



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**TRABALHO DE TESE**

**APLICAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM PARA DETERMINAÇÃO  
DO TROPISMO E AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HIV-1**

**ALEX JOSÉ LEITE TORRES**

**Salvador - Bahia**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**TRABALHO DE TESE**

**APLICAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM PARA DETERMINAÇÃO  
DO TROPISMO E AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HIV-1**

**ALEX JOSÉ LEITE TORRES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves**

Salvador-Bahia

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária  
de Saúde, SIBI - UFBA.

689

Torres, Alex José Leite

Aplicação da Imunofenotipagem para determinação do tropismo e avaliação da carga proviral do HIV-1 / Alex José Leite Torres. – Salvador, 2012.

116 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciência da Saúde, 2012.

1. HIV. 2. Tropismo do HIV. 3. Carga Proviral. I. Brites, Carlos Roberto Alves. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.988

Aos meus queridos e amados pais, por toda a dedicação e carinho concedidos em todos os momentos da minha vida. Aos meus filhos Marcos Adriano e Alex Júnior por toda a alegria que me trazem e pela compreensão dos momentos ausentes na construção deste trabalho e à Yemanjá por toda a serenidade e guia concedida em minhas orações.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Brites, por toda a colaboração, disposição e incentivo à conquista de mais um importante passo profissional alcançado;

Ao Prof. Dr. Eduardo Netto pelos importantes aprendizados compartilhados ao longo de toda essa minha jornada científica;

À Nádja Pacheco pelo companheirismo, doação e por me conceder essencial ânimo e alegria aos meus dias.

À André Ramos, Jaqueline Dinis pela convivência, amizade e aprendizado de sempre.

À Marcos Abrahão pela amizade e parceria e ao estudante de biomedicina e aluno Gilcivaldo Ferreira pela amizade e enorme colaboração neste trabalho;

Aos colegas Rosangela Castro, Carlos Saldanha, Márcia Paz, Natanael Dantas, Maurina Alcântara, Estela Luz, Célia Pedroso, Christiane Santiago, Cristiani Stelitano, Ivana Luz, Dona Vera, Haína Araújo, Camila Coutinho, Denise Candeia, Clara Brites, Juliana Abreu, Sara Nunes e Lisiane Vendruscolo do Laboratório de Pesquisa em Infectologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos pela trabalhosa, mas não menos prazerosa convivência cotidiana;

À Lílian Inocência e a Denise Souza por toda a amizade e confiança concedidas a mim ao longo de toda minha participação no Programa de AIDS do Ministério da Saúde do Brasil;

Aos eternos colegas consultores “tropa de elite” do Programa de AIDS do Ministério da Saúde do Brasil;

Ao Dr. Luís Brígido e sua equipe do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pela parceria na construção deste trabalho;

Ao Departamento Nacional DST e AIDS e Hepatites Virais pelo apoio financeiro neste trabalho;

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1. Vírus da Imunodeficiência Humana	17
2.2 Epidemiologia	19
2.3. Respostas imunes na infecção pelo HIV	22
2.3.1. Resposta imune celular	22
2.4. Tropismo viral	25
2.5. Tratamento	32
2.5.1. Inibidores de Fusão	33
2.5.2. Inibidores dos co-receptores de quimiocinas CCR5	35
2.5.2.1. Anticorpos anti-CCR5	35
2.5.2.2. Inibidores de CCR5	38
2.5.3. Inibidores dos co-receptores de quimiocinas CXCR4	40
2.6. Detecção do tropismo aos receptores de quimiocinas do HIV	42
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>45</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
Artigo 1: High degree of concordance by using Flow Cytometry and geno2pheno methods for HIV-1 tropism determination in DNA proviral	49
<b>INTRODUCTION</b>	<b>50</b>
<b>METHODS</b>	<b>51</b>
<i>Tropism viral procedure by flow cytometry</i>	51
<i>HIV-1 env genetic sequence</i>	52
<b>RESULTS</b>	<b>53</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>60</b>
Artigo 2: Determinação de carga proviral do HIV-1 pela técnica de Citometria de Fluxo em pacientes com diferentes estágios de viremia.	64
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>64</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>66</b>

<i>Detecção da carga proviral do HIV-1 por Citometria de Fluxo</i>	<b>66</b>
<i>Procedimento do teste para detecção da carga viral plasmática do HIV pela metodologia b-DNA VERSANT 3.0.</i>	<b>68</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>69</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>73</b>
<b>Artigo 3: Establishing the normal range for t lymphocytes subpopulations in adults and children from brazil</b>	<b>77</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>78</b>
<b>METHODS</b>	<b>79</b>
<b>RESULTS</b>	<b>81</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>84</b>
<b>AKNOWLEDGES</b>	<b>87</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>87</b>
<b>6. RESUMO DE RESULTADOS</b>	<b>92</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>95</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do Vírus da Imunodeficiência Humana.	18
Figura 2. Mecanismo de entrada do VIH na célula hospedeira sendo mediada pela glicoproteína do envelope	26
Figura 3. Diagrama esquemático do procedimento do teste para detecção de tropismo Trofile.	44
<b>Artigo 1: High degree of concordance by using Flow Cytometry and geno2pheno methods for HIV-1 tropism determination in DNA proviral</b>	
Figura 1. Dot plot analysis to HIV-1 determination tropism	55
<b>Artigo 2: Determinação de carga proviral do HIV-1 pela técnica de Citometria de Fluxo em pacientes com diferentes estágios de viremia.</b>	
Figura 1. Identificação da presença da probe do HIV-1 em células CD4+ em grupos controle.	69
Figura 2. Perfil de análises da carga proviral em pacientes HIV-1 infectados.	70



## LISTA DE TABELAS

### **Artigo 1: High degree of concordance by using Flow Cytometry and geno2pheno methods for HIV-1 tropism determination in DNA proviral.**

Table 1 – HIV-1 <i>gag</i> and <i>pol</i> regions in the probe used.	52
Table 2 – HIV-1 tropism classification comparing two tests.	56
Table 3 – HIV-1 tropism results stratified by CD4 range.	58

### **Artigo 2: Determinação de carga proviral do HIV-1 pela técnica de Citometria de Fluxo em pacientes com diferentes estágios de viremia.**

Tabela 1 – Sequências das bases dos genes <i>gag</i> e <i>pol</i> que compõem a sonda e fluoróforo marcado	67
Tabela 2 - Médias de cargas provirais entre grupos de pacientes em associação com carga viral plasmática e uso de TARV.	70

### **Artigo 3: Establishing the normal range for T lymphocytes subpopulations in adults and children from brazil**

Table 1. Median and mean for T subpopulations cells.	81
Table 2. Correlations among demographics data and T lymphocytes absolute values	82
Table 3. Correlations among demographics data and T lymphocytes percentage values	83
Table 4. Mean and standard deviation for T lymphocytes among cities	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana, (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Vírus</i> )
APOBEC3G	Complexo de apolipoproteína B editado (do inglês, <i>Apolipoprotein B editing complex</i> )
BCRs	Receptores de células B (do inglês, <i>B Cells Receptors</i> )
CA	Capsídeo
CCL5	Motivo C-C ligante do tipo 5
CCR2	Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 2
CCR2b	Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 2b
CCR3	Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 3
CCR5	Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 5
CCR7	Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 7
CCR8	Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 8
CD4	Proteína receptora 4 (do inglês, <i>Cluster of differentiation 4</i> )
CD5	Molécula receptora 5
cDNA	DNA complementar
CTL	Células citotóxicas ou citolíticas
CXCR4	Motivo C-X receptor de quimiocina do tipo 4
DC-SIGN	Molécula 3 aderida a não integrina de adesão intercelular específica de células dendríticas (do inglês, <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adesion molecule-3-grabbing non-integrin</i> )
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FasL	Molécula ligante indutora de apoptose
Faz	Molécula indutora de apoptose
Gp120	Glicoproteína do tipo 120
gp41	Glicoproteína 41
GRID	Imunodeficiência relacionadas aos gays (do inglês, <i>Gay-related Immunodeficiency disease</i> )
HAART	Terapia antiretroviral altamente ativa (do inglês, <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> )
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HLA	Antígeno leucocitário Humano (do inglês, <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
IFN-1	Interferon do tipo 1

IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IL-17	Interleucina tipo 17
IL-2	Interleucina do tipo 2
IL-4	Interleucina do tipo 4
IL-5	Interleucina do tipo 5
kDa	Kilodaltons
LTR	Sequências repetitivas de nucleotídeos ( do inglês, <i>Long terminal repeat</i> )
MA	Matriz
Met	Metionina
MIP-1 $\alpha$	Proteínas inflamatórias de macrófagos tipo 1 alfa (do inglês, <i>Macrophage Inflammatory Proteins</i> )
MIP-1 $\beta$	Proteínas inflamatórias de macrófagos tipo 1 beta (do inglês, <i>Macrophage Inflammatory Proteins</i> )
mRNA	RNA mensageiro ( do inglês, <i>messenger RNA</i> )
MSM	Homens que fazem sexo com homens (do inglês, <i>Man who have sex with man</i> )
MVC	Maraviroc
NC	Nucleocapsídeo
NKT	Células assassinas naturais T (do inglês, <i>Natural Killers T cells</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Soro fetal bovino (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i> )
PD1	Morte programada do tipo 1 (do inglês, <i>Programmed death 1</i> )
PDCs	Células dendríticas plasmocitóides ( do inglês, <i>Plasmacytoid dendritic cells</i> )
pH	Potencial Hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
RANTES	Receptor de quimiocinas reguladas sob ativação em células T normais expressas e secretadas (do inglês <i>Regulated upon Activation. Normal T-cell Expressed and secreted</i> )
RNA	Ácido ribonucleic
SDF-1	Fator celular derivado do estroma (do inglês, <i>Stromal Derived Factor</i> )
Ser	Serina
SEVI	Sêmen derivado do reconhecimento de infecção viral

SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
SIV	Vírus da imunodeficiência Símia ( <i>do inglês Simian Immunodeficiency Virus</i> )
TCR	Receptores de células T ( <i>do inglês, T cells receptors</i> )
Th1	Células T auxiliares do tipo 1 ( <i>do inglês, T Helper 1</i> )
Th17	Células T auxiliares do tipo 17 ( <i>do inglês, T Helper 17</i> )
Thr	Treonina
Tim-3	Molécula 3 contendo domínio de mucina e imunoglobulina ( <i>do inglês, Immunoglobulin and mucina domains-containing molecule-3</i> )
TLR-8	Receptores de células do tipo <i>toll</i> ( <i>do inglês, Toll Like Receptors</i> )
TLRs	Receptores de células do tipo <i>toll</i> ( <i>do inglês, Toll Like Receptors</i> )
TReg	Células T regulatórias
TRIM5a	Proteína de restrição motivo tripartite ( <i>do inglês, Tripartite motif</i> )
Trp	Triptofano
UDIV	Usuários de drogas intravenosas
UNAIDS	Programa das Nações Unidas contra AIDS ( <i>do inglês, Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i> )
VLPs	Partículas virais ( <i>do inglês, Virus-like particles</i> )
WAP	Proteínas Ácidas do soro do leite ( <i>do inglês, Whey Acidic Proteins</i> )
wt	Tipo selvagem ( <i>do inglês Wild Type</i> )
$\Delta 32$	Deleção delta 32

## RESUMO

**RACIONAL:** Tropismo viral e carga proviral do HIV possuem papel fundamental para o auxílio da introdução de terapia e avaliação da patogênese do vírus, respectivamente, os quais são determinados, atualmente, por técnicas de genotipagem e fenotipagem. Outro importante parâmetro para monitoramento laboratorial do sistema imune do paciente HIV positivo é a determinação de valores de referências dos linfócitos T, dados esses inexistente para a população brasileira que é caracterizada por uma grande diversidade étnica e cultural.

**OBJETIVOS:** Determinar a sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo para detecção intracitoplasmática do HIV-1, identificando o tropismo viral e carga proviral deste vírus e estabelecer valores de referências das subpopulações dos linfócitos T na população brasileira.

**MÉTODOS:** Para a detecção do vírus intracelular, foram avaliados 102 pacientes soropositivos para o HIV-1, atendidos no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, estratificado em estágios de viremia diferenciados e para a determinação dos valores de referências das células T, foram triados 645 doadores de sangue de 03 hemocentros e 02 hospitais universitários, das cinco regiões brasileiras, além de 280 crianças atendidas em dois hospitais universitários, um no Rio de Janeiro e outro na Bahia. Amostras foram submetidas a marcação através de anticorpos monoclonais anti-CD3+, anti-CD4+, anti-CD8+, anti-CD45+, anti-CCR5+ e anti-CXCR4 e probe complementar das regiões *gag* e *pol* do HIV para a avaliação da imunofenotipagem celular.**RESULTADOS:** A determinação do tropismo viral por imunofenotipagem obteve uma elevada correlação com os resultados comparados com geno2pheno representando 97.2% de especificidade e 95% de intervalo de confiança com variação entre 85.8%-99.5%. Pacientes controladores de elite apresentaram uma significativa diferença da carga proviral em comparação com pacientes com cargas virais plasmáticas indetectáveis e detectáveis em terapia. Pacientes com tropismo CCR5 e carga viral indetectável há menos de cinco anos apresentaram carga proviral mais elevada em comparação aos indetectáveis há mais de cinco anos. Os valores de referência dos linfócitos T CD4+ na população brasileira mostraram-se variáveis entre as regiões, sendo São Paulo e Rio Grande do Sul superiores em comparação às demais regiões, o que caracteriza a importância da influência étnica e cultural entre a diversidade das populações. **CONCLUSÃO:** Os testes de tropismo viral e carga proviral por citometria de fluxo apresentaram-se como importantes ferramentas tendo significativa diminuição do custo e do tempo de procedimento e também devem ser adotados valores de referências diferenciados nas regiões do Brasil, devido a características peculiares regionais em suas populações.

**Palavras chave:** HIV, tropismo viral, carga proviral, células T CD4+, citometria de fluxo

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Viral tropism and proviral load has a main role to therapy introduce and viral pathogenesis evaluation, respectively, that are determinate by genotyping and phenotyping methods. Subset T lymphocytes ranges also is very important to laboratorial monitoring of the immune system from HIV patients. Theses data do not exists in the Brazilian population, being characterized by great ethical and culture diversity.**OBJECTIVES:** To determinate sensibility and specificity of the flow Cytometry to HIV-1 intracytoplasmic detection to viral tropism and proviral load identification and to establish T lymphocytes subset ranges in Brazilian population.**METHODS:** To HIV-1 intracytoplasmic detection, 102 HIV patients stratified by viremic stages and plasma viral load were evaluated. T CD4+ lymphocytes reference range was establishment of the 645 blood donors of the five Brazilians regions and 280 childrens and infants from Bahia and Rio de Janeiro. Samples were labeled with anti-CD3+, anti-CD4+, anti-CD8+, anti-CD45+, anti-CCR5+ and anti-CXCR4+ monoclonal antibodies to immunophenotyping and HIV probe to cellular immunophenotyping evaluation.**RESULTS:** Viral tropism by immunophenotyping obtained high correlation with geno2pheno results with specificity 97.2% and confidence interval 95%.HIV-1 proviral load presented statistical difference among ellite control patients and undetectable or detectable plasma viral load in use of HAART. CCR5 tropism patient and undetectable plasma viral load at time minor five years had HIV-1 proviral load higher than undetectable plasma viral load greater five years. Variations to lymphocytes T subsets reference range in Brazilian population were found and São Paulo and Rio Grande do Sul obtained greater absolute values than others regions that shows an ethnical and cult interventions. **CONCLUSION:** Viral tropism and proviral load assays by flow Cytometry presents as new tools to HIV-1 monitoring having lower cost and more quickly procedure and different count to T cells reference range should be used according Brazilians regions due a specifical characteristic among states.

**Keywords:** HIV, viral tropism, proviral load, T CD4+ cells, flow cytometry

## 1. INTRODUÇÃO

---

Em 30 anos desde o primeiro caso, o Vírus da Imunodeficiência Humana tem atingido proporções globais. Uma estimativa de 25 milhões de pessoas morreram e cerca de 33 milhões de pessoas estão vivendo com HIV/AIDS. Esta pandemia não é homogênea, o retrato global é muito diverso. Em países ricos, a maioria na América do Norte, Ásia, Norte da África e meio oeste, as infecções estão concentradas em localizações geográficas específicas e entre grupos populacionais direcionados, normalmente populações marginalizadas politicamente e socialmente, incluindo usuários de drogas injetáveis, homossexuais masculinos e profissionais do sexo. (SMITH J., 2010)

Enormes avanços na terapia do HIV / AIDS alteraram profundamente a história natural da doença e reduzindo drasticamente a morbidade e mortalidade associadas ao HIV em países onde tais tratamentos são acessíveis. O advento de medicamentos anti-retrovirais no final de 1980 iniciou uma revolução no controle do HIV, semelhante ao observado para o uso da penicilina para tratar infecções bacterianas em 1940. O avanço mais notável remete ao uso da terapia anti-retroviral combinada (HAART), que se mostrou muito mais eficaz que monoterapia ou dupla terapia (BERTOZZI, T *et AL.*, 2006).

A proteína de envelope do HIV-1, liga-se ao receptor CD4 e aos co-receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4, sendo imprescindível para a entrada e destruição das células que contenham estes receptores: linfócitos T e macrófagos.(FRISCH M, 2001). Desde que a primeira droga antagonista do co-receptor CCR5 foi comercializada, os testes de tropismo vem sendo cada vez mais estudados em tópicos de pesquisa do HIV. Medicamentos antagonistas de CCR5 são administrados em pré-tratamentos e em pacientes com AIDS infectados por vírus trópicos para este co-receptor. (GONZALEZ-SERNA A, 2010).

A carga proviral do HIV-1 pode ser considerada como um marcador de magnitude de um dos reservatórios virais como as células T de latência prolongada. Sua importância como marcador prognóstico da patogenia ainda é objeto de debate (PARISI S.G. *et al*, 2011).

Em estudos realizados na Itália, Turquia e Suíça, os valores de referência de linfócitos T, apresentaram diferenças importantes. Em células T CD3+ a Itália apresentou 3.7% mais alta que na Turquia e 1% maior que na Suíça. Para T CD4+ os valores absolutos foram 6% maiores na Itália e 2.9% maiores que na Suíça. Entre as células T CD8+ este mesmo aumento foi de 2.6% em comparação com a Turquia e 3.2% em comparação com Suíça. (SANTAGOSTINO et al. 1999; BISSET et al. 2004; IKINCIÖGULLARI et al. 2004).

Diferenças significantes entre os valores de referência de linfócitos T encontrados na Bahia e no Pará, reafirmam a necessidade da determinação destes valores em outras regiões do Brasil, devido a grande diversidade étnica e cultural da sua população que podem apresentar novos parâmetros de avaliação para estas células (TORRES, A.J.L. *et al*, 2008)



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

### **2.1. Vírus da Imunodeficiência Humana**

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pertencente à família retroviridae, subfamília lentivirinae e gênero lentivirus possui uma bicamada lipídica exterior, com aproximadamente 120 a 200 nm de diâmetro. (BRIGGS J.A.G. *et al*, 2003), o qual é estudado com grupos triméricos de proteína transmembrânica Env (ZHU P *et a*, 2003).

Internamente à bicamada, existe uma série de estruturas côncavas que gerenciam o genoma do RNA viral e estão associados a enzimas para desencapsulamento e replicação em uma nova célula hospedeira. Estas diferentes estruturas côncavas são montadas durante o processo de maturação viral, quando a poliproteína *gag* é processada proteoliticamente para produzir proteínas menores da matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC). A matriz está associada com a face interna da bicamada e é composta de 4000 a 5000 cópias de proteína N-miristilada. Internamente à esta matriz, situa-se uma partícula cônica, o núcleo ou *core*, o qual o capsídeo é composto de 1000 a 1500 cópias da proteína viral CA. Dentro do capsídeo está presente uma partícula de ribonucleoproteína composta de duas cópias de genoma RNA de senso positivo, milhares de cópias de RNA ligados às proteínas NC, 250 cópias da enzima transcriptase reversa e 250 cópias da enzima integrase, conforme demonstrado na figura 1. (BRIGGS J.A.G. *et a*, 2004).

Conhecer a estrutura dos retrovirus torna-se essencial para o entendimento das suas características biológicas. Todos os retrovírus possuem um núcleo central contendo genoma de RNA associado à enzima transcriptase reversa. Alguns RNA e DNA celulares podem também apresentar RNA transportador usado como um primer para transcrição. O envelope viral externo é composto de lipídeos contendo membrana com glicoproteínas codificadoras do vírus que aparecem conectadas à superfície do vírion via proteína transmembrânica. Algumas dessas glicoproteínas servem como sítios para o ataque viral às células contendo importantes epítomos para neutralização do vírus.(LEVY J.A., 1986)

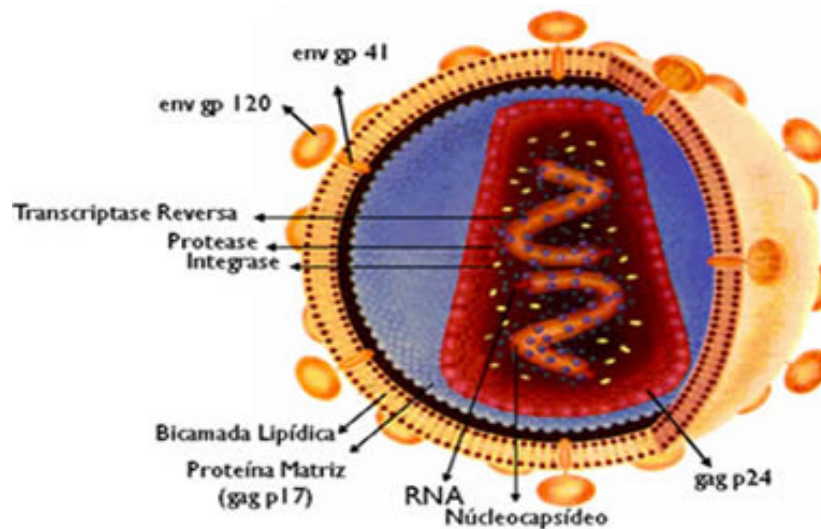


Figura 1. Anatomia do Vírus da Imunodeficiência Humana..

Fonte: Bismara. et al, 2006.

A estrutura genômica de todos os retrovírus são muito parecidas, sendo compostas de regiões codificadoras para o gene *gag* ou por grupos específicos antigênicos do núcleo viral, o *core*, polimerase e pelas proteínas do envelope (Glicoproteínas de superfície e proteínas transmembrânicas). (BALTIMORE D.A. et al , 1974).

O capsídeo contém o genoma viral, sendo duas simples fitas de moléculas de RNA, algumas proteínas virais como as do capsídeo (CA), nucleocapsídeo (NC), transcriptase reversa, integrase (IN), *Vpr* e numerosas proteínas celulares como a ciclofilina A e APOBEC3G (ARHEL N, 2006). A principal função deste capsídeo é organizar e conter o genoma viral para uma eficiente invasão às células e transcrição reversa, onde juntos possam contribuir para a eficácia da replicação em uma nova célula hospedeira. (WIEGERS A et al , 1998; KRAUSSLICH H.G. et al, 1995; LI F. et al, 2003; ZHOU J et AL, 2004).

Além disso, mutações pontuais que codificam para um capsídeo instável ou capsídeos com morfologias aberrantes, podem levar quase sistematicamente à infectividade

reduzida do HIV (FORSHEY BM *et al*, 2002), indicando a importância da forma e da estabilidade desta estrutura na patogênese viral (ARHEL N, 2006).

O processo de replicação envolve uma série de passos pelo qual o RNA viral é transcrito em dupla fita linear de DNA, torna-se circular e se integra ao cromossomo do hospedeiro. Durante este processo, o RNA viral é transcrito pela promoção e codificação de sequências contidas na porção final das regiões LTR do DNA proviral (WEISS R *et al.*, 1979; HSU T.W. *et al*, 1978; SHANK P.R. *et al*, 1978). Finalmente, o RNA mensageiro e o genoma do RNA são produzidos a partir do DNA proviral (LEVY JA, 1986).

Como todos os retrovírus e lentivírus, o HIV-1 precisa integrar-se ao DNA da célula hospedeira e como consequência, a atividade do genoma viral integrado ou pró-vírus é fortemente influenciada pelo estado de ativação e metabolismo da célula hospedeira, sendo a longevidade deste provírus, ditado pelo tempo de vida da célula infectada (STEVENSON M, 2003).

## 2.2 Epidemiologia

É amplamente conhecido que adolescentes e adultos jovens estão inseridos ou próximos do epicentro da epidemia global do HIV, através de quase todos os perfis de riscos geográficos. Características de variadas regiões globais ou perfis de riscos entre a juventude, impactará no desenvolvimento, nos testes e na prevenção para a disseminação do HIV (WILSON CM *et al*, 2010).

Dados de 2007 informam que 1,2 bilhões de jovens com idades entre 15 e 24 anos em uma estimativa de 10 milhões de pessoas, estão vivendo com HIV. Estimativas recentes da UNAIDS sugerem que mais de um milhão de novos infectados ocorrem entre 15 e 24 anos de idade a cada ano, representando cerca de 40% de novas infecções em todo o mundo (WHO, 2009). Entre grupos de 15 a 24 anos de idade vivendo com HIV, 63% vivem na África sub-sahariana e 21 % vivem na Ásia. No leste europeu e Ásia central, mais de 80% dos que vivem com HIV estão em idades abaixo de 30 anos. A África sub-sahariana contém quase dois terços de toda a população

jovem vivendo com HIV/AIDS (6.2 milhões de pessoas) onde 76% destes, são do sexo feminino (WHO, 2009).

