierra, M.; Thomson, M.M.; Rios, M.; Casado, G.; Castro, R.O.; Delgado, E.; Echevarria, G.; Munoz, M.; Colomina, J.; Carmona, R.; Veja, Y.; Parga, E.V; Medrano, L.; Perez-Alvarez, L.; Contreras, G. & Najera, R. 2005. The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12_BF. *Infection, Genetics and Evolution*, **5** (3): 209-217.
- Soares, E.A.; Martinez, A.M.; Souza, T.M.; Santos, A.F.; Da Hora, V.; Silveira, J.; Bastos, F.I.; Tanuri, A. & Soares, M.A. 2005. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS*, **19** (4): 81-86.
- Soares, E.A.J.M.; Santos, R.P.; Pellegrini, J.A.; Sprinz, E.; Tanuri, A. & Soares, M. 2003a. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in Southern Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, **34** (5): 520-526.
- Soares, M.A.; Oliveira, T.D.; Brindeiro, R.M.; Diaz, R.S.; Sabino, E.C.; Brígido, L.; Pires, I.L.; Morgado, M.G.; Dantas, M.C.; Barreira, D.; Teixeira, P.R.; Cassol, S. & Tanuri, A. 2003b. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS*, **17**: 11-17.
- Stevens, T.H. & Forgac, M. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **13**: 779-808.
- Stoddart, C.A.; Geleziunas, R.; Ferrell, S.; Linqvist-Stepps, V.; Moreno, M.E.; Bare, C.; Xu, W.; Yonemoto, W.; Bresnahan, P.A.; McCune, J.M. & Greene, W.C. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis. *Journal of Virology*, **77** (3): 2124-2133.

- Stumptner-Cuvelette, P. ; Morchoisne, S. ; Dugast, M. ; Le Gall, S. ; Raposo, G. ; Schwartz, O. & Benaroch, P. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (21): 12144-12149.
- Swigut, T.; Shohdy, N. & Skowronski. 2001. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *The EMBO Journal*, **20** (7): 1593-1604.
- Swingler, S.; Brichacek, B.; Jacque, J.M.; Ulich, C.; Zhou, J. & Stevenson, M. 2003. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature*, **424** (6945): 213-219.
- Takebe, Y.; Kusagawa, S. & Motomura, K. 2004. Molecular epidemiology of HIV: tracking AIDS pandemic. *Pediatrics International*, **46** (2): 236-244.
- Tanuri, A.; Caridea, E.; Dantas, M.C.; Morgado, M.G.; Mello, D.L.C.; Borges, S.; Tavares, M.; Ferreira, S.B.; Santoro-Lopes, G.; Martins, C.R.F.; Esteves, A.L.C.; Diaz, R.S.; Andreo, S.M.S.; Ferreira, L.A.P.; Rodrigues, R.; Reuter, T.; Cavalcanti, A.M.S.; Oliveira, S.M.; Barbosa, H.B.; Teixeira, P.R. & Chequer, P.N. 2002. Prevalence of mutations related to HIV-1 anti-retroviral resistance in brazilian patients failing HAART. *Journal of Clinical Virology*, **25**: 39-46.
- Thompson J, Higgins D & Gibson T. 1994. CUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, **22**: 4673-4680.
- Thomson, M.M.; Delgado, E.; Herrero, I.; Villahermosa, M.L.; Vazquez-de Parga, E.; Cuevas, M.T.; Carmona, R.; Medrano, L.; Perez-Alvarez, L.; Cuevas, L. & Najera, R. 2002. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *Journal of General Virology*, **83** (Pt 1): 107-119.
- Tobery, T.W. & Siliciano, R.F. 1997. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of

- de novo CTL responses in vivo after immunization. *Journal of Experimental Medicine*, **185** (5): 909-920.
- UNAIDS. 2005. *AIDS epidemic update: December 2005*. 81 pp.
- Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R. & Wickner R.B. 2000. *Virus taxonomy: Seventh report of international committee on taxonomy of viruses*. San Diego; Academic Press, 1024 pp.
- Véras, N.M.C. 2006. *Análise da variabilidade genética do HIV-1 no Distrito Federal*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 140pp.
- Veras, V.S. 2006. *Caracterização da variabilidade antigênica do gene do Envelope (env) em amostras de HIV-1 circulantes no Distrito Federal*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 95pp
- Vicente, A.C.P. ; Otsuki, K. ; Silva, N.B.; Castilho, M.C.; Barros, F.S.; Pieniazek, D.; Hu, D.; Rayfield, M.; Bretãs, G. & Tanuri, A. 2000. 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.
- Welker, R.; Kottler, H.; Kalbitzer, H.R. & Krausslich, H.G. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology*, **219** (1): 228-236.
- Wigg, M.D. 2002. Vírus da imunodeficiência humana. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução a Virologia Humana*. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 183-197.
- Wu, Y. & Marsh, J.W. 2001. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, **293** (5534): 1503-1506.

- Xu, X.N. ; Laffert, B.; Screaton, G.R.; Kraft, M.; Wolf, D.; Kolanus, W.; Mongkolsapay, J.; McMichael, A.J. & Baur, A.S. 1999. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *Journal of Experimental Medicine*, **189**: 1489-1496.
- Zheng, Y.H.; Plemenitas, A.; Fielding, C.J. & Peterlin, B.M. 2003. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (14): 8460-8465.