No Brasil, as prevalências de infecção pelo HIV apresentam-se com 0,6% na população entre 15 e 49 anos de idade (0,4% nas mulheres e 0,8% nos homens) (SZWARCOWALD C.L. *et al.*, 2008), 0,12% nos jovens do sexo masculino entre 17 a 20 anos de idade (SZWARCOWALD C.L. *et al.*, 2005) e 0,28% (SZWARCOWALD C.L. *et al.*, 2008) em mulheres jovens entre 15 e 24 anos. Nas populações vulneráveis, as prevalências são mais elevadas e se destacam aquelas entre usuários de drogas ilícitas (5,9%) (BASTOS F.I., 2009), homens que fazem sexo com homens (10,5%) (KERR L, 2009) e mulheres profissionais do sexo (5,1%) (SZWARCOWALD C.L. *et al.*, 2005).

Um tema comum em todas as epidemias por diferentes partes do mundo é o impacto do risco do nível individual como fator central de transmissão através de muitas redes sociais, comunidades e falta de políticas públicas, potencialmente influenciáveis nestes níveis. Transmissão heterossexual está canalizando a epidemia na África, especialmente afetando mulheres jovens em idade fértil. Em adolescentes do sexo feminino, o risco de infecção pelo HIV está diretamente associado à idade e ao perfil de risco de seus parceiros. Então, em áreas onde a transmissão heterossexual impulsiona a epidemia local, como na África subsahariana, mulheres estão sendo infectadas com menos idades que os homens que fazem sexo com homens (MSM) (PETTIFOR A.E. *et al*, 2007; PETTIFOR A.E. *et al*, 2005; SHISANA O. *et al*, 2008).

A epidemia do HIV na América Latina, América do Norte, Europa Central, Leste Europeu e Oceania é predominantemente de comportamento homossexual masculino (MSM) (WHO, 2009; BARAL S. *et al*, 2007; BASTOS F.I. *et al*, 2008; CACERES C.F. *et al*, 2008). A epidemia do HIV entre jovens masculinos homossexuais, particularmente por minorias étnicas, é a forma mais expansiva de contágio nos Estados Unidos (HALL H.I. *et al*, 2007; HALL H.I. *et al*, 2008). Similarmente, esta evidência ocorre em muitas outras regiões de elevação da epidemia em homossexuais masculinos (WHO, 2009; BARAL S *et al*, 2007; LU L. *et al*, 2008; WANG L *et al*, 2009; ZHANG D. *et al*, 2007) .

O maior índice de risco para MSM está na prática de intercurso anal, particularmente no homossexual de comportamento passivo. Dentro da população de MSM, jovens transsexuais possuem, particularmente, altos índices de incidência do HIV. O contexto para a epidemia do HIV em MSM é particularmente confundida e desafiada pela política e por outros fatores de uma sociedade, onde por exemplo a homossexualidade ainda é discriminada e altamente estigmatizada (OTTOSON D, 2007).

A transmissão do HIV entre os jovens Usuários de Drogas Intra-Venosas (UDIVs) é a modalidade predominante de infecção na maioria do leste europeu e algumas regiões da Ásia (MATHERS B.M. *et al*, 2008). Quando a transmissão em UDIV acontece em outras regiões, geralmente estas são em populações adultas (KISSIN D.M. *et al*, 2007).

A visão geral da epidemiologia do HIV entre os jovens e adultos, estabelece um contexto para a discussão de uma prevenção intervencionista entre eles (WILSON C.M. *et al*, 2010).

### **2.3. Resposta imune na infecção pelo HIV**

Um dos sinais mais precoces da infecção pelo HIV é a depleção em células T CD4+ prejudicando a variedade de funções destas células, incluindo a formação de colônias de linfócitos T, reações próprias entre os linfócitos, produção de interleucina-2 (IL-2) e expressão de seus receptores (ROSENBERG Z.F. *et al* 1989).

Resposta proliferativa de células T é diminuída em todos os estágios da AIDS, bem como a ocorrência de falhas à antígenos solúveis, seguidos pela perda desta resposta para aloantígenos e subseqüentemente, mitógenos durante a infecção do HIV (COOPER D.A. *et al*, 1988).

Alguns estudos sugerem que a deficiência na proliferação de células T é dependente das anormalidades de células apresentadoras de antígenos ou por alterações no processo de apresentação do antígeno causada por uma deficiência secundária da proliferação dos linfócitos T (MEYAARD L. *et al*, 1993).

### 2.3.1. Resposta imune celular

Em indivíduos saudáveis, a população de células T demonstra um excepcional controle homeostático, obedecendo a números e proporções das duas maiores populações funcionais de linfócitos T: células T CD8+, a qual apresenta como principal função, o combate à vírus que infectam células, e células T CD4+, que são imprescindíveis para ativação de outras células imunes (VRISEKOOOP N. *et al*, 2009).

Muitas populações de células imunológicas têm sido correlacionadas com ativações imune, incluindo células T regulatórias (Tregs), células dendríticas e linfócitos infiltrados do intestino. TRegs desenvolvem tolerância periférica e ativação de células imunológicas com atividade supressora. Alguns estudos demonstraram que em ausência de TRegs, ocorre aumento da especificidade do HIV em resposta das células T (WILLET B.J. *et al*, 1997; de PARSEVAL & ELDER J.H., 2001; RICHARDSON J. *et al*, 1999; WILLET B.J. *et al*, 1998), enquanto outros estudos mostraram aumento da ativação imune (BRELOT A. *et al*, 1999; PICARDI I. *et al*, 1997).

Em indivíduos infectados, a depleção e disfunção das células T CD4+ respondem pela maioria das complicações na AIDS. A perda destas células resulta de uma interação complexa entre o vírus e o sistema imune, processo visto como um fenômeno bifásico com uma depleção inicial maciça destes linfócitos em mucosa durante a infecção aguda do HIV (VEAZEY R.S. *et al*, 1998; KEWENIG S. *et al*, 1999), seguida por um baixo declínio na manutenção de seu quantitativo durante a infecção crônica (DOUEK D.C. *et al*, 2002).

Outra explicação para a depleção de linfócitos T CD4+ está relacionada à direta ou indireta indução da ativação imune, interrompendo a homeostasia destas células (VRISEKOOOP N. *et al*, 2009; DOUEK D.C. *et al*, 2003). De fato, o grau da ativação crônica é um bom preditor da progressão da doença (LENG Q. *et al*, 2001; ROUSSANOV B.V. *et al*, 2000).

Ativação imune induzida pelo HIV geram células alvo disponíveis para replicação viral, induzindo um *feedback* positivo para maior depleção de células T CD4+. (DOUEK D.C. *et al*, 2003; GROOSMAN Z. *et al*, 2002).

Células dendríticas plasmocitóides (pDCs) produtores de IFN tipo I são relatadas como fator para aumento da ativação de células T CD8+ e depleção progressiva de células T CD4+ (ROSENKILDE M.M. *et al*, 2004). Uma população de células T auxiliares denominadas células Th17, pode apresentar comprometimento na ativação imune durante a infecção pelo HIV (HATSE S. *et al*, 2003). Enquanto as perturbações sistêmicas no sistema imune são evidentes, outra depleção bem acentuada de células T ocorre na mucosa do intestino (CHABOT D.J. *et al*, 2003).

Muitas etapas na transdução de sinal dos receptores de células T (TCR, do inglês, *T cell receptor*) são perdidas, possivelmente por mudanças na composição dos lipídeos da superfície da membrana destas células senescentes. Em resposta à estimulação do HIV, linfócitos T CD4+ apresentam reduzida proliferação, baixa produção de IL-2 para Th1 e de IL-4 e IL-5 para células de memória em Th2 (AVELINDO-SILVA V.I. *et al*, 2011).

A homeostase e o volume de células T *naive* requeridas na manutenção da memória imunológica, tornam-se insustentável na infecção do HIV (HAZENBERG M.D. *et al*, 2000), principalmente pela exaustão de alguns clones de linfócitos T. Além disso, o comprimento telomérico nas células T CD4+ e CD8+ apresentam-se significativamente mais curto em pacientes HIV infectados (BESTILNY L.J. *et al*, 2000).

A idade do paciente também induz alterações em número, proporção e função nos linfócitos ativados e *naive*, como baixa expressão de CD27 e CD28 e diminuição na diversidade dos TCRs (HAYNES L. & MAUE A.C., 2009; PAWELEC G., 2009; DERHOVANESSIAN E. *et al*, 2009). Na infecção do HIV, linfócitos *naive* diminuem capacidade de ativação, produção de citocinas e diferenciação para subpopulações Th1 e Th2 (AW D. *et al*, 2007; HAYNES L. *et al*, 2003; HAYNES L. & MAUE A.C., 2009).

A involução tímica durante o envelhecimento do indivíduo resulta na incapacidade de reconstituição das células T CD4+ depletadas pela infecção do HIV (CASAU N.C., 2005; DOUEK D.C. *et al*, 1998) e diminuição na habilidade replicativa de linfócitos T

precursores (EFFROS R.B. *et al*, 2008). A sobrevivência de linfócitos é influenciada por citocinas como a interleucina 7 (IL-7) (KANG I. *et al*, 2004). O número de linfócitos de memória aumenta com a idade, mas estas células, em modelos animais, exibem uma capacidade diminuída de ativação, sinalização e proliferação (MILLER, R.A. *et al*, 1997; NEL A.E. & SLAUGHTER N., 2002).

A infecção pelo HIV também diminui populações de células T CD8+ pela indução da apoptose ou citotoxicidade direta e ainda prejudica a produção de perforinas e expressão de Fas ligante (FasL). A interação entre as moléculas de FasL e Fas induz a apoptose de células infectadas (SAHA K *et al*, 2001; PIAZZA P. *et al*, 2002).

Como todos os retrovírus e lentivírus, o HIV-1 precisa integrar-se no DNA da célula hospedeira e como consequência, a atividade do genoma viral integrado ou provírus é bastante influenciado pelo metabolismo e estado de ativação da célula hospedeira e a longevidade do provírus é diretamente relacionada pelo tempo de vida da célula que o contém. Em nenhum outro lugar, a atividade e longevidade proviral é mais evidente que nos reservatórios de células CD4+. Em células T ativadas, a replicação viral é rápida e eficiente (STEVENSON M., 2003).

A região LTR (do inglês, *Long Terminal Repeat*) que caracteriza o centro de controle da expressão gênica, contém sítios de ligação para fatores celulares que positivamente regulam a transcrição do HIV-1 e que estão abundantemente ativados em linfócitos T, monócitos e macrófagos (PERELSON A.S., 2002). Nestas células, o provírus pode permanecer em estado latente parecendo não expressá-lo. (SCHNITTMAN S.M. *et al*, 1989) e a expressão viral parece ser interrompida em nível transcricional (ADDAMS, M, 1994).

Um regulador negativo identificado durante a infecção do HIV é a imunoglobulina e molécula-3 contendo domínio de mucina (Tim-3, do inglês, *Immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3*) que foi inicialmente identificada como marcador de superfície celular na resposta Th1 (SANDER O. *et al*, 2007). Um ligante para Tim-3 denominado galecitina-9 foi demonstrado em ratos onde esta interação resulta na morte de células Th1 pelo aumento do fluxo de cálcio (HWANG S.S. *et al*, 1991).

O bloqueio de Tim-3 em ratos, resultou em hiperproliferação de células Th1, ilustrando a importância de Tim-3 na tolerância periférica (HUANG C.C. *et al*, 2005). Em



humanos, Tim-3 é expresso preferencialmente em células Th1 e constitutivamente em macrófagos e células dendríticas (LaROSA G.J. *et al*, 1990) estando relacionada também na regulação de células Th17 (BASMACIOGULLARI, S. *et al*, 2002) com propriedades inflamatórias e realizando um papel patológico nas doenças autoimunes (SUNDSTROM M.*et al*, 2008). A relação entre Tim-3 e células Th17 foi associada também na esclerose múltipla, inicialmente através da mediação de células Th1 e posteriormente no envolvimento de células Th17 (SUNDSTROM M. *et al*, 2008).

Estas descobertas implicam que o bloqueio de Tim-3, resulta numa produção aprimorada de IFN- $\gamma$  e IL-17 de células CD4+, sugerindo que Tim-3 regula negativamente citocinas Th1 e Th17 em células T humanas (BASMACIOGULLARI, S. *et al*, 2002). Então, o bloqueio de Tim-3 com a imunoglobulina Tim-3 solúvel, resulta na proliferação específica do HIV em células T CD4+ e CD8+. Em uma análise longitudinal de sete pacientes HIV positivos em terapia inicial de antiretroviral, quatro apresentaram diminuição na expressão de Tim-3 e células CD4+ e CD8+, enquanto três pacientes mantiveram altos níveis apesar da supressão viral (dePARSEVAL A.*et al*, 1997).

#### **2.4. Tropismo viral**

O HIV-1 infecta células que expressam dois receptores, sendo um principal, o CD4 e um co-receptor auxiliar, derivado da família de receptores de quimiocinas, CCR5 ou CXCR4 (BERGER E.A. *et al*, 1999). (FIGURA 2). Estes vírus entram na célula através de um evento de fusão de membrana independente de pH, e resulta no lançamento da partícula *core* ou nucleocapsídeo no citoplasma. Entretanto, estudos indicam que o HIV-1 pode realizar entrada e fusão da membrana pelo processo de endocitose (MIYAUCHI K *et al*,2009; DAECKE J. *et al*, 2005).

O sistema de quimiocinas é altamente redundante, o qual cada receptor é capaz de ligar-se a múltiplos ligantes e cada ligante a múltiplos receptores aleatoriamente. Os receptores de quimiocinas CCR2b, CCR3, CCR7, CCR8, STRL33/BONZO e gpr15/BOB podem mediar a infecção das células por alguns vírus (EDINGER A.L. *et al*, 1998). O uso destes co-receptores alternativos pelo HIV são limitados sendo os co-

receptores CCR5 e CXCR4 os principais utilizados. Vírus que utilizam CCR5 como co-fator de entrada são referidos como vírus R5, enquanto os que utilizam CXCR4 são referidos como vírus X4. Vírus que podem utilizar ambos CCR5 e CXCR4 são denominados de tropismo duplo ou *Dual tropic* ou vírus R5X4 (BERGER E.A. *et al*, 1998).

O gene do envelope codifica uma proteína que massa molecular de 160 kDa quando completamente glicosilada e é dividida em duas regiões: O processamento da proteína no aparelho de Golgi resulta em clivagem da proteína gp160 por membros da família das furinas de endoproteases, em subunidades gp120 e gp41 (MOULARD M. *et al*, 2000). O gene é traduzido com um tamanho total de uma proteína precursora gp160, seguindo de formação e glicosilação da estrutura secundária no retículo endoplasmático (BISCONE M. *et al*, 2006). Monômeros gp160 são oligomerizados em trímeros (EARL P.L. *et al*, 2009) via interação não covalente das subunidades gp41 (COLMAN P.M. *et al*, 2003).

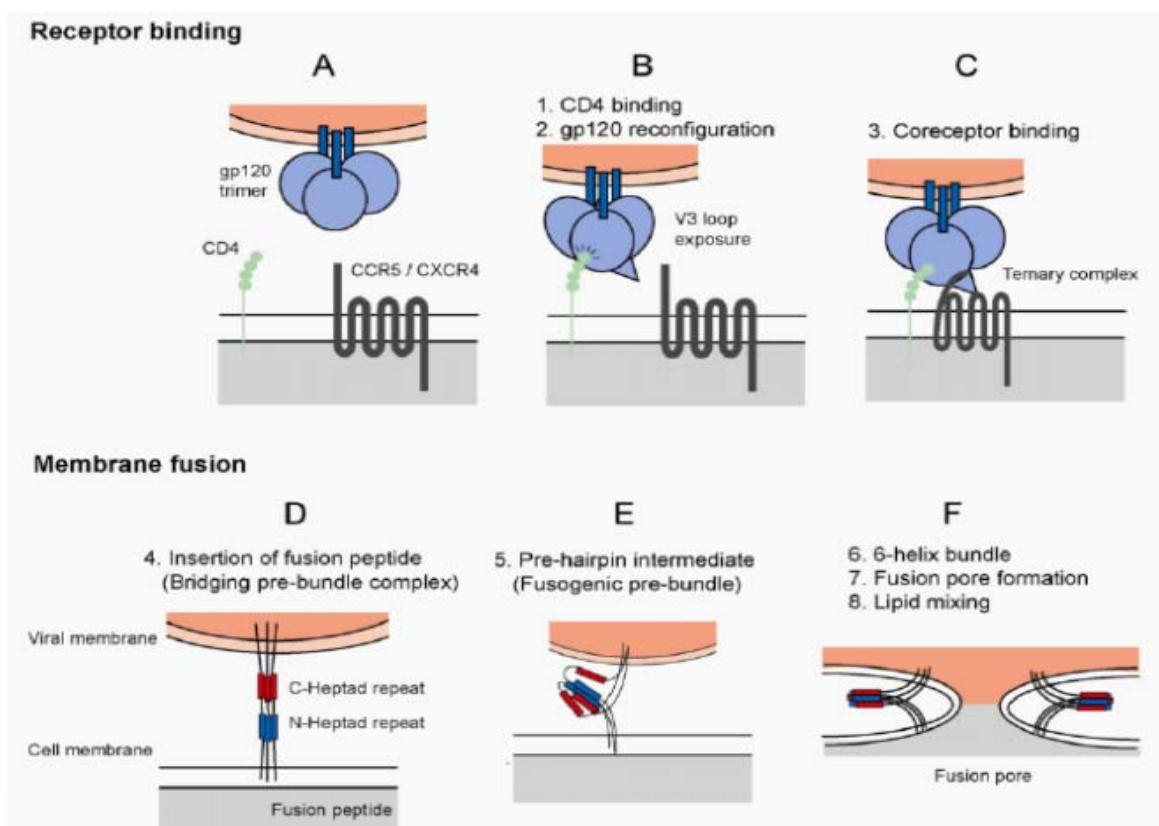


Figura 2. Mecanismo de entrada do VIH na célula hospedeira sendo mediada pela glicoproteína do envelope.

Quando interage com uma nova célula alvo, a gp120 inicialmente realiza contato com a região N-terminal do CD4 através de interação com o sítio de ligação conservado (ZHOU T. *et al*, 2007) (FIGURA 2B). Interações com CD4 resultam em considerável reconfiguração da molécula da gp120 expondo o sítio de ligação altamente conservado do co-receptor (BIENIASZ P.D. *et al*, 1997; KWONG P.D. *et al*, 1998; RIZZUTO C. *et al*, 2000) (FIGURA 2C). O sítio de ligação do co-receptor interage com a região N-terminal do co-receptor, sendo estes CCR5 ou CXCR4. (FIGURA 2C)

Outras interações entre os co-receptores são mediadas por aminoácidos da alça V3. Alterações conformacionais na glicoproteína do envelope expõem o peptídeo de fusão, uma sequência de 15 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos localizados na região N-terminal da gp41, inserindo-se internamente e desestabilizando a membrana da célula hospedeira (ZHOU T. *et al*, 2007). Neste estágio, a gp41 integra o envelope viral e a membrana do hospedeiro (FIGURA 2D). Entretanto outras transições estruturais na gp41 são necessárias para promover a mudança significativa da energia livre requerida para o direcionamento da fusão da membrana (MELIKYAN G.B. *et al*, 2000).

Anteriormente à fusão, a gp41 volta-se sobre si mesma em forma de gancho, função pela qual realiza uma proximidade do peptídeo de fusão associando com a membrana celular e se integrando à membrana viral (FIGURA 2E). Este processo é mediado por duas regiões helicoidais de domínio externo da gp41 denominadas HR1 e HR2 (CHAMBERS P. *et al*, 1990). A região N-terminal ou HR1 e a região C-terminal ou HR2, formam estrutura hexahélice, no momento em que o domínio HR2 antiparalelo liga-se à estrutura de tripla hélice dupla espiralada do domínio de HR1, resultando na interação do peptídeo de fusão e domínios transmembrânicos na mesma região final da molécula (CHAN D.C. *et al*, 1997). Esta reorientação e lançamento de energia livre direcionam para a fusão entre as membranas do vírus e da célula.

O conceito de inibição da replicação do HIV-1 pela prevenção da entrada do vírus nas células hospedeiras tem sido contemplado desde a primeira identificação ao principal receptor, o CD4. Abordagens iniciais sugeriram o uso de anticorpos monoclonais para o CD4 bloquear a ligação do vírus. Esta idéia foi limitada devido à importância do CD4 nas funções imunológicas básicas. Em seguida, o principal avanço na inibição da

entrada do HIV-1, foi o desenvolvimento de uma forma solúvel de CD4 (sCD4), a qual poderia inibir a replicação do HIV-1 *in vitro* e *in vivo* (SCHOOLEY R.T. *et al*, 1990), bem como solubilizar uma imunoglobulina de fusão para CD4 (TRAUNECKER A. *et al*, 1989).

Entretanto, algumas cepas foram significativamente mais sensíveis nesta neutralização aos receptores CD4 do que em isolados primários do HIV-1. Essas diferenças foram baseadas na afinidade e nos níveis de associação com o CD4 da estrutura quaternária do envelope protéico (IVEY-ROYLE M. *et al*, 1991). Em alguns casos, o tratamento com sCD4 resultou em avanço da infecção (BARLETT J.G. *et al*, 2009). A administração terapêutica de sCD4 não teve efeito na viremia ou na doença (COLLIER A.C. *et al*, 1995), entretanto, a molécula sCD4 constitui uma ferramenta para o grande entendimento do processo de entrada do HIV-1.

A descoberta dos co-receptores que medeiam a entrada do HIV-1 facilitou o entendimento da possibilidade da replicação do vírus ser bloqueada por algo desconhecido, derivados de leucócitos e fatores supressores solúveis (BRINCHMANN J.E. *et al*, 1990). O fator solúvel derivado de células T CD8+ fora identificado como co-receptores de quimiocinas RANTES (do inglês, *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*) (CCL5), MIP-1 $\alpha$  (do inglês, *Macrophage inflammatory proteins*)(CCL3) e MIP-1 $\beta$  (CCL4) (COCCHI F. *et al*, 1995).

Quimiocinas são pequenas moléculas de sinalização parácrinas que estão principalmente envolvidas na resposta inflamatória. Estas estão frequentemente divididas em quatro classes principais e sua nomenclatura é baseada no número e orientação do motivo de cisteína N-terminal (MURPHY P.M. *et al*, 2000). Quimiocinas “C” possuem um resíduo de cisteína simples. Quimiocinas C-C, C-X-C e C-X3-C possuem cada uma, dois resíduos de cisteína separadas por nenhuma, um ou três outros resíduos, respectivamente. Apenas as quimiocinas C-C e C-X-C são fatores principais na infecção do HIV-1 (LOBRITZ M.A. *et al*, 2010).

O co-fator “fusina” foi identificado na expressão de um repertório de cDNA, derivado de células que permitiam vírus T-trópicos contra linhagens de células que não permitiam (FENG Y. *et al*, 1996). Este receptor foi posteriormente identificado como

receptor de quimiocina 4 C-XC (CXCR4) e este ligante pode inibir a replicação do HIV-1 *in vitro* (OBERLIN F. *et al*, 1996).

Pouco tempo depois, os receptores de quimiocinas 5 C-C (CCR5), foram identificados como o principal co-fator de entrada de M-trópicos, dos isolados NSI HIV-1 (HILL CM *et al*, 1997). Os receptores de quimiocinas são membros de uma família de sete proteínas transmembrânicas G. Eles são definidos pelo seu acoplamento à classe G1 de proteínas G sensíveis à toxina da coqueluche, pela expressão em leucócitos, pela função de sinalização quimiotática e estão primariamente envolvidos em ativação e migração direcional em leucócitos (LOBRITZ M.A. *et al*, 2010).

O tropismo CCR5 é característico de isolados virais obtidos de pacientes que persistem assintomáticos durante a doença e são os principais componentes do repertório de vírus responsáveis por novas infecções. Ao longo da infecção, a alternância para tropismo CXCR4 ou isolados de tropismo duplo está geralmente associado com rápida depleção de células T CD4+ e progressão para a AIDS (CONNOR R.I. *et al*, 1997).

Existe um grupo de indivíduos de alto risco para a infecção do HIV-1, porém que continua apresentando soronegatividade, apesar de múltiplas oportunidades para transmissão do vírus. Análises genéticas dessas *cohorts* revelaram que este grupo possui homozigose para uma deleção de 32 pares de bases em CCR5 e estas células T CD4+ foram resistentes contra a infecção pelos vírus R5 *ex vivo* (LOBRITZ M.A. *et al*, 2010).

Esta deleção conhecida como delta-32 ( $\Delta 32$ ) resulta em um receptor alterado que não é expresso na superfície da célula. Este comportamento  $\Delta 32$  está presente em populações caucasianas com uma média de 20% de heterozigotos para a mutação ( $\Delta 32/wt$ ) e 1% em homozigose ( $\Delta 32/ \Delta 32$ ) (ARHEL N.J. *et al*, 2006). Enquanto indivíduos homozigotos  $\Delta 32$  são altamente resistentes para contraírem infecção pelo HIV-1, os indivíduos heterozigotos possuem um curso mais prolongado da infecção e longos intervalos de tempo antes da progressão da AIDS.

A origem da deleção  $\Delta 32$  em humanos ou evolução em primatas é desconhecida, mas o impacto deste polimorfismo é dependente do patógeno. A mutação  $\Delta 32$  tem sido demonstrada com fator protetor contra persistência da infecção pelo vírus da hepatite B (THIO C.L. *et al*, 2007). Diferentemente, heterozigose e homozigose para deleção  $\Delta 32$  CCR5, são de alto risco para progressão rápida e aguda na infecção pelo vírus do Oeste do Nilo, causador da febre do Nilo (GLASS W.C. *et al*, 2006).

Polimorfismos em nucleotídeos na região promotora de CCR5, também está associado com diferentes progressões da doença. Especificamente, indivíduos que possuem polimorfismo em adenina (-2459A/A) tem tido uma progressão para a AIDS mais rápida do que indivíduos homozigotos para o alelo da guanina (-2459G/G) (OMETTO L *et al*, 2001). Notavelmente, indivíduos que apresentam estes polimorfismos nos receptores, perdem algum outro fenótipo biológico além da resistência para a infecção do HIV ou a lenta progressão para a AIDS, indicando um potencial de entrada através do co-receptor CCR5, como uma viável intervenção farmacológica (LOBRITZ M.A. *et al*, 2010).

A glicoproteína de envelope, quando não ligada ao receptor CD4, não realiza a conformação de interação com este receptor. Um grupo de vírus HIV-2 e isolados de Vírus da Imunodeficiência em Símios (SIV) podem ligar-se independentemente do receptor CD4, o que pode sugerir que os co-receptores de quimiocinas são receptores ancestrais de linhagens iniciais de vírus que deram ascensão para o SIV (LOBRITZ M.A. *et al*, 2010).

O uso do CD4 está sendo utilizado como adaptação para inibir o sítio de ligação conservado do co-receptor para o reconhecimento de uma resposta imune humoral. Quando a Gp120 liga-se ao CD4, rearranjos estruturais na glicoproteína de envelope levam a exposição da alça V3 e a formação de uma estrutura de ligação. Esta alça V3 é um domínio imunodominante do envelope do HIV-1 que não é exposto na maioria dos isolados primários, portanto, não sendo considerado um determinante de neutralização principal (HARTLEY O. *et al*, 2010).

A alça V3 é estruturalmente dividida em três subseções: Uma base formada por um dissulfeto em cooperação aproximada com o núcleo da gp120; o tronco, o qual é uma região de ligação flexível entre a base e a porção superior e a porção superior ou

coroa, que contém o motivo em formato de dupla hélice definida por uma sequência G-P-G-X e se acredita ser a região de interação crítica com a alça extracelular de CCR5. V3 é o determinante crítico do co-receptor para o tropismo. Apenas a troca de dois aminoácidos na alça V3 pode alterar a especificidade de CCR5 e CXCR4 (HARTLEY O. *et al*, 2010).

Modificações na alça V3 têm sido especificamente associadas com alterações na susceptibilidade para inibidores de entrada. As regiões V1 e V2 da alça V3 da gp120 têm mostrado atividade direta e influência na afinidade ao co-receptor (NABATOV A.A. *et al*, 2004). O modelo atual de formação do complexo gp120/CD4/CCR5 favorece múltiplas interações entre gp120 e CCR5. Estudos usando deleções e receptores quiméricos sugerem que a porção N-terminal de CCR5 é extremamente importante para a entrada do HIV-1 (BIENIASZ P.D. *et al*, 1997). Uma mutagênese direcionada ao sítio da região V3, indicou que dois domínios na gp120 foram essenciais para a interação com CCR5. A região superior desta glicoproteína interage com a região extracelular de CCR5 (CORMIER *et al*, 2002). Com isto, anticorpos monoclonais que reconhecem CCR5 podem inibir a entrada do HIV-1.

Modificações pós-translacionais em CCR5 direcionam um papel significativo na atividade do co-receptor. A porção N-terminal sofre glicosilação e sulfatação de tirosina. A inibição da sulfatação da tirosina desenvolve uma diminuição na ligação de CCR5 pela gp120 e conseqüente entrada do HIV-1 (FARZAN M. *et al*, 1999). Mutagênese ou deleção no domínio carboxi-terminal de CCR5, o qual medeia processos de endocitoses, revelou não ser essencial para a entrada do vírus (LOBRITZ M.A. *et al*, 2010).

Estados conformacionais distintos de CCR5 em atividade ou inatividade são observados utilizando as propriedades de ligação com vários anticorpos (LEE B. *et al*, 1999; BLANPAIN C. *et al*, 2002). Este estímulo pode estabilizar o receptor em configurações antigênicas particulares. A estabilização pode ocorrer através da associação com proteínas envolvidas em tradução de sinais. Alguns estudos sugerem que CCR5 dimeriza através das interações na primeira região transmembrânica e que a forma dimerizada desta molécula não permite a entrada do HIV-1 (HERNANZ-FALCON P. *et al*, 2004).

Dimerização de CCR5 tem sido sugerida como ligante dependente, onde estudos demonstraram oligomerização independente ao ligante de CCR5 (ISSAFRAS H. *et al*, 2002). O papel da heterogeneidade conformacional de CCR5 na entrada do HIV-1 e interações de co-receptores ainda não está bem esclarecido. É desconhecido ainda, se o envelope do HIV-1 pode interagir com todos ou apenas um grupo de isômeros conformacionais disponíveis de CCR5 (LOBRITZ M.A. *et al*, 2010).

## 2.5. Tratamento

Atualmente, a terapia antiretroviral busca reduzir a carga viral para níveis indetectáveis, determinadas pelas técnicas laboratoriais (carga viral a partir de mensuração de RNA do HIV com 50, 40 ou 20 cópias/ml de plasma), objetivando alcançar uma recomposição imunológica melhorada e redução da progressão clínica da doença e mortalidade pela infecção do HIV-1 (HAMERS S.M. *et al*, 2008). Com a disponibilidade de drogas estes objetivos têm sido amplamente atingidos. Dados recentes sugerem que pacientes em terapia antiretroviral podem sofrer e morrer por complicações não diretamente relacionadas à supressão virológica e ao quantitativo de recuperação de células T CD4+ (MORENO S. *et al*, 2010).

O sucesso da terapia antiretroviral vai além da obtenção da carga viral indetectável. Ativação imunológica e inflamatória persistente, provavelmente secundária à replicação viral, pode estar relacionada aos chamados eventos não relacionados à AIDS, incluindo desordens cardiovasculares, doenças hepáticas e renais, cânceres dentre outros (MONFORTE A. *et al*, 2008).

Atualmente, os métodos utilizados para avaliar a resposta da terapia antiretroviral são contagens de células T CD4+ e mensurações de carga viral plasmática. Estes parâmetros têm sido utilizados para prever benefício clínico, desenvolvimento de resistência e redução de transmissão. Métodos de detecção de carga viral plasmática extremamente sensíveis, avaliando níveis entre 1 a 5 cópias/ml têm sido utilizados no contexto de pesquisa (PALMER S., 2003).

Entretanto não estão evidentes quais benefícios estes níveis de detecção poderiam prover na prática clínica. Na detecção atual, os limiares conseguem prever o não



desenvolvimento de resistência (KIEFFER T.L. *et al*, 2004) e estão associadas com um baixo ou insignificante risco de transmissão (QUINN T.C. *et al*, 2000), bem como adequar o restabelecimento imunológico na maioria dos pacientes e a redução da progressão clínica na infecção do HIV.

Não está bem esclarecido se uma detecção mais sensível da carga viral plasmática poderia melhorar o reflexo da ausência da replicação viral associada a uma redução da atividade inflamatória, ativação imunológica e suas conseqüências clínicas, bem como uma diminuição da persistência viral em reservatórios celulares (MORENO S. *et al*, 2011).

Está determinado que pacientes em AIDS sintomáticos e com contagens de células CD4+ abaixo de 500 ou 350 células/mm<sup>3</sup> de sangue devam entrar em terapia antiretroviral. Entretanto a introdução de terapia em pacientes assintomáticos e pacientes cronicamente infectados não estão bem esclarecidas, embora exista um aumento de evidências para início de terapia (GESIDA, 2009).

Um significativo número de pacientes, cerca de 30 a 50%, atinge tardiamente o início da resposta contra a infecção do HIV-1 (GIRARDI E. *et al*, 2007). Esta resposta tardia está diretamente associada com aumento da morbidade e mortalidade, aumento do risco da transmissão do HIV e resposta subótima à terapia (MARKS G. *et al*, 2006). Ainda, pode estar associada à conseqüência de um diagnóstico tardio e muitos estudos epidemiológicos têm identificado que alguns grupos populacionais estão mais ligados a este tipo de diagnóstico (FAKOYA I. *et al*, 2008). Por outro lado, é estimado que 30% dos indivíduos HIV infectados não são diagnosticados devido à restrições nas testagens laboratoriais (HAMERS F.F. & PHILLIPS A.N., 2008).

### **2.7.1. Inibidores de Fusão**

Atualmente a entrada do vírus representa um dos alvos mais atrativos na pesquisa de novas drogas para o tratamento da infecção pelo HIV. Os avanços do conhecimento da base molecular destes mecanismos envolvidos no processo de entrada promovem desenhos moleculares para o bloqueio de cada tipo de entrada. Como mencionado anteriormente, os passos para esta entrada viral incluem a ligação da gp120 ao

receptor das células T CD4+, ligação da gp120 aos co-receptores CCR5 e CXCR4 e a fusão das membranas celulares e virais (BRIZ V. *et al*, 2006).

Os inibidores de entrada são antiretrovirais que impedem a ligação desta glicoproteína aos receptores e co-receptores celulares. Estes compostos provêm beneficiar um crescente número de pacientes infectados pelo HIV que desenvolvem resistência pelos inibidores de transcriptase reversa e inibidores de protease disponíveis. O tratamento de resistência é sempre presente na terapêutica do HIV e sem dúvida, o vírus poderá desenvolver também, resistência aos inibidores de entrada (POVEDA E. *et al*, 2009).

Como dito anteriormente, o receptor CD4 liga-se sobre os domínios internos e externos da gp120 do HIV. Esta ligação cria um sítio bem protegido e conservado entre as diferentes cepas do HIV, não contendo sítios de glicosilação (MADANI N. *et al*, 2004). Estas características únicas estimulam para uma terapêutica na pesquisa de novos agentes que podem especificamente ligar e bloquear o passo inicial da infecção pelo vírus (BRIZ V. *et al*, 2006).

Muitos estudos *in vitro* têm sido testados para descrever os mecanismos de ação destes inibidores, os quais ainda não estão totalmente esclarecidos. Devido às ações de todas estas moléculas agirem em diferentes regiões, é esperado que estes mecanismos de ação, também diferirão. Por conseqüência, resistências podem ser desenvolvidas em outras diferentes sinalizações e sem resistência cruzada entre estes compostos (MADANI N. *et al*, 2004).

Estudos *in vitro* relatam que os aminoácidos da gp120 envolvidos na resistência estão relacionados com o sítio Phe-43 e muitas trocas nos resíduos da gp120 como Trp-112, Thr-257, Ser-375, Phe-382, Met-426, Met-434 e Met-475 resultam em escapes de cepas do HIV aos inibidores (MADANI N. *et al*, 2004; GUO Q *et al*, 2003).

Forças eletrostáticas impulsionam prioritariamente a ligação entre CD4 e gp120, com carga positiva na porção final primária do CD4 atraído pela carga negativa na cavidade da gp120 do vírus. Além disso, força de van der Waals e pontes de hidrogênios ajudam a estabilizar a interação entre estas duas estruturas (MADANI N. *et al*, 2004). A fenilalanina do CD4 é apenas um resíduo que liga a este sítio, sendo esta denominada de sítio Phe-43. Este resíduo é bastante significativo nesta interação porque é

estimado que sozinho, este seja responsável por cerca de 23% da energia total da interação CD4/gp120 (KWONG P. *et al*, 2000).

O *core* ou núcleo conservado da gp120 sofre alterações conformacionais, modificando de um estado rígido para um estado flexível, seguida da subsequente interação com os co-receptores de quimiocinas (MYSZKA D. *et al*, 2000). O sítio Phe-43 na gp120 do HIV foi inicialmente postulada como potencial alvo para pequenas moléculas que poderiam ligar e bloquear a entrada do HIV (LANDOVITZ R.J.. *et al*, 2009).

A ligação do complexo CD4-gp120 dá-se, como mencionado anteriormente, a partir da alça V3, enquanto que outras regiões utilizam V1/V2 (CORMIER E.& DRAGIC T., 2002). A sequência de aminoácidos da alça V3 determina o uso dos co-receptores pelo HIV (BENNET D.E. *et al*, 2009). A ligação do complexo gp120-co-receptor no domínio da região N-terminal do vírus R5 e na segunda alça extracelular são essenciais para o reconhecimento da atividade dos inibidores (DRAGIC.T. *et al*, 1998), considerando, no entanto, que apenas a segunda alça extracelular para cepas X4 parece ser bastante crítica (DORR P.M.. *et al*, 2005).

É interessante ainda notar que reduzindo a conservação da sequência nas proximidades das regiões variáveis V1/V2, indiretamente influenciam a susceptibilidade das drogas. A variabilidade natural da gp120 nos diferentes subtipos de HIV-1 pode interferir em diferenças na susceptibilidade destes compostos (MOORE P. *et al*, 2004).

## **2.5.2. Inibidores dos co-receptores de quimiocinas CCR5**

### **2.5.2.1 Anticorpos anti-CCR5**

O soro humano, normalmente, contém anticorpos IgG, IgM e IgA naturais, gerados independente de alguma exposição à antígenos estranhos ou vacinas e produzidos ao curso de infecções ou doenças autoimunes. A maioria destes anticorpos naturais são polirreativos, aptos a se ligarem a vários antígenos e são muitas vezes autorreativos, capazes de reconhecerem alguns antígenos do próprio hospedeiro. Estes anticorpos são produzidos por grupos de células B denominados B1, sem a intervenção de

células T que, por conseguinte, pertence à resposta inata do sistema imunológico (ESLAHPAZIR J. *et al*, 2008).

As células B1 são encontradas em cavidades pleurais e peritoniais, de onde provém a primeira linhagem de defesa através de anticorpos que se ligam a antígenos, polissacarídes e motivos de repetição, que são tipicamente encontrados em paredes de células microbióticas e macromoléculas (ALLMAN D. & PILLAI D., 2008).

Os sistemas de defesas inatos são importantes para proteção cutânea e especialmente em revestimentos de mucosa, que são limites físicos do hospedeiro com o ambiente compostos por IgM e IgA naturais e polirreativos, produzidos por células B independentes de células T, controlando auto-antígenos, antígenos exógenos e micróbios. Os anticorpos específicos e monorreativos produzidos pelas células B2 do pelo sistema imunológico adaptativo são produzidos tardiamente após a ativação e recrutamento das células T (QUAN C.P., 1997).

Todas as funções das células B1 e suas atividades ainda não estão devidamente esclarecidas, especialmente na imunologia humana e estão atualmente em constante linha de investigação. De acordo com estudos de transplante de células realizadas em camundongos transgênicos, populações de células B1 podem dividir-se em dois outros grupos de células, B-1a e B-1b, o qual apresenta diferentes fenótipos, origens e funções. Células tronco fetais B-1a CD5+, podem replicar-se, enquanto que as células B-1b CD5- derivam da medula óssea, o que é comum às células B2, que constitui a maioria da população de células B (ALTER G. *et al*, 2007 ).Entretanto, recentes experimentos têm observado o desenvolvimento de ambos os subgrupos de células B-1 nas linhagens de medula óssea (ESPLIN B.L. *et al*, 2009).

A maioria das células B1 possui uma reduzida diversidade e afinidade aos receptores de células B (BCRs), devido à falta de recombinações somáticas e da fraca atividade de edição do receptor, característica esta que aumenta com a idade do indivíduo (HOLODICK N.E. *et al*, 2009).

A maioria dos anticorpos naturais são IgM (RACINE R. & WINSLOW G.M. 2009), mas as células B1 possuem a capacidade de troca nas classes de imunoglobulinas e esta descoberta foi recentemente descrita (ZHONG X. *et al*, 2009). Células B1 são ativadas em resposta a estimulação de antígenos (WHITMORE A.C. *et al*, 2004) e pode

diretamente produzir anticorpos sem a intervenção de células T auxiliares, enquanto que células B-1b podem fazer parte do sistema imunológico adaptativo provendo um tipo de células de memória IgM especializadas (ALUGUPALLI K.R. *et al*, 2004).

Muitas funções têm sido propostas para anticorpos naturais, incluindo o papel da primeira linha de defesa contra infecções, interferências na atividade de apoptose e um papel regulador na manutenção da homeostasia imune (DUAN B. & MOREL L., 2006). Não surpreendentemente, grupos de imunoglobulinas intravenosas de doadores saudáveis, demonstraram conter anticorpos específicos contra muitas moléculas de superfícies celulares como CD4, CD5, receptores de citocinas, motivos de adesão e CD95 (receptor Fas) (BOUHLAL H. *et al*, 2001).

Autoanticorpos reativos naturais que reconhecem CCR5 têm sido isolados de grupos de imunoglobulinas de doadores hígidos (BOUHLAL H. *et al*, 2005). O papel de respostas semelhantes, geradas na ausência das doenças autoimunes, é ainda amplamente debatido, onde anticorpos para CCR5 e outros receptores e mediadores imunes foram supostos por se envolverem na manutenção e homeostasia imunológica. Como exemplo, anticorpos anti-CCR5 poderiam limitar a migração de células pró-inflamatórias CCR5+, como macrófagos, células dendríticas, CTLs e linfócitos Th1, em direção aos sítios inflamatórios liberando CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1alfa ou CCL4/MIP-1 beta para limitar efeitos excessivos e prejudiciais da inflamação (TOMARAS G.D *et al*, 2008).

Mais importante, anticorpos anti-CCR5 podem demonstrar propriedades bloqueadoras ao HIV (BOUHLAL H. *et al*, 2001). Anticorpos anti-CCR5 também podem ser encontrados em indivíduos homocigotos para deleção de CCR5 ( $\Delta 32$ ) após repetidas exposições a células CCR5+ de parceiros através da atividade sexual (BOUHLAL H *et al*, 2005). Este achado não é surpreendente desde que imunizações alogênicas têm sido mostradas para induzir anticorpos anti-CCR5 (GRENE E. *et al*, 2000).

Diferentes tipos de anticorpos anti-CCR5 têm sido isolados de indivíduos infectados pelo HIV e de indivíduos expostos, soronegativos a este vírus (ESN). A maioria dos anticorpos anti-CCR5 reconhecem a região N-terminal e especialmente a segunda alça extracelular do receptor, esta que é a região imunodominante envolvida na

ligação de quimiocinas na infecção do HIV (ESLAHPAZIR J. *et al*, 2008; BOUHLAL H. *et al*, 2001).

De acordo com estudos, o uso de anticorpos monoclonais anti-CCR5, alguns destes com dupla especificidade para ligação das quimiocinas, bloqueiam o encaixe do HIV e mais significativamente, previne a fusão entre a célula e o vírus (BLANPAIN C. *et al*, 2002). Um grupo especial destes anticorpos reconhecem a primeira alça externa do receptor CCR5, um domínio não envolvido na ligação direta do HIV (LOPALCO L., 2010).

Anticorpos anti-CCR5 têm sido detectados no soro e nas secreções de mucosa de indivíduos expostos, mas que são HIV negativos e em alguns pacientes HIV positivos, tanto em homens quanto em mulheres (GREEN E. *et al*, 2001). Entretanto, achados de algumas *cohorts*, incluindo subpopulações de progressores do HIV e não progressores de longo prazo suportam a hipótese de que domínios primários de IgG e IgA podem estar envolvidos na proteção ou controle da infecção do HIV (LOPALCO L. *et al*, 2000).

#### **2.5.2.2. Inibidores de CCR5**

Pequenas moléculas de antagonista CCR5 são as mais recentes classes de drogas que bloqueiam a entrada do HIV nas células alvos, o qual o primeiro membro desta classe, o Maraviroc (MVC), está em uso para tratamento. Estas drogas ligam-se a uma região hidrofóbica formada por hélices transmembranares de CCR5, induzindo a mudança conformacional na alça extracelular deste receptor (KONDRU R. *et al*, 2008).

Esta alteração conformacional pode variar com diferentes drogas, como evidenciada por ligações diferenciadas de quimiocinas, perfis de resistência do HIV e bloqueio da habilidade do vírus por uso da ligação ao co-receptor de entrada CCR5 (WATSON C. *et al*, 2005).

Assim como observado com outros agentes antiretrovirais, o HIV pode desenvolver resistência aos antagonistas de CCR5. Um sinal pelo qual este vírus pode realizar este processo é a via de mutações nas proteínas do envelope viral (Env) que ativam o

reconhecimento da ligação conformacional das drogas ao co-receptor (ANASTASSOPOULOU C.G. *et al*, 2009).

Determinantes virais de resistência estão localizadas na alça V3 da gp120 ( BERRO R. *et al*, 2009), o que já era esperado, pois a base da região da alça V3 interage com a tirosina sulfatada-O na porção N-terminal de CCR5, quanto que a parte superior de V3 realiza o contato com a região primária do receptor (HUANG C. *et al*, 2007).

A resistência viral a um antagonista CCR5, comumente resulta em resistência cruzada a outras drogas desta classe, embora esta informação não se torne via de regra (TILTON J.C. *et al*, 2010). Um número de vírus resistentes aos antagonistas de CCR5 tem demonstrado um aumento na dependência do domínio da região N-terminal deste co-receptor (PFAFF J. *et al*, 2010), o qual não são amplamente afetados pela ligação das drogas e podem estimular vírus a tolerarem drogas que induzem alterações conformacionais na região primária de ligação. Em contraste, muitos vírus bem caracterizados, têm sido envolvidos em resistência aos antagonistas de CCR5 *in vitro* (TILTON J.C., *et al*, 2010).

O HIV pode ainda desenvolver resistência aos antagonistas de CCR5, utilizando o co-receptor CXCR4 para entrada e se adaptando, por mudança conformacional, ao reconhecimento da região ligante da droga antagonista de CCR5 (PFAFF J. *et al*, 2010).

O tratamento de pacientes com o antagonista Maraviroc, muitas vezes resultam em falha virológica, devido à emergência do vírus em utilizar CXCR4 com o co-receptor de entrada (GULICK R.M. *et al*, 2008). Em outros casos, vírus que se replicam na presença de antagonistas CCR5 ambos *in vitro* e *in vivo* tem desenvolvido resistência por adquirirem habilidade para utilizar a região conformacional ligante das drogas do CCR5 (BABA M. *et al*, 2007).

Alguns vírus apresentam resistências cruzadas para múltiplos antagonistas de CCR5, onde os resistentes aos MVC, por exemplo, apresentam também sensibilidade de resistência a outros antagonistas de CCR5. Estas resistências indicam um grau variável da plasticidade conformacional ao reconhecimento dos co-receptores CCR5 (TILTON J.C. *et al*, 2010).

Vírus que possuem tropismo duplo (R5X4) representam eficientemente a capacidade de utilização de ambos os co-receptores para entrada na célula, implicando numa ampla variedade nas sequências dos domínios externos a estes co-receptores. Ainda, a interação do co-receptor à região Env do vírus, envolvem pelo menos duas regiões em Env e duas regiões nos domínios dos co-receptores (HUANG J. *et al*, 2008).

A pequena molécula dos antagonistas de CCR5 não pode agir reduzindo a expressão de superfície de CCR5, mas ao invés disso, podem ligar-se a região hidrofóbica com a hélice transmembrânica do co-receptor e induzindo as trocas conformacionais que previnem a utilização dos receptores de entrada pelo HIV (DRAGIC T. *et al*, 1998; MAEDA K. *et al*, 2006). O modo como os antagonistas de CCR5 alteram a conformação do co-receptor é evidenciado por diferentes efeitos de várias drogas nas quimiocinas e anticorpos de ligação ao CCR5 (SHEN R.. *et al*, 2011; WATSON C. *et al*, 2005).

### **2.5.3. Inibidores dos co-receptores de quimiocinas CXCR4**

Vírus que possuem tropismo ao CCR5 são geralmente associados com a fase inicial de infecção do HIV-1. Esta seletividade aparente ao co-receptor, entretanto, pode ser relatada pelos altos níveis da expressão de CCR5 nas células alvo nas proximidades da região genital ou na mucosa retal (LEE B. *et al*, 1999). Estes tecidos também expressam relativamente, altos níveis de ligantes naturais ao receptor do fator celular derivado do estroma (SDF-1), com o qual podem ligar-se ao co-receptor CXCR4 bloqueando a interação com cepas de vírus X4 (VERANI A. & SIRONI F.,2002)..

Durante a infecção da AIDS, formas variantes do vírus podem desenvolver habilidade para utilizar ambos co-receptores, como mencionado anteriormente ou utilizar apenas um deles. A infecção pode progredir na ausência de uma variante viral com tropismo X4, entretanto o aparecimento deste comportamento está fortemente associado com a progressão da doença acelerada e o conseqüente declínio das células T CD4. Ainda, acredita-se que variantes X4 possuem alta virulência, onde 40% dos pacientes infectados pelo HIV com desenvolvimento da AIDS apresentam estas cepas (SCOTTON C.J. *et al*, 2002).



Moléculas seletivas incluindo AMD3100 (HENDRIX C. *et al*, 2004), AMD11070 (MOYLE G. *et al*, 2009) e KRH-3955 (MURAKAMI T. *et al*, 2009) que bloqueiam a interação de CXCR4 com a gp120 do VIH-1 confirmam que antagonistas de CXCR4 podem também bloquear a infecção pelo vírus, abrindo então um aumento na oportunidade para a intervenção terapêutica nesta área.

A virulência natural das cepas X4 de VIH-1 deve sugerir que estas terapias devam ser utilizadas como parte de uma combinação de drogas para inibir a progressão da doença (JENKISON S. *et al*, 2005). Terapias de bloqueio de entrada do vírus nas células do hospedeiro têm sido demonstradas como uma boa opção clínica, onde a inibição pelos antagonistas de CCR5, por exemplo, produz uma significativa diminuição da carga viral nos pacientes (DORR P. *et al*, 2005).

Estudos com antagonistas de CXCR4 são relatados na literatura. O AMD3100 foi inicialmente direcionado para o bloqueio da replicação viral do HIV-1 pela prevenção da entrada do vírus pela via do co-receptor CXCR4 (HENDRIX C. *et al*, 2004), porém por causar problemas cardiovasculares graves, este composto teve seus estudos clínicos interrompidos (De CLERCQ E, 2004) Embora efetivo, este composto não foi oralmente biodisponibilizado. Outros estudos demonstram o desenvolvimento de outros antagonistas de CXCR4 orais, incluindo o AMD11070 (MOYLE G. *et al*, 2009) e KRH-3955 (MURAKAMI T. *et al*, 2009).

O antagonista de CXCR4 AMD3100 sofre *in vivo* uma perda de biodisponibilidade com administração injetável. O composto GSK812397, também antagonista de CXCR4, mostrou-se altamente potente em respeito à atividade antiviral *in vitro*. Entretanto, esta atividade, não foi significativamente reduzida na presença de albumina sérica humana ou glicoproteína ácida (MATTHYS P. *et al*, 2001).

Embora inicialmente utilizado como meta para o tratamento da infecção do HIV-1, os antagonistas de CXCR4, podem ter também potencial terapêutico para outras áreas como tratamento para artrite reumatóide, bloqueando células inflamatórias no desenvolvimento da inflamação (MATTHYS P. *et al*, 2001). Ainda, CXCR4 tem sido demonstrado com importante papel na propagação metastática, bem como na regulação direta de crescimento e sobrevivência de células tumorais (SCOTTON C.J. *et al*, 2002).

Em muitos novos direcionamentos nas descobertas e pesquisas da AIDS, uma importante área de investigação é a caracterização bioquímica e a biofísica das interações dos receptores de quimiocinas com HIV-1 bem como ligantes sintéticos das quimiocinas (CHOI W.T. & ZHOU J., 2011).

## **2.6. Detecção do tropismo aos receptores de quimiocinas do HIV**

Atualmente existem alguns métodos para determinação do tropismo do HIV-1, não estando bem esclarecido, o mais apropriado para o uso na prática clínica. A partir de estudos clínicos de antagonistas de receptores de quimiocinas, tem se baseado em testes laboratoriais fenotípicos, porém que consomem muito tempo e alto custo. Mais rápidos e menos custosos, os testes genotípicos tem predito o co-receptor utilizado pelo HIV-1 baseado na sequência do gene *Env* (LIN N.H. & KURITZKES Z.R., 2009). Cada um destes testes possuem suas vantagens e limitações e compartilham o mesmo desafio de detectar baixos níveis de vírus que utilizam CXCR4. O entendimento dessas limitações torna-se importante para realizar o melhor uso dos resultados na prática clínica.

Testes fenotípicos determinam o tropismo viral dependendo de duas abordagens gerais: a detecção da formação de sincício pelo HIV-1 em linhagens de células MT-2 ou infecção viral de linhagens de células não linfóides com expressão estável de CD4 e CCR5 ou CXCR4 (REEVES J.D. *et al*, 2002).

O teste fenotípico mais utilizado em estudos clínicos para antagonistas de CCR5 é o Trofile (MonogramBiosciences, Inc., South San Francisco, CA; now Laboratory Corporation of America [LabCorp]). O gene *env* é amplificado a partir do RNA do HIV-1 presente no plasma e clonado em um vetor de expressão, com o qual é juntamente co-transfectado com um vetor genômico do HIV deficiente do gene *env*. Os resultados de HIV pseudotipados são colhidos e inoculados em linhagens de células contendo apenas CCR5 ou CXCR4. As amostras que produzirem um sinal, medido como unidade de luz relativa (RLU, do inglês, *Relative Light Units*) apenas em células expressando CXCR4, são consideradas trópicas para X4 e assim acontece com R5 e DM (LIN N.H. & KURITZKES Z.R., 2009).

O teste para detecção de tropismo Trofile (WHITCOMB J.M. *et al*, 2007) baseia-se numa técnica utilizando vírus recombinante para identificação do co-receptor de entrada do HIV-1, podendo ser utilizado a partir de amostras de plasma de pacientes. A metodologia do Trofile é exemplificada na Figura 3 abaixo.

O desenvolvimento de Trofile foi formalmente validado de acordo com as regulamentações especificadas pelo *Clinical Laboratory Improvement Amendments* e avaliado de acordo com acurácia, reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade. Esta validação formal foi conduzida para prover ensaios para encaminhamentos clínicos durante o tratamento. Trofile ainda foi formalmente avaliado pelo *Centers for Medicare and Medicaid Services* e certificado pelo *College of American Pathologists* (WHITCOMB J.M. *et al*, 2007).

Este teste, segundo os autores, demonstrou sensibilidade e reprodutibilidade capazes de identificar o co-receptor de entrada do HIV-1 determinando assim como tropismo R5, X4 ou R5/X4, da maioria dos pacientes com carga viral superior a 1000 cópias/ml de plasma.

Os testes de genotipagem têm algumas vantagens sobre os testes de fenotipagem, incluindo um custo diminuído e um menor tempo de realização do exame. O sequenciamento evita certas confusões inerentes dos testes fenotípicos, como uma perda de padronização entre laboratórios, diferentes células alvo, interpretação de trocas citopáticas subjetivas e necessidade do uso de vírus estimulados ou pseudotipos virais. Ainda, alguns autores defendem a hipótese que o teste genotípico pode estar apto para diferenciar níveis de CXCR4 utilizando graduação das seqüências da alça V3 em uma escala contínua (JENSEN M.A. *et al*, 2006).

Entretanto para os métodos genotípicos, alguns estudos mostram que regiões fora da alça V3 são determinantes importantes para o uso do co-receptor (SUPHAPHIPHAT P. *et al*, 2007) e a detecção da minoria das espécies em grande número de sequenciamentos é limitada mesmo que as seqüências estejam expandidas em possíveis números de permutações (LIN N.H. & KURITZKES D.R., 2009).

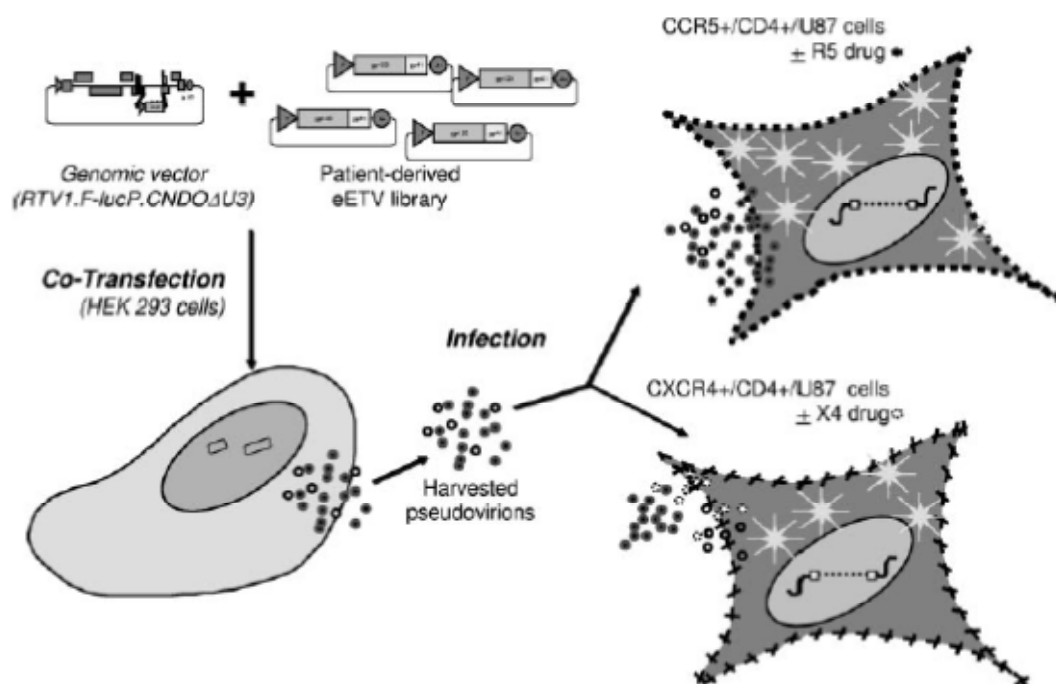


Figura 3. Diagrama esquemático do procedimento do teste para detecção de tropismo Trofile.

Fonte: Whitcomb et al, 2007.

O principal papel dos testes de detecção de tropismo é excluir a presença da detecção de vírus trópicos para X4/R5 ou X4 em pacientes que são considerados para o tratamento com antagonistas de CCR5. Pode ainda ter um papel prognóstico, estabelecendo associação de resultados com a progressão da doença (MENS H. *et al*, 2010). Um número de estudos utilizando testes de tropismo atuais mostrou uma associação semelhante entre a presença de vírus X4/R5 ou X4 e progressão da doença (GOETZ M.B. *et al*, 2009).

O monitoramento periódico usado em pacientes que não estão em uso de terapia antiretroviral poderia ser utilizado como marcador terapêutico nestas decisões, mas outros estudos são necessários para validar o tropismo viral como um biomarcador para iniciação e troca de terapia.

### 3. JUSTIFICATIVA

---

Desde que o primeiro antagonista ao co-receptor CCR5 foi comercializado, o Maraviroc, testes para detecção de tropismo tiveram importante atenção na pesquisa do HIV. Este medicamento é parte de um regime de pacientes pré-tratados e tratados, onde os vírus são classificados como R5 trópicos, utilizando um teste para detecção de tropismo validado, sendo ele genotípico ou fenotípico (BERGER E.A. *et al*, 1998).

Apesar do desenvolvimento das melhorias nos testes já produzidos, alguns não são sensíveis suficientes e seus valores preditivos muitas vezes têm muitas limitações (HUANG W. *et al*, 2008). Outra abordagem importante em relação aos testes é o custo elevado e a não aplicabilidade à prática clínica diária (ARCHER J. *et al*, 2009).

Testes fenotípicos e genotípicos têm sido desenvolvidos para determinar o co-receptor utilizado pelo HIV-1 no momento da entrada na célula (ROSE J.D. *et al*, 2009). A maioria dos testes fenotípicos é baseada em vírus recombinantes que identificam a glicoproteína do envelope. Estes testes são considerados “padrão-ouro” para prever a detecção do tropismo viral (RAYMOND S. *et al*, 2010).

Poucas alternativas de testes fenotípicos estão atualmente disponíveis, mas pouco também, é o conhecimento sobre suas concordâncias (GONZALEZ-SERNA A. *et al*, 2010; RAYMOND S. *et al*, 2010). Geralmente estes testes têm uma menor detecção para as variantes que utilizam o co-receptor CXCR4, variando entre 0.3-0.5% (SU Z. *et al*, 2009).

Testes genotípicos podem também determinar o tropismo do HIV-1 utilizando algoritmos para a sequência de aminoácidos da região *env* da alça V3. Estes testes são simples, rápidos e menos custosos que os testes fenotípicos, mas o sequenciamento direto da alça V3 não é muito sensível para detecção de variantes que utilizam CXCR4 (POVEDA E. *et al*, 2009).

Trofile é o teste clinicamente validado, entretanto existem algumas limitações como o alto custo, tempo prolongado para obtenção de resultados confirmados, disponibilidade das amostras, um considerável percentual de resultados não relatados, a necessidade de amostras que contenham mais que 1000 cópias/ml de plasma de RNA e acesso limitado para países desenvolvidos (GONZALEZ-SERNA A. *et al*, 2010). Além disso, a discordância em dois resultados consecutivos, em um mês, do

Trofile foi observada em 10% dos pacientes antes da exposição aos inibidores de CCR5 (LANDOVITZ R.J. *et al*, 2008).

A citometria de fluxo é uma técnica muito utilizada nas rotinas laboratoriais e pesquisas básicas para caracterização de fenótipos celulares, morfologia e comportamento de respostas imunológicas, visando auxiliar o entendimento das patologias e consequentemente encaminhando terapêutica aos pacientes. É um procedimento rápido, com reduzidos custos em comparação às técnicas moleculares disponíveis e que normalmente, apresentam alta sensibilidade e especificidade em seus ensaios.

Sabe-se que as limitações dos testes disponíveis para a detecção do tropismo podem excluir alguns pacientes quanto ao uso do antagonista de CCR5 na terapia antiretroviral. A citometria propõe uma significativa redução destas limitações, sendo portanto, extremamente importante para a evolução biotecnológica e terapêutica, o desenvolvimento de outras ferramentas, além do teste Trofile, para determinação do tropismo do HIV.

## **4. OBJETIVOS**

---

### **Objetivo principal**

Determinar detecção de tropismo viral do HIV-1 por indentificação intracelular e superficial de membrana em células CD4 positivas através da citometria de fluxo

### **Objetivos específicos**

- ❖ Desenvolver um teste para detecção intracelular do Vírus da Imunodeficiência Humana-1 pela técnica de citometria de fluxo.
- ❖ Mensurar carga proviral em pacientes infectados pelo HIV com diferentes níveis de carga viral plasmática.
- ❖ Estabelecer valores de referência para subpopulações de linfócitos T na população brasileira.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

**Dados sumarizados em 2 artigos submetidos e 1 aceito para publicação.**



## ARTIGO 1

---

### HIGH DEGREE OF CONCORDANCE BY USING FLOW CYTOMETRY AND GENO2PHENO METHODS FOR HIV-1 TROPISM DETERMINATION IN PROVIRAL DNA

Torres AJL<sup>1</sup>; Brígido LFM<sup>2</sup>; Abrahão MHN<sup>1</sup>; Ferreira GJ<sup>1</sup>; Coelho, LPO<sup>2</sup>,  
Ferreira, JLP<sup>2</sup>; Pedrosa C<sup>1</sup>; Netto EM<sup>1</sup>; Brites C<sup>1</sup>

*1. Federal University of Bahia; 2. Adolfo Lutz Institute*

#### ABSTRACT

**Background:** use of CCR5 inhibitors requires previous viral tropism determination. The available methods (TROFILE and V3 loop genotyping) have high cost, time-consuming, or require highly trained personnel, and sophisticated equipment. We compared Flow Cytometry based Tropism Assay (FCTA) with geno2pheno method to determine HIV-1 tropism in AIDS patients, in Bahia, Brazil

**Methods:** we tested PBMC samples of 102 AIDS patients under antiretroviral therapy by using a flow cytometry-based method and geno2pheno assay. Cellular membrane receptors were identified through CXCR4, CCR5 and CD4 monoclonal antibodies labeled by Phicoeritrine (PE), Perydine-clorophyl (PerCP) and Allophycocyanin (APC), respectively along with detection of cytoplasmic mRNAs for gag and pol HIV regions through a probe labeled with 6-FAM fluorophore. We detected cytoplasmic mRNAs for gag and pol HIV regions through a probe labeled with 6-FAM fluorophore. Genotypic identification of X4 and R5 viral tropism was attempted by using the geno2pheno algorithm. **Results:** Results compared among FCTA and geno2pheno algorithm had high concordance to HIV-1 tropism. FCTA presented high sensitivity and specificity in comparison to geno2pheno results as gold standard. One sample could not be amplified in geno2pheno and was classified as duotropic by FCTA. We did not find any association between CD4+ count or viral load and HIV-1 tropism results. **Conclusion:** In this study FCTA showed an overall performance almost identical to geno2pheno assay in determining the HIV-1 tropism.

**Keywords:** HIV-1, Tropism, Flow Cytometry, Geno2pheno

## INTRODUCTION

The HIV-1 initial contact between the viral envelope glycoprotein gp120 and the cellular receptor CD4 is followed by a second interaction between gp120 and one of the cellular coreceptors: CCR5 or CXCR4 (1,2). This virus requires a co-receptor [initially chemokine (C-C motif) receptor5 (CCR5)] for entry into its host to facilitate primary infection irrespective of the transmission route and the predominant viral tropism present in the donor (3). It has been shown that viruses binding to CCR5 are almost exclusively present during the early asymptomatic stage of the infection whereas CXCR4-binding viruses may emerge in later phases of the infection and are associated with a CD4 + T-cell decline and progression towards AIDS (4).

Most HIV variants isolated from drug-naive, chronically-infected individuals use CCR5 along with CD4 to gain entry into cells - hence referred to as R5- tropic. On the other hand viruses able to use CXCR4 coreceptors (X4-tropic) tend to emerge later over the course of HIV infection, being recognized in nearly half of patients in advanced disease stages. Under drug therapy, consequent switches back and forth between both coreceptors may occur (5). Small-molecule CCR5 antagonists are a relatively new class of drugs that block HIV entry into target cells, having been approved for the treatment of HIV-infected patients. These drugs bind to a hydrophobic pocket formed by the transmembrane helices of CCR5, inducing conformational changes in the extracellular loops (ECLs) of the receptor, being necessary HIV-1 tropism determination, to start CCR5 antagonists treatment. (6-12)

Different genotypic and phenotypic tools have been used to assay HIV tropism (13). Despite the improvements, genotypic algorithms are not sensitive enough, and their predictive values have limitations (14-16). Another genotypic approach is ultra deep sequencing; however, this is currently expensive and not applicable to daily clinical practice (17). Actually, the tropism tests used, has some limitations, such as high cost, prolonged time to obtain a confirmed result, availability, considerable proportion of “nonreportable” results, the requirement that samples contain more than 1,000 HIV RNA copies/ml and limited access in developing countries (18).

In the present study, was performed a HIV tropism assay by Flow Cytometry (FCTA) and results were compared with geno2pheno as gold standard. FCTA propose decrease tropism assays limitations, with low cost and lower procedure time.

## MATERIAL AND METHODS

A total of 102 HIV-1 patients attended at AIDS clinical of Hospital Universitário Professor Edgard Santos monitoring by T CD4+ lymphocytes counts and plasma viral load were tested for both FCTA and geno2pheno algorithm, with a 10% false positive rate threshold.

The sample numbers was defined by convenience because this study has as objective to develop a new tool for HIV-1 tropism monitoring. The patients have under 18 years old and signed a inform consent. The patients selection was realized by software SISCEL from Brazilian Minister of Healthy.

### *Flow Cytometry Tropism Assay procedure*

The FCTA tropism test was developed using monoclonal antibodies (Abs) for CD4+ labeled with APC (BD, San Jose, CA), CXCR4+ labeled with PE-Cy7 (BD, San Jose, CA), CCR5+ labeled with PE (BD, San Jose, CA) surface membrane T cells and a HIV-1 mRNA probe labeled with 6-FAM to detect *gag* and *pol* HIV-1 regions into T cells cytoplasm. The composition of HIV-1 probe are described in the table below.

<b>Genes</b>	<b>Seqüência dos primers</b>	<b>Fluoróforo</b>
<i>gag</i>	F: 5'- AGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT-3'	6-FAM
<i>pol</i>	F: 5'- GATATTTCTCATGTTTCATCTTGGGCCTTATCTATTCC-3'	

Table 1. HIV-1 *gag* and *pol* regions in the probe used.

### *Reagents preparation*

Were used 0.5µl of the concentrate probe in dilution with 4.5 µl of EB (Elution buffer). This probe concentration was twice more that standard concentration. To prepare a integration buffer were add 12.5 µl of the ultrapure water, 12.5 µl of 10% BSA (Bovine Serum Albumine) and 25 µl of Tween 20.

Probe cocktail was performed with 100 µl of formamide and 5 µl of HIV-1 probe and 50 µl of integration buffer.

### **Assay procedure**

The FCTA procedure involves 100 µl of total blood or PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) submitted to fixation and permeabilization buffers. After washed with PBS, 155 µl cocktail HIV-1 probe was added and incubated at 43°C at wash bath for 120 minutes in the dark. The wash procedures were realized adding 500 µl PBS (Phosphate Buffer Saline). After new wash procedure, samples were centrifugated at 2000 RPM for 10 minutes. After to discard supernatant, monoclonal antibodies to CD4+, CXCR4 and -CCR5 were added and incubated in the dark for 20 minutes and was performed a new wash procedure and suspension with 450 µl PBS.

The samples were acquired and analyzed by BD CellQuest software from FACSCalibur with four fluorimetric parameters.

### **HIV-1 env genetic sequencing**

DNA was extracted by QIAGEN protocol. With Amplification of partial HIV *envelope* (*env*) gene by nested PCR was performed with 2.5µL of DNA input. Reaction mixture include 10uM of each primer **ED5**, forward position ATG GGA TCA AAG CCT AAA GCC ATG TG (6557 → 6582) and **ED12**, reverse position AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG (7811 ← 7782) with Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen) in a final volume reaction of 25µL. Positive and negative controls were included in each run. PCR conditions consisted of 10 cycles 94°C 2min, 94°C 15sec, 55° C 30sec, 68° 1min, 25 cycles 94°C 15sec, 55°C 30sec, 68°C 1 min add 5 sec/cycle, and 68°C 7min. 2,5UI of PCR products was used in a second PCR (nested) with primers **ED31**, forward position CCT CAG CCA TTA CAC AGG CCT GTC CAA AG (6817 → 6845) and **ES8**, reverse position CAC TTC TCC AAT TGT CCC TCA (7668 ← 7648) with Taq DNA Polymerase (Invitrogen) in a final volume reaction of 25µL.

PCR conditions consisted of 10 cycles 94°C 2min, 94°C 15sec, 55° C 30sec, 72°C 1min, 25 cycles 94°C 15sec, 55°C 30 sec, 72°C 1min (increasing by 5sec in each sequential elongation), with a final elongation period with 72°C 1min add 5 sec/cycle. PCR reaction was considered valid when the PCR products and positive control bands

were visualized around 700 bp at 1.3% agarose gel with SYBR Safe DNA gel staining (Invitrogen, USA) along with controls.

Nested PCR products were quantified using Low mass ladder (Invitrogen, USA), diluted accordingly (1:10) in water to allow an input of 5-10 nanograms of DNA for Rodamine incorporation. Big Dye Kit (Ready Reaction Mix, Applied Biosystems, Foster City, Calif ) was used with the primers V3O2, forward position 5' AAT GTC AGY ACA GTA CAA TGT ACA C 3' (6948 → 6969), ES7, forward position 5' CTG TTA AAT GGC AGT CTA GC 3' (7005 → 7021), ED33 reverse position 5' TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C 3' (7360 ← 7378 ) and SQV3, reverse position 5' GAA AAA TTC CCT TCC ACA ATT AAA 3' (7350 ← 7370). Cycle sequencing conditions consisted of 25 cycles 96°C 10sec, 50°C 5sec, 60°C 4min, 8°C infinity. After cycle sequencing DNA precipitation using a solution of sodium acetate and ethanol was followed by denaturation using Hi-Di Formamide at 94°C 4min and resolved at an automated sequencer Genetic Analyzer 3130 XL (Applied Biosystems). Sequences were edited using Sequencer (Biocodes, USA) and submitted to geno2pheno evaluation (Max Planck Institute, Germany) using clonal option.

Statistical parameters were analyzed by SPSS v.17 software. FCTA and geno2pheno results were compared and evaluated by Pearson Chi-square test. Sensitivity, specificity and Positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were also calculated.

This project was submitted and approved (n. 044/2008) by Maternidade Clímerio de Oliveira ethical committee from Federal University of Bahia.

## RESULTS

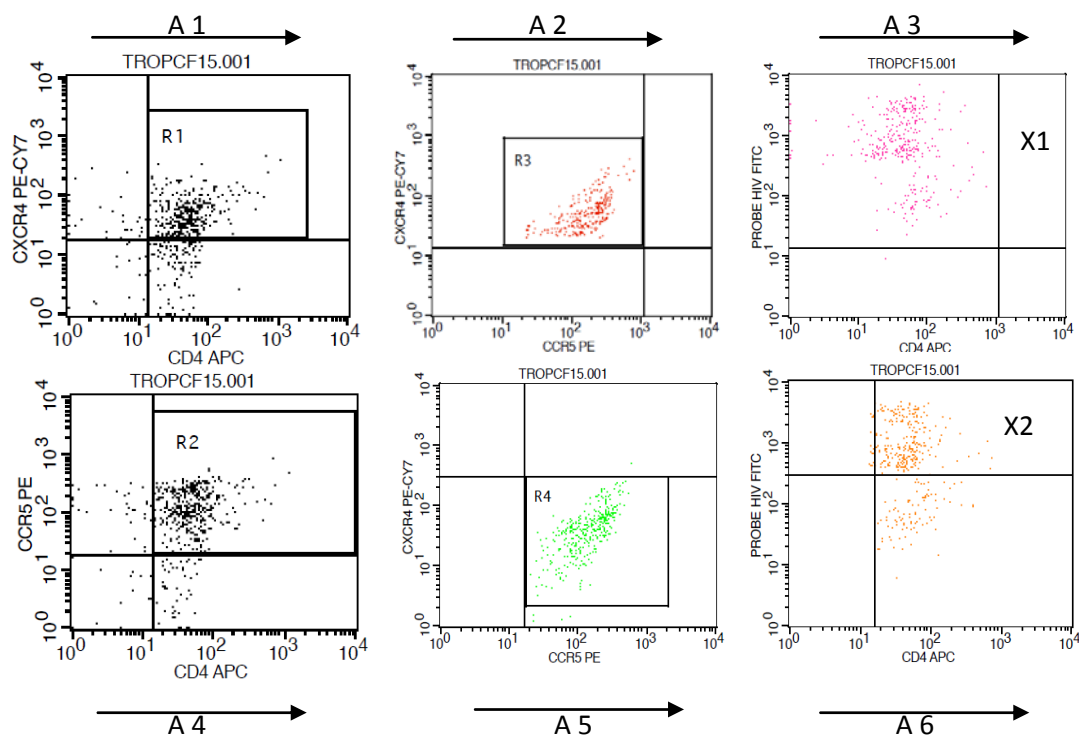
A total of 102 samples of PBMC from HIV infected patients were evaluated. Median age was 42 years. The median CD4 cells count was 489 cells/mm<sup>3</sup> (IQR:305-675), CD8 was 886 cells/mm<sup>3</sup> (IQR:716-1229) and CD3 was 1529 cells/mm<sup>3</sup> (IQR:1187-1946). The mean time since HIV diagnostic was six years (range 2- 6 years). Sixty-six

patients presented with undetectable viral load and twenty-eight has viral load higher 1500 copies/ml. Eight patients were not HIV-1 viral load procedure.

Median CD4+ cells count was 506 cells/mm<sup>3</sup> for R5 patients, and 431 cells/mm<sup>3</sup> for X4, that no presented statistics significance. Forty-five (76,3%) of R5 patients had undetectable HIV-1 RNA viral load, compared with 21 (65.6%) patients classified as non-R5 patients.

In dot plots FCTA analysis, CD4+CCR5+ and CD4+CXCR4+ positive events that determine T lymphocytes and monocytes plus co-receptors populations, were isolated in two different gates. Each gate was plotted to CCR5+ *versus* CXCR4+. A gate was selected to CCR5+CXCR4- cells and analyzed to detect HIV-1 probe *versus* CD4+ cells in other plot. The same procedure was realized to CCR5-CXCR4+ cells according showed in the figure 1.

## R5 HIV-1 tropism determination



## X4 HIV-1 tropism determination

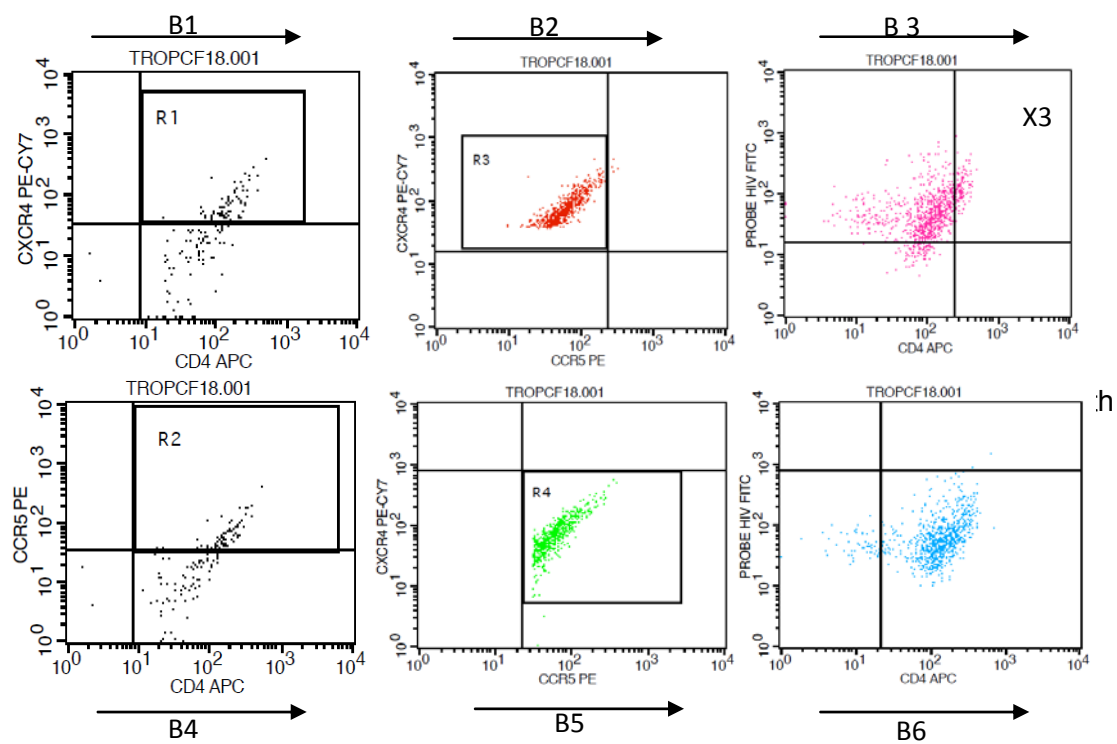


Figure 1. Dot plot analysis to HIV-1 determination tropism

CCR5 tropism result (A1 to A6) and the second with CXCR4 tropism result (B1 to B6). To the CCR5 HIV-1 tropism determination (first patient), A1, initially, select the CD4+CXCR4+ cells populations (R1). In the sequence, A2 determine axis position to the positive CXCR4+ populations (first quadrant) and A3 shows dot plot with the same axis position and no cells in the second quadrant (X1), what a means negative result to X4 tropism. Analyzing CCR5 populations positivity, A4 select CD4+CCR5+ cells populations (R2). A5 determine axis position to the CCR5+ populations (first quadrant) and A6 detect cells presence in the second quadrant (X2) what a means positive result to R5 tropism. To the CXCR4 tropism determination presented in the second patient (B1 to B6), the analyzes are realized of the same mode, differing that in B3 are found cells in X4 (second quadrant) determining positive result to CXCR4 HIV-1 tropism and B6 are not found cells in X5 (second quadrant).

HIV-1 tropism results from FCTA and geno2pheno were paired and analyzed according statistical correlation among them. This correlation are described in table 1 below.

		Geno2pheno (GS)*			Total
		CCR5	Dual	CXCR4	
		* Gold Standard			
<b>FCTA</b>	<b>CCR5 count</b>	<b>65</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>66</b>
	<b>%Geno2pheno</b>	<b>100%</b>	<b>3,4%</b>	<b>0%</b>	<b>65,3%</b>
	<b>Dual count</b>	<b>0</b>	<b>28</b>	<b>4</b>	<b>32</b>
	<b>% Geno2pheno</b>	<b>0%</b>	<b>96,6%</b>	<b>57,1%</b>	<b>31,7%</b>
	<b>CXCR4 count</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
	<b>%Geno2pheno</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>42,9%</b>	<b>3%</b>

**Table 1. HIV-1 tropism classification comparing two tests**



The sensitivity to R5 samples classified to both tests was 100% with 95% confidence interval (CI) in variation to 94.4 – 100%. Thirty-five patients were classified as non-R5 (32 as Duotropic/Mix and 3 as X4) by geno2pheno, and the same samples were equally classified as non-R5 by FCA.

Only one sample was classified as non-R5 by geno2pheno, and as R5 by FCTA. This results represents 97.2% specificity and 95% CI in variation to 85.8-99.5%. One sample could not be amplified in geno2pheno and was classified as duotropic by FCTA.

The FCTA sensitivity was tested, in order to stratification CD4 values according 0 to 249 cells/mm<sup>3</sup>, 250-499 cells/mm<sup>3</sup>, 500-749 cells/mm<sup>3</sup> and higher 750 cells/mm<sup>3</sup> and compared with geno2pheno. No difference was found among CD4 range and HIV-1 tropism. The results data are presented in table 2.

Tests	Range CD4 counts	Geno2pheno (GS)*		Total	
		CCR5	Non-CCR5		
FCTA	-249	CCR5 count	9	0	9
		% concordance	100%	0%	60%
	250-499	Non-CCR5	0	8	8
		% concordance	0%	100%	40%
250-499	CCR5 count	23	1	24	
	% concordance	100	7,1	62,9%	

	<b>Non-CCR5</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>11</b>
	<b>% concordance</b>	<b>0</b>	<b>92,9%</b>	<b>37,11%</b>
<b>500-749</b>	<b>CCR5 count</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>18</b>
	<b>% concordance</b>	<b>100%</b>	<b>0%</b>	<b>69,2%</b>
	<b>Non-CCR5 count</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
	<b>% concordance</b>	<b>0%</b>	<b>100%</b>	<b>30,8%</b>
<b>&gt;750</b>	<b>CCR5 count</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>15</b>
	<b>% concordance</b>	<b>100%</b>	<b>0%</b>	<b>75%</b>
	<b>Non-CCR5 count</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
	<b>% concordance</b>	<b>0%</b>	<b>100%</b>	<b>25%</b>

*\* Gold Standard*

**Table 2. HIV-1 tropism results stratified by CD4 range**

## **DISCUSSION**

In this study, we have developed a novel assay to identify HIV tropism. Our results obtained using FCTA displayed a high degree of concordance with the widely geno2pheno algorithm, thus demonstrating the potential of FCTA for HIV tropism testing.

Some HIV-1 tropism tests have been developed around of the world. The trofile test was a first created for these objectives. Since co-receptor tropism is an important consideration for evaluating novel drugs, as well as for evaluating disease progression in patients enrolled in clinical trials, the addition of Trofile to other clinical tools available for management of HIV-1 infection permits clinicians to select more effective antiretroviral treatment regimens. (19).

A Spanish group developed an assay (TROCAI) and results were compared by Trofile. The TROCAI and Trofile test showed a global concordance of 22/24 (91.6%) between them (18).

A test to determinate by genotyping of HIV-1 by duplicate PCR amplification of the region encoding the V3 loop was developed. The concordance between genotypic and phenotypic approaches had the Trofile assay as a reference. The sensitivity of V3 genotyping for predicting CXCR4-using viruses therefore increased from 56.8% with single PCR to 68.2% with duplicate PCR ( $P=0.13$ ). The concordance between the duplicate PCR approach and Trofile was 76% for HIV-1 subtype B and 83% for non-B HIV-1 subtypes. (20)

In study that evaluated a performance of genotypic algorithms for predicting HIV tropism, among bioinformatic tools, PSSMX4R5 showed the best concordance with ES Trofile (82.6%; 95% CI, 76.7 to 86.4%). Geno2pheno (false-positive rate, 20%) showed the highest sensitivity to predict CXCR4 (76.7%; 95% CI, 61.8 to 87.5%), with a specificity of 73.6% (95% CI, 68.7 to 77.2%). Although there were no overall significant differences in the accuracy of the bioinformatics tools according to antiretroviral experience, Geno2pheno 1% and 2.5% did perform better in assessing HIV tropism in samples from naïve patients than from treatment-experienced patients (21).

Other study, samples were stratified by CD4 cell counts, those from patients with CD4 cell counts between 200 and 500 cells/mm<sup>3</sup> showed the best predictive performance, and among the algorithms, again the PSSMX4R5 algorithm displayed the highest concordance with ES Trofile. In contrast, patients with CD4 cell counts of less than 200 cells/mm<sup>3</sup> exhibited the least accurate results. Our finds don't found significance statistical to CD4 stratification values and HIV-1 tropism performance, but T CD4 lymphocytes count in association with CCR5 presented more prevalence to 250-499 cells/mm<sup>3</sup>.

One important aspect of FCTA is the development as lower cost and less time to conclusion. Moreover, our results present high geno2pheno algorithm concordance and being a procedure without the need of nucleic acid amplification. FCTA use Peripheral Blood Mononuclear Cells or total blood samples.

FCTA increased the number of reportable results compared with geno2pheno. For all of these reasons, we suggest that FCTA could be an additional test to assay HIV tropism.

## REFERENCES

1. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, et al. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382: 829–833.
2. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, et al. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661–666.
3. Wolinsky SM, Wike CM, Korber BT, Hutto C, Parks WP, Rosenblum LL, Kunstman KJ, Furtado MR, Muñoz JL: Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 1992, 255(5048):1134-7.
4. Miedema F, Meyaard L, Koot M, Klein MR, Roos MTL, et al. (1994) Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol Rev* 140: 35–72.

5. Regoes RR, Bonhoeffer S: The HIV co-receptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol* 2005, 13(6):269-77.
6. Dragic, T., A. Trkola, D. A. Thompson, E. G. Cormier, F. A. Kajumo, E. Maxwell, S. W. Lin, W. Ying, S. O. Smith, T. P. Sakmar, and J. P. Moore. 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:5639–5644.
7. Konduru, R., J. Zhang, C. Ji, T. Mirzadegan, D. Rotstein, S. Sankuratri, and M. Dioszegi. 2008. Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol. Pharmacol.* 73:789–800.
8. Maeda, K., D. Das, H. Ogata-Aoki, H. Nakata, T. Miyakawa, Y. Tojo, R. Norman, Y. Takaoka, J. Ding, G. F. Arnold, E. Arnold, and H. Mitsuya. 2006. Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* 281:12688–12698.
9. Maeda, K., D. Das, P. D. Yin, K. Tsuchiya, H. Ogata-Aoki, H. Nakata, R. B. Norman, L. A. Hackney, Y. Takaoka, and H. Mitsuya. 2008. Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J. Mol. Biol.* 381:956–974.
10. Seibert, C., W. Ying, S. Gavrillov, F. Tsamis, S. E. Kuhmann, A. Palani, J. R. Tagat, J. W. Clader, S. W. McCombie, B. M. Baroudy, S. O. Smith, T. Dragic, J. P. Moore, and T. P. Sakmar. 2006. Interaction of small molecule inhibitors of HIV-1 entry with CCR5. *Virology* 349:41–54.
11. Tsamis, F., S. Gavrillov, F. Kajumo, C. Seibert, S. Kuhmann, T. Ketas, A. Trkola, A. Palani, J. W. Clader, J. R. Tagat, S. McCombie, B. Baroudy, J. P. Moore, T. P. Sakmar, and T. Dragic. 2003. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Virol.* 77:5201–5208.
12. Watson, C., S. Jenkinson, W. Kazmierski, and T. Kenakin. 2005. The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor. *Mol. Pharmacol.* 67:1268–1282.

13. Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240.
14. de Mendoza, C., K. Van Baelen, E. Poveda, E. Rondelez, N. Zahonero, L. Stuyver, C. Garrido, J. Villacian, V. Soriano, and the Spanish HIV Seroconverter Study Group. 2008. Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 48:241–244.
15. Huang, W., J. Toma, S. Fransen, E. Stawiski, J. D. Reeves, J. M. Whitcomb, N. Parkin, and C. J. Petropoulos. 2008. Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 82:5584–5593.
16. Low, A. J., W. Dong, D. Chan, T. Sing, R. Swanstrom, M. Jensen, S. Pillai, B. Good, and P. R. Harrigan. 2007. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 coreceptor usage in clinical isolates. *AIDS* 21:F17–F24.
17. Archer, J., M. S. Braverman, B. E. Taillon, B. Desany, I. James, P. R. Harrigan, M. Lewis, and D. L. Robertson. 2009. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS* 23:1209–1218.
18. Gonzalez-Serna A, Leal M, Genebat M, Abad MA, Garcia-Perganeda A, Ferrando-Martinez S and Ruiz-Mateos E. Trocai (Tropism Coreceptor Assay Information): A New Phenotypic Tropism Test And Its Correlation With Trofile Enhanced Sensitivity And Genotypic Approaches. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec. 2010, p. 4453–4458
19. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, Chappey C, Kiss LDB, Paxinos EE, and Petropoulos CJ. Development and Characterization of a Novel Single-Cycle Recombinant-Virus Assay To Determine Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Tropism. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Feb. 2007, p. 566–575

20. Raymond S, Recordon-Pinson P, Saliou A, Delobel P, Nicot F, Descamps D , Marcelin AG, Flandre P, Calvez V, Masquelier B and Izopet J., On behalf of the ANRS AC11 Resistance Study Group. Improved V3 Genotyping with Duplicate PCR Amplification for Determining HIV-1 Tropism. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1972–1975.

21. Sánchez V, Masia M, Robledano C, Padilla S, Ramos JM and Gutiérrez F. Performance of Genotypic Algorithms for Predicting HIV-1 Tropism Measured against the Enhanced-Sensitivity Trofile Coreceptor Tropism Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2

## ARTIGO 2

---

**Determinação de carga proviral do HIV-1 pela técnica de Citometria de Fluxo em pacientes com diferentes níveis de viremia.**

Torres AJL<sup>1</sup>; Abrahão MHN<sup>1</sup>; Ramos, AMC<sup>1</sup>, Ferreira GJ<sup>1</sup>; Netto EM<sup>1</sup>; Brites C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>**Universidade Federal da Bahia**

### Abstract

**Racional:** Carga proviral do HIV-1 pode determinar a correlação entre carga viral plasmática e evolução clínica e laboratorial do paciente. A citometria de fluxo é uma técnica que determina com maior rapidez e menor custo, a carga proviral do HIV-1.

**Métodos:** Foram testados 102 amostras de PBMC de pacientes HIV positivos sobre terapia antiretroviral e 20 amostras de indivíduos saudáveis triados por ELISA anti-HIV, utilizadas como controle negativo. Os receptores de membrana foram identificados através da marcação com anticorpos anti-CD4+ marcado com Alociocianina (APC). O DNA proviral do HIV-1 foi detectado por uma sonda contendo sequências das regiões *gag* e *pol* marcada com fluoróforo 6-FAM. A carga viral plasmática foi testada pelo método de b-DNA (SIEMENS). **Resultados:** Pacientes controladores de elite apresentaram uma significativa diminuição da carga proviral em comparação com pacientes em uso de HAART e com cargas virais plasmáticas indetectáveis e detectáveis. Pacientes que apresentaram tropismo para CCR5 e carga viral plasmática indetectada e estável há menos de cinco anos apresentaram um aumento na carga proviral do HIV-1. **Conclusão:** Cargas provirais do HIV-1 foram detectadas pela técnica de citometria de fluxo em tempo reduzido de procedimento em comparação aos outros testes disponíveis e em pacientes com carga viral plasmática latente.

**Keywords:** Citometria de fluxo, Carga proviral, HIV-1

### INTRODUÇÃO

A infecção do HIV-1 avança progressivamente para um aumento da viremia, diminuição de células T CD4+ e surgimentos de sintomas clínicos com



imunodeficiência na maioria dos indivíduos não tratados. Entretanto uma pequena proporção de pacientes mantém níveis indetectáveis de replicação viral na ausência de terapia antiretroviral, sendo estes considerados controladores da infecção.<sup>1,2</sup>

Estudos prévios têm demonstrado que o HIV persiste em latência nas células T CD4+ infectadas do sangue periférico<sup>3,4</sup>, bem como em tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) de indivíduos infectados<sup>5,6</sup>. Esta supressão prolongada da viremia plasmática ocorre na maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1 em tratamento antiretroviral<sup>7</sup>.

A carga viral plasmática em pacientes sem uso de HAART e com contagens de células T CD4+ abaixo de 500 células/mm<sup>3</sup> de sangue, pode estar associada com a carga proviral do HIV-1 em pacientes em uso de HAART e carga viral plasmática indetectável, podendo potencialmente representar a intensidade do reservatório viral. Estratégias para redução da carga viral no plasma quando as contagens das células T CD4+ estão abaixo de 500 células sem HAART, podem ajudar a reduzir a carga proviral do HIV-1<sup>8</sup>.

O pico de RNA viral coincide com o tempo de soroconversão e é acompanhada por uma grande depleção de células T CD4+ expressando CCR5 no sítio da mucosa efetora<sup>9-12</sup>. No sangue periférico, um rápido declínio inicial de células T CD4+ é seguida por uma desaceleração desta depleção celular após 5 a 6 meses<sup>13</sup>. Pouco se conhece sobre o DNA proviral em infecção primária do HIV-1, embora talvez pareça ser crítico para a patogênese devido ao valor preditivo para a progressão da doença<sup>14-17</sup>.

Entretanto a relação entre viremia plasmática residual e a frequência de células T CD4+ associadas a carga proviral do HIV-1 e/ou marcadores de ativação imune, não estão completamente elucidadas. Nosso estudo desenvolveu uma nova ferramenta para a detecção de carga proviral do HIV-1 pela técnica de citometria de fluxo, associando a fatores de comportamento da resposta imune pela células T CD4+ e evolução da carga viral plasmática.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram testadas amostras de 102 pacientes HIV-1 positivos atendidos no Hospital Universitário Professor Edgard Santos em monitoramento dos exames de contagens de subpopulações de células T CD4+ e carga viral plasmática. Inicialmente os pacientes foram selecionados pelo histórico destes parâmetros em banco de dados do software SISCEL do Ministério da Saúde do Brasil, além de entrevista com o paciente no momento da coleta.. Em um primeiro momento foram triados 167 pacientes que apresentaram cargas virais plasmáticas indetectáveis e contagens de células CD4+ acima de 500 células/mm<sup>3</sup> de sangue durante pelo menos nos últimos dois anos e 89 pacientes com carga viral detectável e contagens de CD4+ inferiores a 500 células/mm<sup>3</sup> neste mesmo período de tempo.

Foram selecionados pacientes em uso de TARV ou que apresentaram viremia indetectável sem uso de TARV, caracterizados como controladores de elite.

Os pacientes foram selecionados consecutivamente até preencher o total de amostras previstas pelo estudo. Ao final do recrutamento foram definidos os seguintes grupos: 28 pacientes com carga viral detectável em uso de HAART, 36 pacientes com carga viral indetectável em uso de HAART e 38 pacientes controladores de elite, os quais foram caracterizados pelo histórico de carga viral plasmática indetectável durante todo o tempo de infecção e contagens de linfócitos T CD4+ sem inversão. Além disso, foram incluídos 40 indivíduos soronegativos para o HIV-1 como grupo controle.

A amostra foi por conveniência, devido a limitações no quantitativo dos testes disponíveis e por se tratar de desenvolvimento de uma nova ferramenta para monitoramento e diagnóstico laboratorial. As análises estatísticas foram realizadas em SPSS v.17 e utilizados teste *t de student* e ANOVA.

Todos os pacientes eram maiores de 18 anos de idade e foram convidados a participar do estudo, pelo aceite através do termo de consentimento informado.

*Detecção da carga proviral do HIV-1 por citometria de fluxo*

**Preparo da sonda:** Para cada paciente, foram utilizados 0,5 ul da sonda concentrada (200ul) e diluir em 4,5 ul de TE (tampão de eluição) para alcançar volume final de 5ul. A sonda encontra-se com o dobro da concentração padrão.

A composição da sonda para detecção do HIV-1 é ilustrada na tabela 1.

**Tabela 1** - Seqüências das bases dos genes *gag* e *pol* que compõem a sonda e fluoróforo marcado.

<b>Genes</b>	<b>Seqüência dos primers</b>	<b>Fluoróforo</b>
<i>gag</i>	F: 5'- AGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT-3'	6-FAM
<i>pol</i>	F: 5'- GATATTTCTCATGTTTCATCTTGGGCCTTATCTATTCC-3'	

**Preparação dos reagentes:** A solução de anelamento é preparada no momento da realização do teste. Para cada amostra com 12.5ul de água ultrapura e 12.5ul de BSA 10%, foram adicionados 25ul de Tween 20.

A solução de permeabilização deve ser preparada no momento da realização do teste com 50ul de água destilada e 50ul do tampão de permeabilização saponificado.

O coquetel da sonda com 100ul de formamida, 5ul da sonda do HIV e 50ul da solução de anelamento foi preparada em seguida.

300ul do tampão de fixação e 1ml de PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) no banho-maria a 43°C foram adicionados.

**Procedimento do teste:** Foram adicionados 100ul de sangue total e 100ul do tampão de fixação. A incubação foi realizada no escuro por 20 minutos e posteriormente foi acrescentado com 500ul de PBS e centrifugação por 10min em rotação 2000 RPM em temperatura ambiente.

O sobrenadante foi desprezado por pipetagem com cuidado para não atingir as células no fundo do tubo. Foi realizada leve agitação para não causar lise nas células e acrescentadas 100ul da solução de permeabilização. Incubação por 30 minutos no escuro e em seguida foram acrescentados 500ul de PBS e centrifugados por 10min em rotação 2000 RPM em temperatura ambiente.

Mais uma vez, o sobrenadante foi desprezado por pipetagem com cuidado para não atingir as células no fundo do tubo. Agitação leve para não causar lise nas células e em seguida foram acrescentados 155ul do coquetel da sonda, agitado levemente e incubado no banho-maria a 43°C entre 60 e 120 minutos protegido da luz.

500ul do PBS aquecido (banho-maria) foram adicionados. Agitação leve e centrifugação por 10min em rotação 2000 RPM em temperatura ambiente foi realizada. O sobrenadante foi desprezado por pipetagem com cuidado para não atingir as células no fundo do tubo. Em seguida foi realizada agitação leve para não causar lise nas células e foram adicionados 100ul do tampão de fixação aquecido. Agitação leve e foi descansado em banho-maria (43°C) por 15 minutos protegido da luz.

Foram adicionados 500ul do PBS aquecido (banho-maria) com agitação leve e centrifugação por 10min em rotação 2000 RPM em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado por pipetagem com cuidado para não atingir as células no fundo do tubo seguindo de agitação leve para não causar lise nas células.

Foram ainda acrescentados 10ul de anticorpo anti-CD4 (APC e PC5), 10ul de anticorpo anti-CD3 (PerCP) e 10ul de anticorpo anti-CD45 (PE). Incubar por 20 a 30 minutos protegido da luz em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 500ul do PBS e agitados levemente e centrifugação por 10min em rotação 2000 RPM em temperatura ambiente. O sobrenadante, mais uma vez, foi desprezado por pipetagem com cuidado para não atingir as células no fundo do tubo e leve agitação para não causar lise nas células.

Foram adicionados 400ul de PBS e as amostras foram adquiridas por citometria de fluxo de no mínimo quatro cores.

***Procedimento do teste para detecção da carga viral plasmática do HIV pela metodologia b-DNA VERSANT 3.0.***

O teste *Versant HIV-1 RNA 3.0* (bDNA; Siemens Medical Solutions, Mississauga, Ontario, Canada) objetiva a detecção de uma região altamente conservada do gene *pol* e muitos primers e probes são utilizados para caracterizar a amplificação do sinal do DNA recombinante desta região. Este teste detecta HIV-1 do grupos M recombinantes de A para D e F para K e muitas outras formas recombinantes circulantes (CRFs, do inglês, Circulating Recombinat Forms).

RNA purificado foi obtido de 1 ml de amostra de plasma e a amplificação qPCR e detecção no teste de bDNA foi realizado utilizando o aparelho VERSANT 440 v.3.0 Este teste não usa controle interno. O intervalo da dinâmica deste teste varia de 1.7 a 5.7  $\log_{10}$  cópias/ml de plasma.

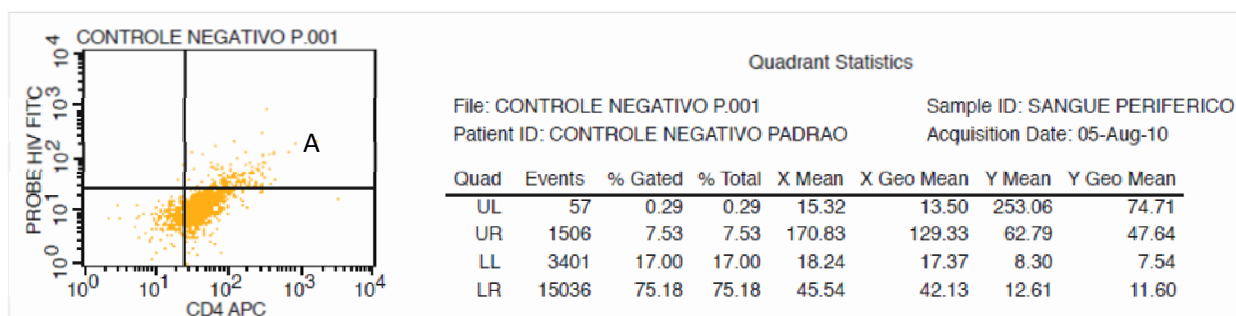
Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da Maternidade Clímério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia sob o parecer número 044/2008..

## RESULTADOS

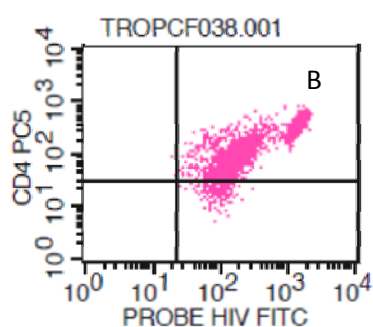
Os 102 pacientes HIV-1 infectados, apresentaram uma média de idade de 42 anos. Os valores absolutos médios das contagens de linfócitos T CD4+ foi de 489 células/mm<sup>3</sup> de sangue (IQR:305-675), de T CD8+ foi de 886 células/mm<sup>3</sup> de sangue (IQR:716-1229) e de T CD3+ foi de 1529 células/mm<sup>3</sup> de sangue (IQR:1187-1946). O tempo médio de diagnóstico entre os pacientes foi de 6 anos (variação de 2 a 6 anos).

Amostras de grupo controle foram testadas, sendo inicialmente selecionadas no *gate* de referência, células T CD4+ num gráfico CD4+ *versus* Side Scatter. Em seguida, conforme demonstrado na figura 1, ficou evidenciada a ausência da probe do HIV-1, que determina a carga proviral, nas células CD4+ nestes indivíduos.

Foram analisados ainda, carga proviral em pacientes com carga viral plasmática <50 cópias/ml em uso de terapia antiretroviral (TARV), carga viral >50 cópias/ml em TARV e um grupo de pacientes caracterizados como controladores de elite, sendo estes perfis de análise demonstrados na figura 2, obedecendo para cada grupo, um percentual de CD4+ infectados diferentes. Dentre os grupos avaliados, não houve diferente significância estatística entre as cargas provirais dos pacientes em TARV com carga viral plasmática menores que 50 cópias/ml ou maiores que 50 cópias/ml.



**Figura 1. Identificação da presença da probe do HIV-1 em células CD4+ em grupos controle HIV negativo.** O quadrante A da figura indica a localização de positividade para os dois marcadores em análise, o CD4+ e a probe, o que determina as células CD4+ infectadas pelo vírus. Neste grupo avaliado, a positividade desta característica atingiu 7.53%, determinando uma não contaminação das células devido ao ponto de corte ser superior a 10%, baseado no guideline ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering).



Patient ID: TROPFC38

Acquisition Date: 26-Aug-10

Gate: G3

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	23	0.25	0.23	20.14	19.97	79.86	70.41
UR	8166	87.13	81.66	471.10	256.21	173.78	124.84
LL	1	0.01	0.01	23.50	23.50	31.62	31.62
LR	1182	12.61	11.82	97.93	92.41	21.72	20.39

**Figura 2. Perfil de análises da carga proviral em pacientes HIV-1 infectados.** O quadrante B identificado na figura, demonstra o percentual de 87.13% de células infectadas em um paciente que obteve a maior carga proviral detectável pelo teste FCPLA. Este paciente apresentou carga viral plasmática de 7.995 cópias/ml e valor de contagem de CD4+ igual a 331 células/mm<sup>3</sup> de sangue.

Os pacientes controladores de elite, apresentaram carga proviral significativamente inferior aos outros dois grupos estudados ( $p=0.00$ ), conforme demonstrado na tabela 1.

## Report

**CARGA PROVIRAL**

<b>GRUPOS Cargas Virais e TARV</b>	<b>Média (% de células infectadas)</b>	<b>N</b>	<b>Desvio Padrão</b>
CARGA VIRAL DETECTÁVEL COM TERAPIA	55.04	28	20.778
ELITE *	33.16	38	15.510
CARGA VIRAL INDETECTAVEL COM TERAPIA	50.47	36	19.456
Total	45.27	102	20.640

\*  $p=0.00$  na associação com os outros grupos

**Tabela 2. Médias de cargas provirais entre grupos de pacientes em associação com carga viral plasmática e uso de TARV.**

Associando a carga proviral do FCPLA e o tropismo (FCTA) do HIV-1 nos pacientes estudados, foram identificados percentuais de células infectadas semelhantes entre pacientes com tropismo CCR5 e CXCR4, 46.81% e 42.34%, respectivamente, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significantes entre ambas.

Dentre os pacientes que apresentaram carga viral plasmática menor que 50 cópias/ml (indetectável) em uso de TARV, foram avaliados o tempo de supressão da viremia plasmática onde os pacientes com menos de 5 anos de supressão apresentaram carga proviral superior em 13.01% quando comparados aos pacientes acima de 5 anos de supressão (54.44% e 41.45%, respectivamente). Apesar desta diferença, estes resultados não expressaram significância estatística ( $p=0.56$ ).

Os resultados totais de FCPLA representam 97.3% de especificidade com intervalo de confiança de 95%.

**DISCUSSÃO**

Mecanismos intrínsecos das respostas imunes adaptativas contra replicação do HIV-1 nas células T CD4+ podem representar um importante papel na modulação da resistência da infecção em pacientes controladores de elite. Porém, muitos estudos têm demonstrado que células T CD4+ de controladores de elite são geralmente permissivas ao HIV-1 e que podem permitir uma replicação competente do vírus *in vivo*<sup>18-20</sup>. Após ativação *in vitro*, células T CD4+ destes pacientes permitem a infecção do HIV-1<sup>19,21</sup>, mas estes experimentos podem ser insuficientemente sensíveis aos mecanismos de resistência da replicação do HIV-1, devido a alterações das expressões gênicas no hospedeiro.

Em nosso estudo, os controladores de elite apresentaram carga proviral significativamente ( $p<0,05$ ) inferiores em comparação com os pacientes em terapia com cargas virais plasmáticas indetectáveis ou não.

Dados da literatura sugerem que mecanismos de ativação imune podem interferir na replicação viral e conter a viremia do HIV-1, impedindo uma maior proliferação da infecção nas células CD4+ e um consequente aumento na carga viral plasmática<sup>23</sup>. Células T CD8+ específicas para o HIV-1 dos controladores de elite apresentam citotoxicidade específica<sup>22</sup>, proliferação<sup>23,24</sup> e secreção de citocinas<sup>25</sup> tendo sido efetores na replicação *in vitro* em experimentos de cultura de tecidos<sup>26,27</sup>. Ainda a resistência para a replicação viral pode também estar associada com uma forte e seletiva modulação da p21 que é uma quinase ciclina dependente inibidora desta proteína, também conhecida como cip-1 e waf-1<sup>28</sup>.

A carga proviral dos pacientes em terapia não variou significativamente entre os grupos de pacientes com carga viral plasmática <50 cópias/ml e >50 cópias/ml, podendo indicar para os pacientes com cargas indetectáveis, uma ação mais efetiva dos inibidores de protease no bloqueio à saída de novos vírions.

Nosso estudo identificou que vírus com tropismo CCR5, tendem a apresentar uma maior carga proviral, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,378$ ) em comparação aos de tropismo não-CCR5, o que sugere uma não influência direta do co-receptor de entrada com a intensidade da infecção de células CD4+.

O tempo de indetecção, ou seja, carga viral plasmática inferior a 50 cópias/ml, em pacientes em uso de TARV foi correlacionado à carga proviral do HIV-1, onde pacientes com indetecção inferior a 5 anos superam em cerca de 14% os pacientes com indetecção superior a 5 anos (54.44% e 41.45%, respectivamente). Apesar destes resultados não apresentarem significância estatística, estudos demonstram que em pacientes com carga viral plasmática indetectáveis após um ano de HAART, a maior redução da carga proviral foi obtida em pacientes que iniciaram tratamento na fase inicial assintomática da infecção com valores de CD4 maiores que 500 células/mm<sup>3</sup> de sangue<sup>29</sup>.

Diminuição da carga proviral após HAART foi significativamente relacionada com uma alta contagem de células CD4+ pré-HAART e prolongada duração do tratamento antiretroviral<sup>30, 31,32</sup>.



O presente estudo concluiu que a carga proviral do HIV-1 possui relação inversamente proporcional ao tempo de supressão da viremia plasmática e que em pacientes controladores de elite apresenta-se significativamente reduzida em comparação a pacientes em terapia, independente dos níveis de carga viral plasmática.

Tal fato pode sugerir que o reservatório viral de células latentes se reduz gradualmente em pacientes com supressão continuada da carga viral plasmática.

## **REFERÊNCIAS**

1. Saez-Cirion A, et al. HIV controllers—How do they tame the virus? *Trends Immunol.* 2007;28(12):532–540.
2. Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med.* 2007;15(4):134–136.
3. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:13193–7.
4. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278:1291–5.
5. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2008; 197:714–20.
6. Yukl SA, Gianella S, Sinclair E, et al. Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2010; 202:1553–61.
7. Walensky RP, Paltiel AD, Losina E, et al. The survival benefits of AIDS treatment in the United States. *J Infect Dis* 2006; 194:11–9.
8. Jun Yong Choi *et al.* Factors Associated with HIV-1 Proviral DNA Loads in Patients with Undetectable Plasma RNA Load. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 152-4

9. Picker LJ, Maino VC. The CD 4(+) T cell response to HIV-1. *Curr Opin Immunol* 2000;12:381–386. [PubMed: 10899031]
10. Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol* 2006;18:399–405. [PubMed: 16753288]
11. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004;200:749–759. [PubMed: 15365096]
12. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004;200:761–770. [PubMed: 15365095]
13. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, et al. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1998;128:613–620. [PubMed: 9537934]
14. Rouzioux C, Hubert JB, Burgard M, et al. Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts. *J Infect Dis* 2005;192:46–55. [PubMed: 15942893]
15. Verhofstede C, Reniers S, Van Wanseele F, et al. Evaluation of proviral copy number and plasma RNA level as early indicators of progression in HIV-1 infection: correlation with virological and immunological markers of disease. *AIDS* 1994;8:1421–1427. [PubMed: 7529507]
16. Strain MC, Little SJ, Daar ES, et al. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis* 2005;191:1410–1418. [PubMed: 15809898]
17. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, et al. CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clin Infect Dis* 2006;42:709–715. [PubMed: 16447119]

- 18 Blankson JN, et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol.* 2007;81(5):2508–2518.
19. Lamine A, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *AIDS.* 2007; 21(8):1043–1045.
20. Julg B, et al. Infrequent recovery of HIV from, but robust exogenous infection of activated CD4+ T-cells from HIV elite controllers. *Clin Infect Dis.*2010;51(2):233–238.
21. Gandhi SK, Siliciano JD, Bailey JR, Siliciano RF, Blankson JN. Role of APOBEC3G/F-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors. *J Virol.* 2008;82(6):3125–3130.
22. Migueles SA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity.* 2008;29(6):1009–1021.
23. Migueles SA, et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol.* 2002;3(11):1061–1068.
24. Lichterfeld M, et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med.* 2004;200(6):701–712
- .
25. Betts MR, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006;107(12):4781–4789.
26. Saez-Cirion A, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(16):6776–6781.
27. Saez-Cirion A, et al. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol.* 2009;182(12):7828–7837.

28. Huabiao Chen et al. CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *The Journal of Clinical Investigation*. Volume 121 Number 4 April 2011
29. Andreoni M, et al. Cellular proviral HIV-DNA decline and viral isolation in naive subjects with  $>5000$  copies/ml of HIV-RNA and  $>500$  CD4 cells treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 14:23–29. 2000.
30. Morand-Joubert L, et al. 2005. Contribution of cellular HIV-1 DNA quantification to the efficacy analysis of antiretroviral therapy: a randomized comparison of 2 regimens, including 3 drugs from 2 or 3 classes (TRIANON, ANRS 081). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 38:268 –276.
31. Sarmati L, et al. 2005. Association between cellular human immunodeficiency virus DNA level and immunological parameters in patients with undetectable plasma viremia level during highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* 43:6183– 6185.
32. Watanabe D, et al. 2011. Cellular HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with therapy duration. *BMC Infect. Dis.* 11:146.

## ARTIGO 3

---

### ESTABLISHING THE REFERENCE RANGE FOR T LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN ADULTS AND CHILDREN FROM BRAZIL

Torres AJL<sup>1</sup>, Angelo ALD<sup>1</sup>, Silva MO<sup>1</sup>, Bastos MC<sup>1</sup>, Souza D.F.C.<sup>2</sup>, Inocência L.A.<sup>2</sup>, Lemos JAR<sup>3</sup>, Júnior RS<sup>4</sup>, Castro AC<sup>5</sup>, Palma PVB<sup>6</sup>, Ceci L<sup>7</sup>, Netto EM<sup>1</sup>, Brites C<sup>1</sup>.

*1Federal University of Bahia; Salvador, BA, Brazil; 2AIDS and STD National Program, Brazilian Ministry of Health; 3Hematology and Hemotherapy Center from state of Pará – HEMOPA Foundation, Federal University of Pará; Belém, PA, Brazil; 4Central Laboratory from Goiás; 5Hospital Nossa Senhora da Conceição-Rio Grande do Sul; 6Hematology, Hemotherapy Center Foundation from Ribeirão Preto; 7Infectious Diseases Laboratory – HSE from Rio de Janeiro.*

#### ABSTRACT

In Brazil, the existing reference values for T-lymphocytes subsets are based on data originated in other countries. There is no local information on normal variation for these parameters in Brazilian adults and children. We evaluated the normal variation found in blood donors from 5 large Brazilian cities, in different regions, and in children living in Salvador, and Rio de Janeiro. All samples were processed by flow cytometry. The results were analyzed according to region, gender, and lifestyle of blood donors. A total of 641 adults (63% males), and 280 children (58% males) were involved in the study. The absolute CD3+, and CD4+ cells count were significantly higher for females (adults and children). Higher CD4+ cells count in adults was associated with smoking, while higher CD8+ count was found among female children. Higher counts, for all T-cells subsets, were detected in blood donors from Southeast / South regions while those living in North region had the lowest values. Individuals from Midwest and Northeast regions had an intermediate count for all these cells subsets. However, these differences did not reach statistical significance. In Brazil, gender, and smoking, were the main determinants of differences in T-lymphocytes reference values.

**Key-Words:** CD4, CD8, blood donors, reference values, Brazil.

---

Financial Support: AIDS and STD National Program from Brazilian Ministry of Health  
+Corresponding Author: [ajltorres@gmail.com](mailto:ajltorres@gmail.com)

---

## INTRODUCTION

Absolute white blood cells count and their subsets play a major role in both cellular and humoral immunity. CD4+ T cells have a central role in the generation of a proper immune response, especially in cell-mediated processes. These cells are responsible for three important steps in the immune response: activation, regulation and memory (Ref). The CD4+ T-lymphocytes are the main target for HIV-1, and the infection by this virus promotes a progressive depletion of this T-cells subset, causing AIDS (ref). The quantification of these lymphocytes is an important tool in monitoring HIV-1 infection, as well as other immune deficiencies caused by decreased number of CD4+ cells.<sup>10,7,2</sup> It is used to define the optimal moment to start antiretroviral therapy and/or prophylaxis of opportunistic infections<sup>13,31</sup>. The available evidence suggest that variations in the CD4+ cells count may depend on certain factors like nutrition, environment, and genetics.<sup>23,14,27</sup>

In children, the number of circulating T cells increases from mid-gestation up to the age of 6 months. This peak is followed by a gradual decline until adult levels are reached by late childhood<sup>28</sup>. As a result of the age-related changes in the absolute lymphocyte numbers, and thus, CD4+ count, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classifies children into immune categories using CD4+, by using a system based on specific age groups<sup>20</sup>.

Several studies have shown significant variations of CD4 T cells within different African populations, in comparison with the values established for Europe and North America<sup>35,19,26</sup>. Brazil is a country with continental dimensions, and a wide ethnical variation, with different climates, and nutritional habits. In a previous report we detected significant differences in CD4 T cells count for blood donors from the cities of Belém and Salvador<sup>30</sup>. This led us to evaluate blood samples originated from others regions and also to include children from two states.. In this work we present the results of a comparison of T-lymphocytes count between blood donors from 5 cities of different Brazilian regions, and children from 2 different cities.

## **METHODS**

### ***Study design, setting and population***

A cross sectional study was conducted in blood centers of five capitals of different states, each one representing a geographic region: Salvador (Bahia state, Northeast region), Belém (Pará state, North region), Ribeirão Preto (São Paulo state Southeast region), Goiânia (Goiás state Midwest region), and Porto Alegre (Rio Grande do Sul state, South region). The children involved in the study were originated from Rio de Janeiro (Rio de Janeiro state) and Salvador (Bahia). The centers participants in this study were Hematology and Hemotherapy Centers from Bahia, Pará and São Paulo, Central Laboratory of Goiás state, Hospital Nossa Senhora da Conceição (Rio Grande do Sul), and Federal University of Rio de Janeiro.

We included 645 adult donors and 280 healthy children 280 volunteers (148 from Bahia and 132 from Rio de Janeiro).

### ***Study subjects***

Study subjects were healthy adults and infants. Adults were eligible if older than 18 years, and agreed to participate in the study. The infants selected for this study were between two and six years old. Blood was collected in ethylene diamine-tetraacetic acid (EDTA) tubes. The same samples were used for serological tests and immunophenotyping. Samples were collected in the morning from 9.00 AM to 12.00 noon, kept at room temperature and analyzed in the same day.

All adults provided a written informed consent. For children, a written consent was obtained from their legal guardians. Adults subjects and children guardians were interviewed, using a structured questionnaire with information on demographics, and lifestyle (smoking, alcohol consumption, and stress level, measured by daily routine sleep time), and screened for symptoms such as fever, cough and weight loss to rule out any recent and/or current infections.

The following categories were excluded: pregnant women, patients receiving medical treatment, individuals with history of recent or current morbid conditions, and individuals who tested positive for HIV, HTLV, HCV, HBV and Syphilis antibodies.

### ***Laboratory procedure***

### *Serological tests*

Serological tests for HIV, HTLV, HCV, HBV and syphilis were done using ELISA antibody tests (Vironostika, Biomerieux). Patients that presented positive or inconclusive results were excluded of the study.

### *T cells counts by Immunophenotyping*

T cells subpopulations were analyzed by using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.). In brief, 20µl of Multitest (CD3/CD8/CD45/CD4 - Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.). Monoclonal antibodies were added in Trucount tubes containing reference beads (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif.). 50µl whole blood was mixed and incubated at room temperature for 20 min in dark. Red blood cells were then lysed by adding 450 µl of fluorescence-activated cell sorter lysing solution (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). The tubes were incubated at room temperature for 20 min, acquired and analyzed with the Multiset software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) within six hours.

### *Data management and Statistical analysis*

Completed questionnaires were coded by numbers and patient's initials. The data was then transferred to SPSS version 13 for analysis. Chi-square test was used for categorical variables. We calculated means and Standard Deviation, 2.5<sup>th</sup>-97.5<sup>th</sup> percentile for median and odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) were used. Comparison between the continuous variables was performed by ANOVA or Kruskal-Wallis test.

### *Ethical considerations*

The protocol was approved by the Ethical Committee from Maternidade Climério de Oliveira, Federal University of Bahia. Informed consent was obtained from the volunteers or from guardians (children) prior to enrolment.



## RESULTS

### *Characteristics of study's participants*

A total of 641 blood donors and 280 children were included in the study. Most of adults (63%) were male, with a mean age of 33 years (Interquartile range 19±56). Fifty-nine donors (9%) declared smoking, 210 subjects (32.5%) informed to drink alcohol three or more days per week, and 259 (40%) declared a routine sleep time shorter than 8 hour/day. Gender was equally distributed for the children involved in the study, with 51% of males. For this group, the age varied from 2 to 6 years.

### *T cells values and gender*

The overall results for the T-cells subsets values are showed in table 1. Adults females had higher mean absolute lymphocytes counts higher mean absolute CD3 T cells, and higher mean absolute CD4 T cells than adults males ,(p<0.001 for all comparisons) Table 2 displays these findings.

**Table 1.** Median and mean for T subpopulations cells.

Parameter	Adults	Adults	Children	Children
	Median(N=641)	2.5th-97.5th percentile	Median(N=284)	2.5th-97.5th percentile
N=925 (Adults and Children)	Cells/ $\mu$ l	Cells/ $\mu$ l	Cells/ $\mu$ l	Cells/ $\mu$ l
T CD4+ lymphocytes	931	540 - 1731	1652	803 - 4291
T CD8+ lymphocytes	541	263 - 1189	1065	470 - 3116
T CD3+ lymphocytes	1585	1025 - 2904	2996	1440 - 6350
Total lymphocytes CD45+	2445	1257 - 4104	4658	2372 - 7753

### ***T lymphocytes values according to lifestyle***

We didn't find any difference for the T lymphocytes absolute values when stratifying individuals by alcohol intake and stress level. There was an association between smoking and higher CD4+ cells count (1112 vs. 972 cells/ul, for smokers and non-smokers, respectively,  $p < 0.01$ ). Regarding stress level we found a significant difference for the CD3+ and CD4+ T lymphocytes relative subsets (table 3).

**Table 2.** Correlations among demographics data and T lymphocytes absolute values.

Parameters	N	T CD4 + Cells/ $\mu$ l	T CD8 + Cells/ $\mu$ l	T CD3 + Cells/ $\mu$ l
Males / females (Adults)	403 / 238	965 / 1071**	582 / 586	1633 / 1742**
Males/females (Children)	164 / 120	1480 / 2207**	933 / 1407**	2590 / 3815**
Smokers/no smokers	55 / 586	1112 / 972**	578 / 579	1765 / 1641
Stress / no stress	259 / 382	1004 / 972	591 / 559	1680 / 1627
Alcohol / no alcohol	210 / 431	931 / 1013	579 / 582	1598 / 1683

\*  $p < 0,05$  for the data difference

\*\*  $p < 0,01$  for the data difference

### ***Lymphocyte values and geographical origin***

We observed a differential pattern for absolute lymphocytes count according to the city of origin of blood donors. They had higher absolute CD3+ and CD4+ cells count in Ribeirão Preto and Porto Alegre (South/Southeast regions), intermediate count in Goiânia and Salvador (Midwest/Northeast regions) and lower in Belém (North region). The CD3+ T lymphocytes subsets were higher for donors from Ribeirão Preto, when compared with Salvador, Belém and Goiânia ( $p < 0.01$ ). We also detected a

significant difference comparing values for patients from Belém with those from Goiânia and Porto Alegre. ( $p<0.01$ ) (table 4).

**Table 3.** Correlations among demographics data and T lymphocytes percentage values.

<i>Parameter</i>	<i>%T CD4 +</i>	<i>%T CD8 +</i>	<i>%T CD3 +</i>
<b>N=645</b>	<b>Cells/<math>\mu</math>l</b>	<b>Cells/<math>\mu</math>l</b>	<b>Cells/<math>\mu</math>l</b>
Males / females (Adults)	42 / 43	24 / 32	72 / 72
Males / Females (Children)	29 / 34**	17 / 22**	50 / 61**
Smokers/no smokers	43 / 43	24 / 24	71 / 74
Stress / no stress	44 / 42*	25 / 24	74 / 71**
Alcohol/ no alcohol	42 / 43	24 / 28	72 / 72

\*  $p<0,05$  for the difference among data

\*\*  $p<0,01$  for the difference among data

CD3 + absolute cells count also was lower in Belém ( $p<0,05$ ) in comparison with any of other cities, but results were similar for Ribeirão Preto, Salvador, Porto Alegre and Goiânia. We observed the same pattern of variability for CD4+ T lymphocytes comparing values for donors from Ribeirão Preto, Salvador, Belém and Goiânia ( $p<0.01$ ). Again, these absolute values showed a significant difference between Belém and Porto Alegre ( $p<0.01$ ). The absolute values for CD8+ T lymphocytes showed less variation. These results were statistically different when compared Belém (lower values) with Salvador, São Paulo city and Porto Alegre (higher values,  $p<0.05$ ). Table 4 summarizes the values found for these T-cells subsets count.

**Table 4.** Mean and standard deviation for T lymphocytes among cities.

<i>Cities, State</i>	<i>TCD4 + Cells/μl/SD</i>	<i>T CD8 + Cells/μl/SD</i>	<i>T CD3 + Cells/μl/SD</i>
<b>N=645</b>			
Salvador, Bahia	975 ± 317	572 ± 239	1641 ± 500
Belém, Pará	899 ± 236	472 ± 170	1473 ± 387
Goiania, Goiás	937 ± 272	597 ± 255	1616 ± 451
Ribeirão Preto, São Paulo	1155 ± 434	642 ± 266	1866 ± 623
Porto Alegre, Rio Grande do Sul	1071 ± 335	609 ± 245	1751 ± 508

## DISCUSSION

The comparison of T lymphocytes in healthy and blood donors from distinct regions of Brazil, demonstrate that there are significant differences in these parameters, depending on the cell subsets evaluated, and the geographical origin of individuals. In a previous study we demonstrated that blood donors from North and Northeast states had a different range of normal variations for CD3+, CD4+ and CD8+ T cells subsets. In the present work we compared these parameters for blood donors from cities of other different region, and included children fr two of them.<sup>8</sup>

The immune response usually is modulated according to different factors, like nutritional aspects, ethnicity, age, gender and others<sup>27,11</sup>. This may impact some specific aspects of the response against infections, for instance.<sup>21,5</sup> In addition, some available evidence suggest that nutritional factors like the amount of 3-omega, arginin, glutamine, proteins supplement, and nucleic acids in the food may help the immune system to produce a higher level of cytokines and other important factors for cell function<sup>4</sup>. Nutritional supplementation may enhance immune functions even for healthy individuals<sup>23</sup>.

Hematological parameters and T lymphocytes subsets are presented differently in literature, according to geographical area, economic level, age and nutritional status. Lower platelets and leukocytes values were reported in some studies realized with blood donors from Etiope, in comparison with standards from other regions <sup>12</sup>. In Italy, CD3 T absolute values showed a variation 3.7% higher than Turkey, and 1% than Sweden. For CD4+ T lymphocytes, these variations were 6% and 2.9%, respectively, and for CD8+ T cells were 2.6% and 3.2%, respectively <sup>16</sup>. CD3+ absolute T lymphocytes count in China was 0.4% higher, when comparing with Indian's values. For CD4+ and CD8+ T cells these results were 0.7% and 4.3% higher respectively <sup>18</sup>.

Although these variations are not wide, they can be significant when we use such parameters for taking clinical decisions. In HIV infections, for instance, a minimal difference can lead clinicians to start therapy or prophylaxis against opportunistic infections, since these recommendations are based on a specified range of CD4+ cells count.

Regarding reference levels for children, we found a wide variation in lymphocytes count and its subsets in this population. These findings are in conformity with the previous reports on haematological parameters in children <sup>34,1</sup>. We observed that the CD4+ T cells count was significantly higher in females than males, in accordance with the observed in adults. This observation was largely due to the higher levels of CD4+ cells in female children older than 5 years. This is in agreement with some studies in Asian and European children<sup>29,15</sup>. On the other hand, several studies in Africans showed no significant gender difference in the CD4+ cells count of children until adolescence, after which females tend to have higher number of CD4+ cells than males <sup>6,9</sup>. The reasons for this disparity are not clear but both genetic and environmental factors may play a role <sup>32</sup>.

The Brazilian population has a wide diversity per geographic region with unique nutritional, ethnics, and behavior characteristics. For instance, the African heritage in Salvador is very strong, and some costumes were well preserved, like dietary, music, and others. Most of Salvador's population (77.5%) is composed by African descendents<sup>24</sup>. The South and North regions have less African influence, but a strong European and Amerindian presence, respectively <sup>17</sup>. Most of the Indian population are localized at North and Mid-West regions from Brazil, while in South and Southeast predominates the European influence. These findings can be associated with the

different results found by T lymphocytes subsets among Brazilians cities in our study, and reinforce the importance of defining the regional variations for these parameters <sup>25</sup>.

Others variables can also influence the immune response. In our study, absolute T lymphocytes subpopulations values were higher in females when compared with males. These results are in accordance to other reports, and is a likely consequence of the effect of sexual hormones on the production and release of T lymphocytes in blood <sup>22</sup>.

Some life style characteristics like smoking, sleep time, and alcohol consumption can also exert an influence on the immune system <sup>24</sup>. Tobacco's complex has more than 4500 chemicals toxic substances, Tobacco's components had been used to modulate cellular immune response *in vivo* and *in vitro* experiments. An important condition potentially associated with immune response is the population's socioeconomic level. The Brazilian cities present a large variation in Human Development Index (HDI) level, which means they are likely to have different economic, nutritional, and stress characteristics. São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and Goiás states are among the most developed areas in country, with higher HDI levels, while Pará and Bahia are in the opposite side of HDI scale. These disparities may contribute to explain the difference in lymphocytes count we detected when comparing the mean values of T lymphocytes in these different areas. They suggest that higher HDI correlates with a higher absolute number of T-cells lymphocytes.

Currently, North American (USA) and European T lymphocytes reference ranges are used in Brazil. These reference values were defined by studies conducted by Becton Dickinson (USA) corporation <sup>5</sup>. For CD3+ T lymphocytes these median values are 1410 cells/ $\mu$ l (reference interval 690-2540 cells/ $\mu$ l), for CD4+ T cells 880 cells/ $\mu$ l (410-1590), and for CD8+ T lymphocytes 490 cells/ $\mu$ l (190-1140) <sup>5</sup>. Our study found median values for T lymphocytes subsets in Brazilian population and suggest the need of local parameters for diagnostic and monitoring of HIV patients and/or others immunodeficiencies.

Defining the reference values of T cell count for Brazilian population is an important point, due to the wide variability in its characteristics, according to the country region. CD4+ and CD8+ T lymphocytes are important markers of cellular

immunodeficiency, and variation in the reference range may affect the clinical decision process. In children, these parameters are strongly influenced by factors like age, and it is of great importance to determine the limits of normality for these cells subsets in pediatric population.

Although the differences found in our study are not large enough to exclude the use of the current reference pattern, they are important to emphasize the regional variations, making possible for clinicians to more accurately define the real stage of immunodeficiency presented by our patients.

### ACKNOWLEDGEMENTS

AIDS and STD National Program from Brazilian Ministry of Health, Hematology and Hemotherapy Centers from Bahia, Pará and Ribeirão Preto, Central Laboratory from Goiás and Hospital Nossa Senhora da Conceição from Rio Grande do Sul.

### REFERENCES

1. Anglaret X, Diagbouga S, Mortier E, Meda N, Verge-Valette V, Sylla-Koko F, Cousens S, Laruche G, Ledru E, Bonard D, Dabis F, Perre P Van de: CD4+ T-lymphocyte counts in HIV infection: are European standards applicable to African patients? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997, 14:361-7.
2. Antoine T, Heyraud A, Bosso C, Samain E. Highly efficient biosynthesis of the oligosaccharide moiety of the GD3 ganglioside by using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* (9) 1350-1352. 2005.
3. Audu RA, Idigbe EO, Akanmu AS, et al., "Values of CD4+ T lymphocyte in apparently healthy individuals in Lagos, Nigeria," *European Journal of Scientific Research*, vol. 16, no. 2, pp. 168–173, 2007.
4. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J: Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997, 277:112-6.

5. BD.Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda.Manual para Quantificação de Linfócitos T CD4 / CD8. 88-89.2006.
6. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland.Eur.J.Haematol. (3) 203-212.2004.
7. Bofill M, Janossy G, Lee CA, MacDonald-Burns D, Phillips AN, Sabin C, *et al.* Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 1992; 88 : 243-52.
8. CEPAL (Comissão Econômica para América Latina); OIT(Organização Internacional do Trabalho) and PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento). Relatório Emprego, Desenvolvimento Humano e Trabalho Decente-A experiência Brasileira recente. September – 2008.
9. Chandra RK. 1990 McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future.Am.J.Clin.Nutr. (5) 1087-1101.1991.
10. Denny T, Yogev R, Gelman R, et al., “Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 267, no. 11, pp. 1484–1488, 1992.
11. Embree J, Bwayo J, Nagelkerke N, Njenga S, Nyange P, Pamba H and Plummer F. Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected children in Nairobi. *Pediatr Infect Dis J*, 2001;20:397–403.
12. European Collaborative Study, “Are there gender and race differences in cellular immunity patterns over age in infected and uninfected children born to HIV-infected women?” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, vol. 33, no. 5, pp. 635–641, 2003.
13. Fahey JL, Schnelle JF, Boscardin J, Thomas JK, Gorre ME, Aziz N, *et al.* Distinct categories of immunologic changes in frail elderly. *Mech Ageing Dev* 2000; 115 : 1-20.



14. Feki S, Rekaya Z, Ben Chaaben T, Zribi A, Boukef K, Jenhani F: Determination of T-lymphocyte subsets in a north African population (Tunisia): establishment of normal ranges and results in HIV-infected individuals. *Dis Markers* 1998, 14:161-4.
15. Gill GV, England A, Marshal C. Low platelet counts in Zambians. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* (1) 111-112.1979.
16. Hussain T, Abbas S, Khan MA, Scrimshaw NS. Lysine fortification of wheat flour improves selected indices of the nutripredominantly cereal-eating families in Pakistan. *Food Nutr Bull* 2004; 25 : 114-22.
17. IBGE.Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil:500 anos de Povoamento. 2000.
18. Lee B, Yap H, and Chew F, "Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects: from birth to adulthood," *Cytometry*, vol. 26, no. 1, pp. 8–15, 1996.
19. Levin A, Brubaker G, Shao JS, Kumby D, O'Brien TR, Goedert JJ, Strauss KW, Blattner WA, Hannel I: Determination of T-lymphocyte subsets on site in rural Tanzania: results in HIV-1 infected and non-infected individuals. *Int J STD AIDS* 1996, 7:288-91.
20. Libamba E, Makombe S, Harries AD, Chimzizi R, Salaniponi FM, Schouten EJ, Mpazanje R: Scaling up antiretroviral therapy in Africa: learning from tuberculosis control programmes – the case of Malawi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, 9:1062-71
21. Lisse IM, Aaby P, Whittle H, Jensen H, Engelmann M, and Christensen LB, "T-lymphocyte subsets in West African children: impact of age, sex, and season," *Journal of Pediatrics*, vol. 130, no. 1, pp. 77–85, 1997.
22. Maini MK, Gilson RJ, Chavda N, Gill S, Fakoya A, Ross EJ, *et al.* Reference ranges and sources of variability of CD4 counts in HIV-seronegative women and men. *Genitourin Med* 1996; 72 : 27-31.

23. Maini MK, Gilson RJ, Chavda N, Gill S, Fakoya A, Ross EJ, *et al.* Reference ranges and sources of variability of CD4 counts in HIV-seronegative women and men. *Genitourin Med* 1996; 72 : 27-31.
24. Ndhlovu Z, Ryon JJ, Griffin DE, Monze M., Kasolo F, and Moss WJ. CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets in Zambian children. *Journal of Tropical Pediatrics*, vol. 50, no.2, pp. 94–97, 2004.
25. Njoku MO, Sirisena ND, Idoko JA, and Jelpe D, “CD4+ T-lymphocyte counts in patients with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and healthy population in Jos, Nigeria,” *The Nigerian Postgraduate Medical Journal*, vol. 10, no. 3, pp. 135–139, 2003.
26. Roller M, Rechkemmer G.;Watzl B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J.Nutr.* (1) 153-156.2004.
27. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P; Giroto M. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica.* (6) 499-504.1999.
28. Saxena R, Choudhry V, Nath I, Das SN, Paranjape RS, Babu G, Ramlingam S, Mohanty D, Vohra H, Thomas M, Saxena QB, Ganguly NK. Normal ranges of some select lymphocyte sub-populations in peripheral blood of normal healthy Indians. *Current Science.* (7) 969-975.2004.
29. Scrimshaw NS, Sangiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am.J.Clin.Nutr.* (2) 464S-477S.1997.
30. Siegel PD, Saxena RK, Saxena QB, Ma JK, Ma JY, Yin XJ, Castranova V, Al-Humadi N, Lewis DM. Effect of diesel exhaust particulate (DEP) on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components. *J Toxicol. Environ. Health A.* (3) 221-231.2004. Dumará. 2003.

31. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* (5) 372-377.2002.
32. Telles E. *Racismo à Brasileira: Uma Nova Perspectiva Sociológica.* Rio de Janeiro. Relume-Dumará. Fundação Ford, 2003. 347 p.
33. Torres AJL, Angelo ALD, Netto EM, Sampaio GP, Souza DFC, Inocência LA, Lemos JAR, Brites C. Reference range for T lymphocytes populations in blood donors from two different regions in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2009, 13:221-225.
34. UNAIDS. 2006 Report on the global AIDS epidemic. Available at: [http://www.unaids.org/en/HIV\\_data/2006Global\\_Report/default.asp](http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006Global_Report/default.asp), accessed on February 2, 2007.
35. World Health Organization: Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings. Treatment guidelines for a public health approach. Geneva: Switzerland; 2005.

## **7. RESUMO DE RESULTADOS**

---

- ❖ Detecção do tropismo pela técnica de citometria de fluxo (FCTA)
  1. FCTA apresentou grande correlação estatística nos resultados de tropismo viral do VIH-1 em comparação com o teste Geno2pheno.
  2. FCTA mostrou ser um teste mais rápido e menos dispendioso para determinação do tropismo do VIH-1.
  3. Não foram encontradas significâncias estatísticas entre os níveis de linfócitos T CD4+ e o tropismo do VIH-1
  
- ❖ Determinação de carga proviral do HIV-1 por citometria de fluxo (FCPLA)
  1. Pacientes controladores de elite apresentam significativa diminuição da carga proviral em comparação com pacientes em TARV.
  2. A carga proviral não foi associada ao tropismo viral.
  3. A carga proviral foi mais baixa em pacientes com maior tempo de supressão da viremia plasmática.
  
- ❖ Valores de referência para subpopulações de linfócitos T em adultos e crianças no Brasil
  1. Os valores de referência para subpopulações de linfócitos T encontrados na população brasileira apresentaram-se maiores que os utilizados em populações norte-americanas e europeias.
  2. Hábitos comportamentais como o uso do fumo, podem alterar o número de células T entre os indivíduos.

3. Foram encontradas diferenças significantivas entre os valores de subpopulações de células T entre cidades brasileiras, possivelmente devido à diversidade genética e cultural entre as populações.

## **7. CONCLUSÃO**

---

A utilização da citometria de fluxo é uma alternativa viável, rápida e acurada para a detecção do tropismo do HIV-1, sendo ainda, efetora na mensuração de carga proviral do HIV-1, mesmo em pacientes com supressão da viremia plasmática. Existem variações significantes dos valores referenciais para as subpopulações de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ em comparação entre os diferentes estados brasileiros.

## 8. REFERÊNCIAS

---

1. Adams, M., L. Sharmeen, et al. Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.91, n.9, Apr 26, p.3862-6. 1994.
2. Allman, D. e S. Pillai. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol*, v.20, n.2, Apr, p.149-57. 2008.
3. Alter, G., N. Teigen, et al. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis*, v.195, n.10, May 15, p.1452-60. 2007.
4. Alugupalli, K. R., J. M. Leong, et al. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*, v.21, n.3, Sep, p.379-90. 2004.
5. Anastassopoulou, C. G., T. J. Ketas, et al. Resistance to CCR5 inhibitors caused by sequence changes in the fusion peptide of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.106, n.13, Mar 31, p.5318-23. 2009.
6. Archer, J., M. S. Braverman, et al. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *Aids*, v.23, n.10, Jun 19, p.1209-18. 2009.
7. Arhel, N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, v.7, p.96. 2006.
8. Arhel, N., S. Munier, et al. Nuclear import defect of human immunodeficiency virus type 1 DNA flap mutants is not dependent on the viral strain or target cell type. *J Virol*, v.80, n.20, Oct, p.10262-9. 2006.
9. Avelino-Silva, V. I., Y. L. Ho, et al. Aging and HIV infection. *Ageing Res Rev*, v.10, n.1, Jan, p.163-72. 2011.
10. Aw, D., A. B. Silva, et al. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*, v.120, n.4, Apr, p.435-46. 2007.

11. Baba, M., H. Miyake, et al. Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652. *Antimicrob Agents Chemother*, v.51, n.2, Feb, p.707-15. 2007.
12. Baltimore, D., I. M. Verma, et al. Temperature-sensitive DNA polymerase from Rous sarcoma virus mutants. *Cancer*, v.34, n.4 Suppl, Oct, p.suppl:1395-7. 1974.
13. Baral, S., F. Sifakis, et al. Elevated risk for HIV infection among men who have sex with men in low- and middle-income countries 2000-2006: a systematic review. *PLoS Med*, v.4, n.12, Dec, p.e339. 2007.
14. Bartlett, J.G.; Gallant, J.E.; Pham P *Medical Management of HIV Infection*, 15th ed.; Knowledge.Source Solutions: Baltimore, MD, USA, 2009
15. Barnett, T. e M. Weston. Wealth, health, HIV and the economics of hope. *Aids*, v.22 Suppl 2, Aug, p.S27-34. 2008
16. Basmaciogullari, S., G. J. Babcock, et al. Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for CXCR4 binding. *J Virol*, v.76, n.21, Nov, p.10791-800. 2002.
17. Bastos, F. I., C. Caceres, et al. AIDS in Latin America: assessing the current status of the epidemic and the ongoing response. *Int J Epidemiol*, v.37, n.4, Aug, p.729-37. 2008.
18. Bennett, D. E., R. J. Camacho, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*, v.4, n.3, p.e4724. 2009.
19. Berger, E. A. HIV entry and tropism. When one receptor is not enough. *Adv Exp Med Biol*, v.452, p.151-7. 1998.
20. Berger, E. A. Introduction: HIV co-receptors solve old questions and raise many new ones. *Semin Immunol*, v.10, n.3, Jun, p.165-8. 1998.
21. Berger, E. A., P. M. Murphy, et al. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, v.17, p.657-700. 1999.



22. Berro, R., R. W. Sanders, et al. Two HIV-1 variants resistant to small molecule CCR5 inhibitors differ in how they use CCR5 for entry. *PLoS Pathog*, v.5, n.8, Aug, p.e1000548. 2009.
23. Bertozzi, S., N. S. Padian, et al. *HIV/AIDS Prevention and Treatment*. 2006.
24. Bestilny, L. J., M. J. Gill, et al. Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection. *Aids*, v.14, n.7, May 5, p.771-80. 2000.
25. Bieniasz, P. D., R. A. Fridell, et al. HIV-1-induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *Embo J*, v.16, n.10, May 15, p.2599-609. 1997.
26. Bieniasz, P. D., R. A. Fridell, et al. Murine CXCR-4 is a functional coreceptor for T-cell-tropic and dual-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, v.71, n.9, Sep, p.7097-100. 1997.
27. Biscone, M. J., J. L. Miamidian, et al. Functional impact of HIV coreceptor-binding site mutations. *Virology*, v.351, n.1, Jul 20, p.226-36. 2006.
28. Bismara, Beatriz Aparecida Passos. *Padronização de Técnicas Moleculares para o Estudo da Resistência a Drogas Antiretrovirais em Crianças Infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) Via Perinatal*. 2006. 166 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
29. Bisset, L. R., T. L. Lung, *et al.* Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*, v.72, n.3, Mar, p.203-12. 2004.
30. Blanpain, C., J. M. Vanderwinden, et al. Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. *Mol Biol Cell*, v.13, n.2, Feb, p.723-37. 2002.
31. Bouhlal, H., H. Hocini, et al. Antibodies to C-C chemokine receptor 5 in normal human IgG block infection of macrophages and lymphocytes with primary R5-tropic strains of HIV-1. *J Immunol*, v.166, n.12, Jun 15, p.7606-11. 2001.

32. Bouhlal H, Latry V, Requena M, Aubry S, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Belec L, Hocini H: Natural antibodies to CCR5 from breast milk block infection of macrophages and dendritic cells with primary R5-tropic HIV-1. *J Immunol* 2005, 174:7202-9.
33. Brelot, A., N. Heveker, et al. Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *J Virol*, v.73, n.4, Apr, p.2576-86. 1999.
34. Briggs, J. A., M. N. Simon, et al. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol*, v.11, n.7, Jul, p.672-5. 2004.
35. Briggs, J. A., T. Wilk, et al. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J*, v.22, n.7, Apr 1, p.1707-15. 2003.
36. Brinchmann, J. E., G. Gaudernack, et al. CD8+ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. *J Immunol*, v.144, n.8, Apr 15, p.2961-6. 1990.
37. Briz, V., E. Poveda, et al. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother*, v.57, n.4, Apr, p.619-27. 2006.
38. Caceres, C. F., K. Konda, et al. Epidemiology of male same-sex behaviour and associated sexual health indicators in low- and middle-income countries: 2003-2007 estimates. *Sex Transm Infect*, v.84 Suppl 1, Aug, p.i49-i56. 2008.
39. Casau, N. C. Perspective on HIV infection and aging: emerging research on the horizon. *Clin Infect Dis*, v.41, n.6, Sep 15, p.855-63. 2005.
40. Chabot, S., L. Salez, et al. Surfactant protein A inhibits lipopolysaccharide-induced in vivo production of interleukin-10 by mononuclear phagocytes during lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.28, n.3, Mar, p.347-53. 2003.
41. Chambers, P., C. R. Pringle, et al. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol*, v.71 ( Pt 12), Dec, p.3075-80. 1990.

42. Chan, D. C., D. Fass, et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, v.89, n.2, Apr 18, p.263-73. 1997.
43. Choi, J. Y., J. Zhou, et al. Predictors and outcomes of HIV-infected antiretroviral-naive patients with discordant responses to combination antiretroviral treatment in Asian and Australian populations: results from APHOD. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.57, n.1, May, p.e13-5. 2011.
44. Cocchi, F., A. L. Devico, et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, v.270, n.5243, Dec 15, p.1811-5. 1995.
45. Collier, A. C., R. W. Coombs, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral response of CD4-immunoglobulin G by intravenous bolus in AIDS and AIDS-related complex. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v.10, n.2, Oct 1, p.150-6. 1995.
46. Colman, P. M. e M. C. Lawrence. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.4, n.4, Apr, p.309-19. 2003.
47. Connor, R. I., K. E. Sheridan, et al. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med*, v.185, n.4, Feb 17, p.621-8. 1997.
48. Cooper, G. S. e D. J. Jeffers. The clinical prognosis of HIV-1 infection: a review of 32 follow-up studies. *J Gen Intern Med*, v.3, n.6, Nov-Dec, p.525-32. 1988.
49. Cormier, E. G. e T. Dragic. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol*, v.76, n.17, Sep, p.8953-7. 2002.
50. Daecke, J., O. T. Fackler, et al. Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, v.79, n.3, Feb, p.1581-94. 2005.
51. De Clercq E. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 1800-22

52. De Parseval, A. e J. H. Elder. Binding of recombinant feline immunodeficiency virus surface glycoprotein to feline cells: role of CXCR4, cell-surface heparans, and an unidentified non-CXCR4 receptor. *J Virol*, v.75, n.10, May, p.4528-39. 2001.
53. De Parseval, A., D. L. Lerner, et al. Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J Virol*, v.71, n.8, Aug, p.5742-9. 1997.
54. Derhovanessian, E., A. Larbi, et al. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol*, v.21, n.4, Aug, p.440-5. 2009.
55. Doria-Rose, N. A. HIV neutralizing antibodies: clinical correlates and implications for vaccines. *J Infect Dis*, v.201, n.7, Apr 1, p.981-3. 2010.
56. Dorr, P., M. Westby, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*, v.49, n.11, Nov, p.4721-32. 2005.
57. Douek, D. C. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev*, v.5, n.3, Jul-Sep, p.172-7. 2003.
58. Douek, D. C., J. M. Brenchley, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*, v.417, n.6884, May 2, p.95-8. 2002.
59. Douek, D. C., R. D. McFarland, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, v.396, n.6712, Dec 17, p.690-5. 1998.
60. Dragic, T., A. Trkola, et al. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, v.72, n.1, Jan, p.279-85. 1998.
61. Duan, B. e L. Morel. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, v.5, n.6, Jul, p.403-8. 2006.
62. Earl, P. L., C. Cotter, et al. Design and evaluation of multi-gene, multi-clade HIV-1 MVA vaccines. *Vaccine*, v.27, n.42, Sep 25, p.5885-95. 2009.

63. Edinger, A. L., T. L. Hoffman, et al. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol*, v.72, n.10, Oct, p.7934-40. 1998.
64. Effros, R. B., C. V. Fletcher, et al. Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis*, v.47, n.4, Aug 15, p.542-53. 2008.
65. Eslahpazir, J., M. A. Jenabian, et al. Infection of macrophages and dendritic cells with primary R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 inhibited by natural polyreactive anti-CCR5 antibodies purified from cervicovaginal secretions. *Clin Vaccine Immunol*, v.15, n.5, May, p.872-84. 2008.
66. Esplin, B. L., R. S. Welner, et al. A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.106, n.14, Apr 7, p.5773-8. 2009.
67. Fakoya, A., H. Lamba, et al. British HIV Association, BASHH and FSRH guidelines for the management of the sexual and reproductive health of people living with HIV infection 2008. *HIV Med*, v.9, n.9, Oct, p.681-720. 2008.
68. Farzan, M., T. Mirzabekov, et al. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*, v.96, n.5, Mar 5, p.667-76. 1999.
69. Feng, Y. X., T. D. Copeland, et al. HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.93, n.15, Jul 23, p.7577-81. 1996.
70. Forshey, B. M., U. Von Schwedler, et al. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol*, v.76, n.11, Jun, p.5667-77. 2002.
71. Frisch, M., R. J. Biggar, et al. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *Jama*, v.285, n.13, Apr 4, p.1736-45. 2001.
72. Girardi, E., C. A. Sabin, et al. Late diagnosis of HIV infection: epidemiological features, consequences and strategies to encourage earlier testing. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.46 Suppl 1, Sep, p.S3-8. 2007.

73. Glass, W. G., D. H. McDermott, et al. CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med*, v.203, n.1, Jan 23, p.35-40. 2006.
74. Goetz, M. B., R. Leduc, et al. Relationship between HIV coreceptor tropism and disease progression in persons with untreated chronic HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.50, n.3, Mar 1, p.259-66. 2009.
75. Gonzalez-Serna, A., M. Leal, et al. TROCAI (tropism coreceptor assay information): a new phenotypic tropism test and its correlation with Trofile enhanced sensitivity and genotypic approaches. *J Clin Microbiol*, v.48, n.12, Dec, p.4453-8. 2010.
76. Green, M. J., S. Fong, et al. Rationing HIV medications: what do patients and the public think about allocation policies? *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.26, n.1, Jan 1, p.56-62. 2001.
77. Grene, E., L. A. Pinto, et al. Increased levels of anti-CCR5 antibodies in sera from individuals immunized with allogeneic lymphocytes. *Aids*, v.14, n.16, Nov 10, p.2627-8. 2000.
78. Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, et al. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med*, v.8, n.4, Apr, p.319-23. 2002.
79. Gulick, R. M., J. Lalezari, et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med*, v.359, n.14, Oct 2, p.1429-41. 2008.
80. Guo, X., M. Kameoka, et al. Suppression of an intrinsic strand transfer activity of HIV-1 Tat protein by its second-exon sequences. *Virology*, v.307, n.1, Mar 1, p.154-63. 2003.
81. Hall, H. I., R. H. Byers, et al. Racial/ethnic and age disparities in HIV prevalence and disease progression among men who have sex with men in the United States. *Am J Public Health*, v.97, n.6, Jun, p.1060-6. 2007.
82. Hall, H. I., R. Song, et al. Estimation of HIV incidence in the United States. *Jama*, v.300, n.5, Aug 6, p.520-9. 2008.

83. Hill, C.M.; Deng, H.; Unutmaz, D.; Kewalramani, V.N.; Bastiani, L.; Gorny, M.K.; Zolla-Pazner, S.; Littman, D.R. Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and mediated CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *J. Virol.* **1997**, *71*, 6296-6304.
84. Hamers, F. F. e A. N. Phillips. Diagnosed and undiagnosed HIV-infected populations in Europe. *HIV Med*, v.9 Suppl 2, Jul, p.6-12. 2008.
85. Hammer, S. M., J. J. Eron, Jr., et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *Jama*, v.300, n.5, Aug 6, p.555-70. 2008.
86. Hartley, C., K. Pretorius, et al. Maternal postpartum depression and infant social withdrawal among human immunodeficiency virus (HIV) positive mother-infant dyads. *Psychol Health Med*, v.15, n.3, May, p.278-87. 2010.
87. Hatse, S., G. Bridger, et al. X4 HIV-1 induces neuroblastoma cell death by interference with CXCL12/CXCR4 interaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, v.49 Online Pub, p.OL443-52. 2003.
88. Haynes, L. e A. C. Maue. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol*, v.21, n.4, Aug, p.414-7. 2009.
89. Haynes, L., S. M. Eaton, et al. CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.25, Dec 9, p.15053-8. 2003.
90. Hazenberg, M. D., D. Hamann, et al. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol*, v.1, n.4, Oct, p.285-9. 2000.
91. Hendrix, C. W., A. C. Collier, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.37, n.2, Oct 1, p.1253-62. 2004.
92. Hernanz-Falcon, P., J. M. Rodriguez-Frade, et al. Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat Immunol*, v.5, n.2, Feb, p.216-23. 2004.

93. Holodick, N. E., K. Repetny, et al. Adult BM generates CD5+ B1 cells containing abundant N-region additions. *Eur J Immunol*, v.39, n.9, Sep, p.2383-94. 2009.
94. Hsu, T. W., J. L. Sabran, et al. Analysis of unintegrated avian RNA tumor virus double-stranded DNA intermediates. *J Virol*, v.28, n.3, Dec, p.810-8. 1978.
95. Huang, C. C., S. N. Lam, et al. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science*, v.317, n.5846, Sep 28, p.1930-4. 2007.
96. Huang, J., C. M. Yang, et al. A novel real-time multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of HIV-1 RNA by using dual-specific armored RNA as internal control. *Intervirology*, v.51, n.1, p.42-9. 2008.
97. Huang, Y. T., A. Wright, et al. Intraepithelial cell neutralization of HIV-1 replication by IgA. *J Immunol*, v.174, n.8, Apr 15, p.4828-35. 2005.
98. Hwang, S. S., T. J. Boyle, et al. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*, v.253, n.5015, Jul 5, p.71-4. 1991.
99. Issafras, H., S. Angers, et al. Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem*, v.277, n.38, Sep 20, p.34666-73. 2002.
100. Ivey-Hoyle, M., J. S. Culp, et al. Envelope glycoproteins from biologically diverse isolates of immunodeficiency viruses have widely different affinities for CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.88, n.2, Jan 15, p.512-6. 1991.
- 101.
102. Jenkinson, S., M. Thomson, et al. Blockade of X4-tropic HIV-1 cellular entry by GSK812397, a potent noncompetitive CXCR4 receptor antagonist. *Antimicrob Agents Chemother*, v.54, n.2, Feb, p.817-24. 2005.
103. Ikinciogullari, A., T. Kendirli, et al. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *Turk J Pediatr*, v.46, n.2, Apr-Jun, p.125-30. 2004.



104. Jensen, M. A., M. Coetzer, et al. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol*, v.80, n.10, May, p.4698-704. 2006.
105. Kang, E., D. S. Lee, et al. Age-associated changes of cerebral glucose metabolic activity in both male and female deaf children: parametric analysis using objective volume of interest and voxel-based mapping. *Neuroimage*, v.22, n.4, Aug, p.1543-53. 2004.
106. Kewenig, S., T. Schneider, et al. Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology*, v.116, n.5, May, p.1115-23. 1999.
107. Kerr, L. Comportamento, atitudes, práticas e prevalência de HIV e sífilis entre homens que fazem sexo com homens (HSH) em 10 cidades brasileiras. Relatório técnico entregue ao Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2009.
108. Kieffer, T. L., M. M. Finucane, et al. Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads. *J Infect Dis*, v.189, n.8, Apr 15, p.1452-65. 2004.
109. Kissin, D. M., L. Zapata, et al. HIV seroprevalence in street youth, St. Petersburg, Russia. *Aids*, v.21, n.17, Nov 12, p.2333-40. 2007.
110. Kondru, R., J. Zhang, et al. Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol Pharmacol*, v.73, n.3, Mar, p.789-800. 2008.
111. Krausslich, H. G., M. Facke, et al. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J Virol*, v.69, n.6, Jun, p.3407-19. 1995.
112. Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure*, v.8, n.12, Dec 15, p.1329-39. 2000.

113. Kwong, P. D., R. Wyatt, et al.. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, v.393, n.6686, Jun 18, p.648-59. 1998.
114. Landovitz, R. J. e J. S. Currier. Clinical practice. Postexposure prophylaxis for HIV infection. *N Engl J Med*, v.361, n.18, Oct 29, p.1768-75. 2009.
115. Landovitz, R. J. Updated guideline for occupational postexposure prophylaxis for HIV. *AIDS Clin Care*, v.20, n.2, Feb, p.15. 2008.
116. Larosa, G. J., J. P. Davide, et al. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science*, v.249, n.4971, Aug 24, p.932-5. 1990.
117. Lee, B., M. Sharron, et al. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.9, Apr 27, p.5215-20. 1999.
118. Leng, Q., G. Borkow, et al. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.27, n.4, Aug 1, p.389-97. 2001.
119. Levy, J. A. The multifaceted retrovirus. *Cancer Res*, v.46, n.11, Nov, p.5457-68. 1986.
120. Li, F., R. Goila-Gaur, et al. PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.23, Nov 11, p.13555-60. 2003.
121. Lin, N. H. e D. R. Kuritzkes. Tropism testing in the clinical management of HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS*, v.4, n.6, Nov, p.481-7. 2009.
122. Lobritz, M. A., A. N. Ratcliff, et al. HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. *Viruses*, v.2, n.5, May, p.1069-105. 2010.
123. Lopalco, L. CCR5: From Natural Resistance to a New Anti-HIV Strategy. *Viruses*, v.2, n.2, Feb, p.574-600. 2010.

124. Lopalco, L., C. Barassi, et al. CCR5-reactive antibodies in seronegative partners of HIV-seropositive individuals down-modulate surface CCR5 in vivo and neutralize the infectivity of R5 strains of HIV-1 In vitro. *J Immunol*, v.164, n.6, Mar 15, p.3426-33. 2000.
125. Lu, L., M. Jia, et al. The changing face of HIV in China. *Nature*, v.455, n.7213, Oct 2, p.609-11. 2008.
126. Madani, N., A. L. Perdigoto, et al. Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. *J Virol*, v.78, n.7, Apr, p.3742-52. 2004.
127. Maeda, M., H. Sawa, et al. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes Infect*, v.8, n.11, Sep, p.2647-56. 2006.
128. Mah, T. L. e D. T. Halperin. Concurrent sexual partnerships and the HIV epidemics in Africa: evidence to move forward. *AIDS Behav*, v.14, n.1, Feb, p.11-6; dicussion 34-7. 2010.
129. Marks, G., N. Crepaz, et al. Estimating sexual transmission of HIV from persons aware and unaware that they are infected with the virus in the USA. *Aids*, v.20, n.10, Jun 26, p.1447-50. 2006.
130. Mathers, B. M., L. Degenhardt, et al. Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review. *Lancet*, v.372, n.9651, Nov 15, p.1733-45. 2008.
131. Matthys, P., S. Hatse, et al. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol*, v.167, n.8, Oct 15, p.4686-92. 2001.
132. Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, et al. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*, v.151, n.2, Oct 16, p.413-23. 2000.
133. Mens, H., M. Kearney, et al. HIV-1 continues to replicate and evolve in patients with natural control of HIV infection. *J Virol*, v.84, n.24, Dec, p.12971-81. 2010.

134. Meyaard, L., H. Schuitemaker, et al. T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunol Today*, v.14, n.4, Apr, p.161-4. 1993.
135. Miller, R. A., G. Garcia, et al. Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol Rev*, v.160, Dec, p.79-90. 1997.
136. Miyauchi, K., Y. Kim, et al. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*, v.137, n.3, May 1, p.433-44. 2009.
137. Monforte, A., D. Abrams, et al. HIV-induced immunodeficiency and mortality from AIDS-defining and non-AIDS-defining malignancies. *Aids*, v.22, n.16, Oct 18, p.2143-53. 2008.
138. Moore, R. D., J. C. Keruly, et al. Differences in HIV disease progression by injecting drug use in HIV-infected persons in care. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.35, n.1, Jan 1, p.46-51. 2004.
139. Moreno, A., C. Quereda, et al. Safe co-administration of raltegravir, pegylated-interferon and, ribavirin in HIV individuals with hepatitis C virus-related liver damage. *Aids*, v.24, n.8, May 15, p.1231-3. 2010.
140. Moreno, S., J. Lopez Aldeguer, et al. The future of antiretroviral therapy: challenges and needs. *J Antimicrob Chemother*, v.65, n.5, May, p.827-35. 2011.
141. Moulard, M. e E. Decroly. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta*, v.1469, n.3, Nov 10, p.121-32. 2000.
142. Moyle, G., E. Dejesus, et al. Proof of activity with AMD11070, an orally bioavailable inhibitor of CXCR4-tropic HIV type 1. *Clin Infect Dis*, v.48, n.6, Mar 15, p.798-805. 2009.
143. Murakami, T., S. Kumakura, et al. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob Agents Chemother*, v.53, n.7, Jul, p.2940-8. 2009.

144. Murphy, D. A., K. J. Roberts, et al. Barriers to antiretroviral adherence among HIV-infected adults. *AIDS Patient Care STDS*, v.14, n.1, Jan, p.47-58. 2000.
145. Myszka, D. G., R. W. Sweet, et al. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.97, n.16, Aug 1, p.9026-31. 2000.
146. Nabatov, A. A., A. E. Masharsky, et al. Host-dependent serum specificity to the V3 domain of HIV-1. *Scand J Immunol*, v.60, n.5, Nov, p.471-6. 2004.
147. Nel, A. E. e N. Slaughter. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, v.109, n.6, Jun, p.901-15. 2002.
148. Oberlin, E., A. Amara, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, v.382, n.6594, Aug 29, p.833-5. 1996.
149. Ogert, R. A., Y. Hou, et al. Clinical resistance to vicriviroc through adaptive V3 loop mutations in HIV-1 subtype D gp120 that alter interactions with the N-terminus and ECL2 of CCR5. *Virology*, v.400, n.1, Apr 25, p.145-55. 2010.
150. Ometto, L., R. Bertorelle, et al. Polymorphisms in the CCR5 promoter region influence disease progression in perinatally human immunodeficiency virus type 1-infected children. *J Infect Dis*, v.183, n.5, Mar 1, p.814-8. 2001.
151. Ottoson D. State-sponsored Homophobia: A world survey of laws prohibiting same sex activity between consenting adults. *International Lesbian and Gay Association* 2007 April;:2007.
152. Palmer, N. B., J. Salcedo, et al. Psychiatric and social barriers to HIV medication adherence in a triply diagnosed methadone population. *AIDS Patient Care STDS*, v.17, n.12, Dec, p.635-44. 2003.
153. Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. Recomendaciones de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (actualización febrero de 2009). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 222–35

154. Pawelec, G., E. Derhovanessian, et al. Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Rev Med Virol*, v.19, n.1, Jan, p.47-56. 2009.
155. Perelson, A. S. Modelling viral and immune system dynamics. *Nat Rev Immunol*, v.2, n.1, Jan, p.28-36. 2002.
156. Pettifor, A. E., H. V. Rees, et al. Young people's sexual health in South Africa: HIV prevalence and sexual behaviors from a nationally representative household survey. *Aids*, v.19, n.14, Sep 23, p.1525-34. 2005.
157. Pettifor, A. E., M. G. Hudgens, et al. Highly efficient HIV transmission to young women in South Africa. *Aids*, v.21, n.7, Apr 23, p.861-5. 2007.
158. Pfaff, J. M., C. B. Wilen, et al. HIV-1 resistance to CCR5 antagonists associated with highly efficient use of CCR5 and altered tropism on primary CD4+ T cells. *J Virol*, v.84, n.13, Jul, p.6505-14. 2010.
159. Piazza, P., Z. Fan, et al. CD8+ T-cell immunity to HIV infection. *Clin Lab Med*, v.22, n.3, Sep, p.773-97. 2002.
160. Picardi, M., R. Morante, et al. Ultrasound exploration in the work-up of unexplained fever in the immunocompromized host: preliminary observations. *Haematologica*, v.82, n.4, Jul-Aug, p.455-57. 1997.
161. Poveda, E., E. Seclen, et al. Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists. *J Antimicrob Chemother*, v.63, n.5, May, p.1006-10. 2009.
162. Quan, C. P., A. Berneman, et al. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infect Immun*, v.65, n.10, Oct, p.3997-4004. 1997.
163. Quinn, T. C. e D. Serwadda. The future of HIV/AIDS in Africa: a shared responsibility. *Lancet*, v.377, n.9772, Apr 2, p.1133-4. 2000.
164. Racine, R. e G. M. Winslow. IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol Lett*, v.125, n.2, Aug 15, p.79-85. 2009.

165. Raymond, S., P. Delobel, et al. Prediction of HIV type 1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.53, n.2, Feb, p.167-75. 2010.
166. Reeves, J. D., S. A. Gallo, et al. Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.25, Dec 10, p.16249-54. 2002.
167. Richardson, B. A., C. S. Morrison, et al. Effect of intrauterine device use on cervical shedding of HIV-1 DNA. *Aids*, v.13, n.15, Oct 22, p.2091-7. 1999.
168. Rizzuto, C. e J. Sodroski. Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.16, n.8, May 20, p.741-9. 2000.
169. Rose, J. D., A. M. Rhea, et al. Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. *Curr Opin HIV AIDS*, v.4, n.2, Mar, p.136-42. 2009.
170. Rosenberg, Y. J., F. Nurse, et al. IL-2 receptor expression in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. The expanded L3T4-, Lyt-2- population does not express p75 and cannot generate functional high-affinity IL-2 receptors. *J Immunol*, v.143, n.7, Oct 1, p.2216-22. 1989.
171. Rosenkilde, M. M., L. O. Gerlach, et al. Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor. *J Biol Chem*, v.279, n.4, Jan 23, p.3033-41. 2004.
172. Roussanov, B. V., J. M. Taylor, et al. Calculation and use of an HIV-1 disease progression score. *Aids*, v.14, n.17, Dec 1, p.2715-22. 2000.
173. Saha, K., J. Zhang, et al. Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat Med*, v.7, n.1, Jan, p.65-72. 2001.
174. Sander, O., T. Sing, et al. Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput Biol*, v.3, n.3, Mar 30, p.e58. 2007.

175. Santagostino, A., G. Garbaccio, *et al.* An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica*, v.84, n.6, Jun, p.499-504. 1999
176. Schnittman, S. M., M. C. Psallidopoulos, *et al.* The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science*, v.245, n.4915, Jul 21, p.305-8. 1989.
177. Schooley, R. T., T. C. Merigan, *et al.* Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I-II escalating dosage trial. *Ann Intern Med*, v.112, n.4, Feb 15, p.247-53. 1990.
178. Scotton, C. J., J. L. Wilson, *et al.* Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res*, v.62, n.20, Oct 15, p.5930-8. 2002.
179. Shank, P. R., S. H. Hughes, *et al.* Mapping unintegrated avian sarcoma virus DNA: termini of linear DNA bear 300 nucleotides present once or twice in two species of circular DNA. *Cell*, v.15, n.4, Dec, p.1383-95. 1978.
180. Shen, R., G. Meng, *et al.* Stromal down-regulation of macrophage CD4/CCR5 expression and NF-kappaB activation mediates HIV-1 non-permissiveness in intestinal macrophages. *PLoS Pathog*, v.7, n.5, May, p.e1002060. 2011.
181. Shisana, O., C. Connolly, *et al.* HIV risk exposure among South African children in public health facilities. *AIDS Care*, v.20, n.7, Aug, p.755-63. 2008.
182. Smith, J. H. e A. Whiteside. The history of AIDS exceptionalism. *J Int AIDS Soc*, v.13, p.47. 2010.
183. Squires, K. E. An introduction to nucleoside and nucleotide analogues. *Antivir Ther*, v.6 Suppl 3, p.1-14. 2001.
184. Staszewski, S., J. Morales-Ramirez, *et al.* Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med*, v.341, n.25, Dec 16, p.1865-73. 1999.



185. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*, v.9, n.7, Jul, p.853-60. 2003.
186. Su, Q. J., P. Zhou, et al. [A nested multiplex PCR assay for rapid subtyping the prevailing HIV-1 strains in Guangxi]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, v.23, n.6, Dec, p.482-4. 2009.
187. Sundstrom, M., R. L. White, et al. Mapping of the CXCR4 binding site within variable region 3 of the feline immunodeficiency virus surface glycoprotein. *J Virol*, v.82, n.18, Sep, p.9134-42. 2008.
188. Suphaphiphat, P., M. Essex, et al. Mutations in the V3 stem versus the V3 crown and C4 region have different effects on the binding and fusion steps of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with the CCR5 coreceptor. *Virology*, v.360, n.1, Mar 30, p.182-90. 2007.
189. Szwarcwald, C. L., A. Barbosa Junior, et al. HIV testing during pregnancy: use of secondary data to estimate 2006 test coverage and prevalence in Brazil. *Braz J Infect Dis*, v.12, n.3, Jun, p.167-72. 2008.
190. Szwarcwald, C. L., M. F. De Carvalho, et al. Temporal trends of HIV-related risk behavior among Brazilian military conscripts, 1997-2002. *Clinics (Sao Paulo)*, v.60, n.5, Oct, p.367-74. 2005.
191. Thio, C. L., J. Astemborski, et al. Genetic protection against hepatitis B virus conferred by CCR5Delta32: Evidence that CCR5 contributes to viral persistence. *J Virol*, v.81, n.2, Jan, p.441-5. 2007.
192. Tilton, J. C., C. B. Wilen, et al. A maraviroc-resistant HIV-1 with narrow cross-resistance to other CCR5 antagonists depends on both N-terminal and extracellular loop domains of drug-bound CCR5. *J Virol*, v.84, n.20, Oct, p.10863-76. 2010.
193. Tomaras, G. D., N. L. Yates, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol*, v.82, n.24, Dec, p.12449-63. 2008.

194. Torres, A. J., Angelo A.L.D., *et al.* Reference range for T lymphocytes populations in blood donors from two different regions in Brazil. Braz J Infect Dis, v.13, n.3, Jun, p.221-5. 2009.
195. Trauneker, A., J. Schneider, *et al.* Highly efficient neutralization of HIV with recombinant CD4-immunoglobulin molecules. *Nature*, v.339, n.6219, May 4, p.68-70. 1989.
196. Veazey, R. S., M. Demaria, *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*, v.280, n.5362, Apr 17, p.427-31. 1998.
197. Verani, A., F. Sironi, *et al.* Inhibition of CXCR4-tropic HIV-1 infection by lipopolysaccharide: evidence of different mechanisms in macrophages and T lymphocytes. *J Immunol*, v.168, n.12, Jun 15, p.6388-95. 2002.
198. Vrisekoop, N., J. N. Mandl, *et al.* Life and death as a T lymphocyte: from immune protection to HIV pathogenesis. *J Biol*, v.8, n.10, p.91. 2009.
199. Wang, L., N. Wang, *et al.* The 2007 Estimates for People at Risk for and Living With HIV in China: Progress and Challenges. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.50, n.4, Apr 1, p.414-8. 2009.
200. Watson, C., S. Jenkinson, *et al.* The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor. *Mol Pharmacol*, v.67, n.4, Apr, p.1268-82. 2005.
201. Weiss, H. A., D. Halperin, *et al.* Male circumcision for HIV prevention: from evidence to action? *Aids*, v.22, n.5, Mar 12, p.567-74. 2008.
202. Weiss, R. A. Introduction to oncogenesis by RNA tumor viruses. *Haematol Blood Transfus*, v.23, p.423-7. 1979.
203. Whitcomb, J. M., W. Huang, *et al.* Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother*, v.51, n.2, Feb, p.566-75. 2007.

204. Whitmore, A. C., H. R. Neely, et al. Rapid induction of splenic and peritoneal B-1a cells in adult mice by thymus-independent type-2 antigen. *J Immunol*, v.173, n.9, Nov 1, p.5406-14. 2004.
205. Wieggers, K., G. Rutter, et al. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol*, v.72, n.4, Apr, p.2846-54. 1998.
206. Wilkins, E. The current role of ritonavir-boosted protease inhibitors in the management of HIV infection. *J HIV Ther*, v.13, n.1, Mar, p.9-18. 2008.
207. Willett, B. J., J. N. Flynn, et al. FIV infection of the domestic cat: an animal model for AIDS. *Immunol Today*, v.18, n.4, Apr, p.182-9. 1997.
208. Willett, B. J., K. Adema, et al. The second extracellular loop of CXCR4 determines its function as a receptor for feline immunodeficiency virus. *J Virol*, v.72, n.8, Aug, p.6475-81. 1998.
209. Wilson, C. M., P. F. Wright, et al. Epidemiology of HIV infection and risk in adolescents and youth. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.54 Suppl 1, Jul, p.S5-6. 2010.
210. Zhang, D., P. Bi, et al. Changes in HIV prevalence and sexual behavior among men who have sex with men in a northern Chinese city: 2002-2006. *J Infect*, v.55, n.5, Nov, p.456-63. 2007.
211. Zhong, X., S. Lau, et al. A novel subpopulation of B-1 cells is enriched with autoreactivity in normal and lupus-prone mice. *Arthritis Rheum*, v.60, n.12, Dec, p.3734-43. 2009.
212. Zhou, J., X. Yuan, et al. Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by specific targeting of the final step of virion maturation. *J Virol*, v.78, n.2, Jan, p.922-9. 2004.
213. Zhou, T., L. Xu, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature*, v.445, n.7129, Feb 15, p.732-7. 2007.

214. Zhu, P., E. Chertova, et al. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.26, Dec 23, p.15812-7. 2003.
215. World Health Organization. AIDS epidemic update. 2009 Nov [Accessed March2010].[http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700\\_Epi\\_Update\\_2009\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf)