

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



O receptor das quimiocinas CCR8 – sua relevância como co-receptor alternativo para isolados primários de HIV-1 e HIV-2

Ana Marta Carvalho Calado

Curso de Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Lisboa, 2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



O receptor das quimiocinas CCR8 – sua relevância como co-receptor alternativo para isolados primários de HIV-1 e HIV-2

Ana Marta Carvalho Calado

Orientador: Prof. Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Co-orientador: Prof.^a Doutora Emília Valadas

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

Curso de Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Lisboa, 2011

**Esta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da
Universidade de Lisboa em reunião de 26 de Outubro de 2011.**

**APRESENTAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO
DESTE TRABALHO:**

Ana Marta Calado, Paula Cristina Matoso, Maria Espírito Santo, Quirina Santos-Costa, João Machado, Francisco Antunes, Fernando Maltez, Maria Odette Santos-Ferreira, José Miguel Azevedo-Pereira. 2008. Utilização do co-receptor alternativo CCR8 por parte de amostras sequenciais de HIV-2. Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, SIDA e Parasitologia, Vilamoura, Portugal, 8-11 de Outubro, pág 20.

Ana Marta Calado, Maria Espírito Santo, Quirina Santos-Costa, João Machado, Francisco Antunes, Fernando Maltez, Maria Odette Santos-Ferreira, José Miguel Azevedo-Pereira. 2008. CCR8- an alternative co-receptor of HIV-2 infection. XVIth National Congresso f Biochemistry, Ponta Delgada, São Miguel, Açores, 22-25 de Outubro, pág 256.

Ana Marta Calado, Maria Espírito Santo, Paula Cristina Matoso, Quirina Santos-Costa, João Machado, Francisco Antunes, Fernando Maltez, Lino Rosado, Maria Odette Santos-Ferreira, José Miguel Azevedo-Pereira. 2009. Importance of C-C chemokine receptor 8 (CCR8) as na alternative coreceptor for HIV-1 and HIV-2. Congresso MicroBiotec'09, Vilamoura, Portugal, 28-30 Novembro, pág 222.

Calado M, Matoso P, Santos-Costa Q, Machado J, Antunes F, Maltez F, Rosado L Santos-Ferreira MO, Azevedo-Pereira JM. 2010. HIV interaction with target cell: the relevance of CCR8 chemokine receptor as coreceptor for HIV-1 and HIV-2. Current Opinion in Cellular Host-Pathogen Interactions, Amsterdam, The Netherlands, September 5-7, pág 109.

Calado M, Matoso P, Santos-Costa Q, Espirito-Santo M, Machado J, Rosado L, et al. 2010. Coreceptor usage by HIV-1 and HIV-2 primary isolates: The relevance of CCR8 chemokine receptor as an alternative coreceptor. Virology. 408(2):174-182.

AGRADECIMENTOS

O meu especial agradecimento vai para o meu orientador Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira, por me ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, por me aconselhar e acompanhar, pela paciência e sobretudo por acreditar em mim. Obrigada pela sua excelente orientação e revisão deste manuscrito. Não me esqueço da oportunidade que me deu para voltar a integrar o grupo de trabalho.

À Professora Doutora Emília Valadas, co-orientadora desta tese, pela simpatia, disponibilidade e pela revisão do manuscrito.

Um agradecimento muito especial às minhas ex-colegas Paula Matoso e Ana Rudolfo por me terem recebido tão bem no laboratório e por me terem ensinado tanto!

À minha colega caladinha Camila, por me aturar! Foram tantas as vezes que ela me ouviu falar sozinha...

À Manela, amiga, primita, obrigada por...TUDO! És um exemplo a seguir!

Às minhas ex-colegas e amigas, Maria, Marta Simões e Paula Cerejo, pelo apoio, pelos bons (e às vezes menos bons) momentos, obrigada pelos conselhos e puxões de orelhas, e sobretudo obrigada pelas gargalhadas! Tenho saudades vossas!

Aos meus colegas do departamento de Virologia, Cheila, Inês, Pedro, Marcelino, Andreia, Rita, João, Carla, Cláudia e Quirina, por contribuírem para o bom ambiente e pela ajuda e amizade.

À Lavinia pelo espírito sempre bem-disposto e pelas boas conversas!

D.Helena Brás, D.Vera, D. Teresa e Sr. Augusto, pela boa disposição e por toda a ajuda que sempre me deram.

Ofélia, obrigada por todas as vezes que me ouviu (e ainda vai ouvir) e pelas sábias palavras!
Encontramos amigos onde por vezes não esperamos!

À minha mãe um obrigado do tamanho do mundo! Sei que sem o apoio dela nunca teria conseguido chegar até aqui! É uma lutadora, nunca desiste de nada! Ao meu irmão por me aturar como é obrigação do mano mais velho!

Pedro sabes que és fantástico? Sem o teu apoio incondicional seria tudo muito mais difícil!
Para além de tudo o resto és o meu melhor amigo! Sempre que chorei tive o teu ombro, sempre que ri, riste comigo, curaste a minha ansiedade com a tua calma, e juntaste a tua loucura à minha!

Dedico esta tese à minha mãe!

RESUMO

O ciclo de replicação do HIV na célula do hospedeiro começa com a ligação da glicoproteína de superfície viral ao receptor CD4 e aos receptores das quimiocinas (co-receptores) presentes na membrana das células.

Com este trabalho pretendemos avaliar a contribuição do CCR8 como co-receptor alternativo para os isolados de HIV-1 e HIV-2 e caracterizar a capacidade para infectar macrófagos derivados de monócitos (MDM), por parte dos isolados que venham a revelar capacidade para utilizar este co-receptor. Tentou-se ainda estabelecer uma correlação entre o co-receptor utilizado e os dados imunológicos e clínicos dos indivíduos a partir dos quais os vírus foram isolados.

Os resultados obtidos demonstraram que o CCR8 é eficientemente utilizado não apenas por isolados de HIV-2, mas particularmente por isolados de HIV-1. Observámos também que o uso do CXCR4, isoladamente ou em conjunto com o CCR5 e/ou CCR8, foi mais frequentemente observado em isolados de HIV-1 do que de HIV-2. Directamente relacionado com isso é a constatação de que a não utilização do CXCR4 é significativamente mais comum em isolados HIV-2; ambos os resultados podem ser associados com a progressão mais lenta para a doença, geralmente observada em indivíduos infectados com HIV-2. A capacidade de alguns isolados virais para utilizarem co-receptores alternativos, para além do CCR5 e CXCR4, pode ter impacto na eficácia da terapêutica com inibidores de entrada e possivelmente também na patogénese do HIV.

A caracterização da capacidade de estirpes de HIV-1 e HIV-2, com diferentes perfis de utilização de co-receptores, infectarem MDM, permite-nos concluir que não existe uma relação entre o biotipo dos isolados estudados e a infecção produtiva destas células. No

entanto, apesar de não ter sido possível detectar actividade da RT nas culturas de MDM, constatamos que houve integração do DNA viral no genoma celular. Concluimos que isto se pode dever ao limiar de sensibilidade do método de quantificação de RT, ou pode ser consequência de algum factor de inibição que esteja a actuar pós-transcrição reversa e integração, ou ainda pode ser devido à ausência de algum factor celular necessário à conclusão do ciclo de replicação.

Não nos foi possível estabelecer uma correlação entre os co-receptores usados e os dados imunológicos e clínicos dos indivíduos infectados.

Palavras-chave: Co-receptores, CCR8, CXCR4, HIV-1, HIV-2, infecção produtiva, integração, macrófagos derivados de monócitos (MDM).

ABSTRACT

The HIV replication cycle in the host cell begins with the binding of the viral surface glycoprotein with the CD4 receptor and coreceptors present on the cell membrane.

With this work we intend to evaluate the contribution of CCR8 as alternative coreceptor for HIV-1 and HIV-2 isolates and characterize the ability to infect monocyte-derived macrophage (MDM) by strains that reveal capacity to use this coreceptor. We also tried to establish a correlation between the coreceptor usage and the immunological and clinical data of the patients from which the virus was isolated.

The results showed that CCR8 was efficiently used not only by HIV-2 isolates, but particularly by HIV-1 isolates. We also demonstrate that CXCR4 usage, alone or together with CCR5 and/or CCR8, was more frequently observed in HIV-1 than in HIV-2 isolates. Directly related to this is the finding that the non-usage of CXCR4 is significantly more common in HIV-2 isolates; both features could be associated with the slower disease progression usually observed in HIV-2 infected patients. The ability of some viral isolates to use alternative coreceptors besides CCR5 and CXCR4 could further impact on the efficacy of treatment with entry inhibitors and possibly also in HIV pathogenesis.

The ability of HIV-1 and HIV-2 strains, with different profiles of coreceptors usage, to infect MDM, allows us to conclude that there isn't a relationship between the biotype of the isolates and productive infection of these cells. However, despite we were unable to detect RT activity in MDM cultures, we observe integration of viral DNA in cell genome. We conclude that this may be due to the sensitivity threshold of the RT quantification method, or may be the result of some inhibitory factor that is acting after reverse transcription and integration, alternatively, it may be due to the absence of some cellular factor that allows the completion of replication cycle.

We were unable to establish a correlation between the coreceptor usage and the clinical and immunological data.

Keywords: Coreceptors, CCR8, CXCR4, HIV-1, HIV-2, integration, monocyte-derived macrophage (MDM), productive infection.

ÍNDICE GERAL

APRESENTAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO DESTE TRABALHO	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
ÍNDICE GERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. Introdução	1
1.1. Vírus da Imunodeficiência Humana – breve introdução histórica	2
1.2. Origem biológica	3
1.3. Taxonomia e características gerais	5
1.4. Epidemiologia da infecção por HIV	7
1.5. Organização estrutural	9
1.6. Organização genómica	10
1.7. Ciclo de replicação	13
1.7.1. Entrada na célula	13
1.7.2. Transcrição reversa e produção do DNA proviral	14
1.7.3. Expressão genética (transcrição e tradução)	14
1.7.4. Formação, libertação e maturação das partículas virais	16
1.8. Aspectos celulares e moleculares relacionados com a utilização de co-receptores	19
1.8.1. O CD4 como receptor primário do HIV	19
1.8.2. Receptores das quimiocinas - co-receptores para a entrada do HIV na célula	20
1.8.2.1. Principais co-receptores para a entrada do HIV: CCR5 e CXCR4	23
1.8.2.1.1. Locais de expressão	23
1.8.2.1.2. Perfil biológico	25

1.8.2.1.3. Fenótipo viral <i>versus</i> fase clínica	27
1.8.2.2. Delecção de 32 pb (CCR5 Δ 32)	29
1.8.2.3. Co-receptores alternativos	30
1.8.3. Topologia dos co-receptores	32
1.8.4. Factores determinantes do tropismo celular	32
1.8.4.1. Gene <i>env</i>	32
1.8.4.2. Concentração e localização dos receptores celulares	35
1.8.4.3. Estado fisiológico da célula	38
1.9. O papel dos monócitos/macrófagos na imunopatogénese da infecção por HIV	39
1.10. Vírus CD4 – independentes	40
1.11. O HIV-2 como modelo de estudo da patogénese da SIDA	41
2. Objectivos	45
2.1. Geral	46
2.2. Específicos	46
3. Material e métodos	48
3.1. Amostras	49
3.2. Criação de uma base de dados	49
3.3. Detecção por PCR da mutação Δ 32 no gene <i>ccr5</i>	50
3.4. Criação de um <i>stock</i> viral	52
3.5. Quantificação da actividade da transcriptase reversa (RT) de cada um dos <i>stocks</i> virais	53
3.6. Estudos de infecciosidade	54
3.6.1. Linha celular GHOST	54
3.6.2. Macrófagos derivados de monócitos (MDM)	55
3.6.3. Células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)	56
3.7. Extração de DNA em colunas a partir de CMSP e MDM infectados com HIV-1 e HIV-2	57
3.8. Quantificação espectrofotométrica do material genético	57
3.9. Amplificação da região genómica LTR de HIV-1 e HIV-2	57

4. Resultados	62
4.1. Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ no gene <i>ccr5</i>	63
4.2. Estudos de infecciosidade na linha celular GHOST	65
4.2.1. Dados clínicos e imunológicos dos indivíduos estudados	65
4.2.2. Utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e CCR8 por isolados primários de HIV-2	69
4.2.3. Utilização dos co-receptores por isolados primários de HIV-2 obtidos de amostras sequenciais	75
4.2.4. Utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e CCR8 por isolados primários de HIV-1	78
4.3. Estudos de infecciosidade em macrófagos derivados de monócitos (MDM)	82
4.3.1. Dados clínicos e imunológicos dos indivíduos estudados	82
4.3.2. Tropismo do HIV-1 para MDM	83
4.3.3. Tropismo do HIV-2 para MDM	84
4.3.4. Amplificação da região genómica LTR	85
4.3.4.1. Amplificação do LTR do HIV-1 em CMSP e MDM	87
4.3.4.2. Amplificação do LTR do HIV-2 em CMSP e MDM	89
5. Discussão e conclusões	91
6. Conclusões	104
7. Referências bibliográficas	107

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introdução		
Figura 1.1	Relação filogenética entre HIV-1/SIVcpz e HIV-2/SIVsmm.	4
Figura 1.2	Prevalência global do HIV, 2009.	8
Figura 1.3	Ilustração esquemática de um virião de HIV-1.	9
Figura 1.4	Representação esquemática da organização genómica do HIV-1. Estão identificadas as nove regiões codificantes, as extremidades LTR e as principais proteínas codificadas.	11
Figura 1.5	Modelo esquemático das fases iniciais da entrada do HIV-1 na célula hospedeira. a) Ligação da gp120 ao receptor membranar CD4; b) Formação do complexo gp120/CD4/receptor transmembranar de quimiocina (co-receptor); c) Exposição do péptido de fusão da gp41 e sua inserção na membrana plasmática da célula hospedeira.	13
Figura 1.6	Representação esquemática das três classes de mRNAs virais sintetizados durante o ciclo replicativo, baseado no processamento de <i>splicing</i> sofrido.	16
Figura 1.7	Microfotografias electrónicas das diferentes formas do HIV-1: forma madura e imatura.	17
Figura 1.8	Ciclo biológico do HIV-1.	18
Figura 1.9	Redundância dos receptores das quimiocinas.	22
Figura 1.10	Representação esquemática da sequência do CCR5. Os rectângulos cinzentos representam sete regiões transmembranares, TM1 a TM7 e 8 hélices. EL e IL são regiões <i>loop</i> externas e internas. Ligações bissulfito entre as cisteínas, C20-C269 e C101-C178.	24
Figura 1.11	Modelo representativo do tropismo celular do HIV.	26
Figura 1.12	Representação pormenorizada do gene <i>env</i> .	33

4. Resultados

- Figura 4.1 Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ gene *ccr5*; A – marcador de pesos moleculares (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen); B- Observação dos produtos de PCR. Identificação das pistas: 1- marcador de pesos moleculares (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen); 2 a 5 – amostras de DNA genómico dos CMSP; 6-controlo positivo; 7- controlo negativo. 64
- Figura 4.2 Percentagem de indivíduos infectados por HIV-2, sintomáticos e assintomáticos, com valores de contagem de células T CD4+ inferior ou superior a 200/ μ l. 66
- Figura 4.3 Percentagem de indivíduos infectados por HIV-2, sintomáticos e assintomáticos, com níveis de carga viral inferior ou superior a 500 cópias de RNA/ml. 66
- Figura 4.4 Percentagem de indivíduos infectados por HIV-1, sintomáticos e assintomáticos, com valores de contagem de células T CD4+ inferior ou superior a 200/ μ l. 67
- Figura 4.5 Percentagem de indivíduos infectados por HIV-1, sintomáticos e assintomáticos, com níveis de carga viral inferior ou superior a 500 cópias de RNA/ml. 68
- Figura 4.6 Percentagem de utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e/ou CCR8 por isolados de HIV-2. 71
- Figura 4.7 Percentagem de utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e/ou CCR8 por isolados de HIV-1. 79
- Figura 4.8 Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de CMSP infectadas com os isolados de HIV-1. 1- marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL1006, 3- UCFL1018, 4- UCFL1026, 5- UCFL1027, 6-UCFL1029, 7- Ba-L (controlo positivo), 8- controlo negativo. 87

- Figura 4.9 Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de MDM infectados com os isolados de HIV-1. 1- marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL1006, 3- UCFL1018, 4- UCFL1026, 5- UCFL1027, 6-UCFL1029, 7- Ba-L L (controlo positivo), 8- controlo negativo. 88
- Figura 4.10 Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 309 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de CMSP infectadas com os isolados de HIV-2. 1- marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL2004, 3- UCFL2007, 4- UCFL2037, 5- UCFL2043, 6-UCFL2050, 7- Controlo negativo. 89
- Figura 4.11 Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 309 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de MDM infectadas com os isolados de HIV-2. 1- marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL2004, 3- UCFL2007, 4- UCFL2037, 5- UCFL2043, 6-UCFL2050, 7- Controlo negativo. 90

ÍNDICE DE TABELAS

3. Material e métodos

Tabela 3.1	Primers para amplificação por PCR do gene <i>ccr5</i> .	51
Tabela 3.2	Condições de PCR para amplificação do fragmento de 735pb.	51
Tabela 3.3	Caracterização clínica, imunológica e virológica dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e HIV-2 a partir dos quais se isolaram os vírus.	52
Tabela 3.4	Primers para amplificação por PCR do LTR de HIV-1.	59
Tabela 3.5	Condições de PCR usadas para HIV-1.	59
Tabela 3.6	Primers para amplificação por PCR do LTR de HIV-2	60
Tabela 3.7	Condições de PCR usadas para HIV-2.	60

4. Resultados

Tabela 4.1	Caracterização dos isolados primários de HIV-2, utilizando células GHOST que expressam CD4 e CCR5, CXCR4 ou CCR8.	72
Tabela 4.2	Dados das amostras sequenciais de isolados de HIV-2 obtidas de indivíduos seguidos ao longo do tempo.	77
Tabela 4.3	Caracterização dos isolados primários de HIV-1, utilizando células GHOST que expressam CD4 e CCR5, CXCR4 ou CCR8.	80
Tabela 4.4	Caracterização clínica, imunológica e virológica dos indivíduos infectados pelo HIV-1, seleccionados para analisar a capacidade de infecção dos MDM e CMSP.	82
Tabela 4.5	Caracterização clínica, imunológica e virológica dos indivíduos infectados pelo HIV-2, seleccionados para analisar a capacidade de infecção dos MDM e CMSP.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AZT	Zidovudina
APC	célula apresentadora de antígeno, do inglês <i>antigen presenting cell</i>
BHE	barreira hemato-encefálica
CA	proteína da cápside, do inglês <i>capsid protein</i>
CCR5	receptor de β -quimiocinas da classe CC, do inglês <i>CC chemokine receptor 5</i>
CCR8	receptor de β -quimiocinas da classe CC, do inglês <i>CC chemokine receptor 8</i>
CDC	Centro de Controlo e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CD4	receptor celular, do inglês <i>cluster of differentiation type 4</i>
CMSP	células mononucleadas do sangue periférico
CPI	complexo de pré-integração
CRF	forma recombinante circulante, do inglês <i>circulating recombinant form</i>
CTL	linfócitos T citotóxicos, do inglês <i>cytotoxic T-lymphocytes</i>
CXCR4	receptor de β -quimiocinas da classe CXC, do inglês <i>CXC chemokine receptor 4</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DT	vírus duplo-trópicos
<i>env</i>	gene codificante das glicoproteínas do invólucro do HIV, do inglês <i>envelope</i>
<i>gag</i>	gene codificante das proteínas da estrutura interna do HIV, do inglês <i>group specific antigen</i>
gp	glicoproteína
HAART	terapêutica anti-retroviral de alta eficácia, do inglês <i>highly active antiretroviral therapy</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
HTLV-III	vírus T-linfotrópico humano tipo III, do inglês <i>human T-lymphotropic virus type III</i>
IL-2	interleucina 2, do inglês <i>interleukin 2</i>
IN	integrase
IS	indutores de sincícios
IRES	<i>internal ribosome entry segment</i>

LAV	vírus associado a linfadenopatias, do inglês <i>lymphadenopathy-associated virus</i>
LTNP	<i>long-term non-progressors</i>
LTR	regiões repetitivas terminais longas do genoma proviral do HIV, do inglês <i>long terminal repeats</i>
MA	<i>matrix protein</i>
MDM	macrófagos derivados de monócitos
MHC	complexo major de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
ml	mililitro
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>
NC	<i>nucleocapsid protein</i>
<i>nef</i>	gene acessório do HIV, do inglês <i>negative factor</i>
NF-κB	factor celular de transcrição nuclear, do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
NIS	não indutores de sincícios
NNRTI	inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa, do inglês <i>non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
NRTI	inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa, do inglês <i>nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
p	proteína
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PI	inibidores da protease, do inglês <i>protease inhibitors</i>
<i>pol</i>	gene codificante das proteínas de natureza enzimática do HIV, do inglês <i>polymerase</i>
PR	<i>protease</i>
<i>rev</i>	gene regulador do HIV, do inglês <i>regulator of expression of viral proteins</i>
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNaseH	ribonuclease H
RT	<i>reverse transcriptase</i>
SBF	soro bovino fetal

SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
SIV	vírus da imunodeficiência símia, do inglês <i>simian immunodeficiency virus</i>
SIVcpz	vírus da imunodeficiência símia dos chimpanzés <i>Pan troglodytes troglodytes</i>
SIVsmm	vírus da imunodeficiência símia dos macacos <i>Cercocebus atys</i>
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SU	<i>surface protein</i>
<i>tat</i>	gene regulador do HIV, do inglês <i>transactivator of gene expression</i>
TCR	complexo receptor das células T, do inglês <i>T complex receptor</i>
Th2	linfócitos T auxiliares do tipo 2, do inglês <i>lymphocytes T helper type 2</i>
TL	vírus linfocitotrópicos
TGI	tracto gastro-intestinal
TGU	tracto genito-urinário
TM	<i>transmembrane protein</i>
TM	vírus monocitotrópicos
U3	região situada na extremidade 3' do genoma de HIV, do inglês <i>unique sequence 3</i>
U5	região não codificante situada próximo da extremidade 5' do genoma de HIV-1, do inglês <i>unique sequence 5</i>
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
<i>vif</i>	gene acessório do HIV, do inglês <i>viral infectivity factor</i>
<i>vpr</i>	gene acessório do HIV, do inglês <i>viral protein R</i>
<i>vpu</i>	gene acessório do HIV-1, do inglês <i>viral protein U</i>
<i>vpx</i>	gene acessório do HIV-2, do inglês <i>viral protein X</i>
μ	micro (prefixo que designa 10 ⁻⁶)
μl	microlitros
μM	micromolar

1.INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Vírus da Imunodeficiência Humana – breve introdução histórica

No início da década de 80 do século passado, foram identificados no seio da comunidade homossexual norte-americana os primeiros casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Indivíduos adultos do sexo masculino, homossexuais e moradores em São Francisco ou Nova Iorque, apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* e comprometimento do sistema imune, o que levou à conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia, provavelmente, infecciosa e de provável transmissão por contágio íntimo.

Em 1983, a equipa de Luc Montaigner, em França (8), e um ano depois, a equipa de Robert Gallo, nos EUA (35, 71, 106, 119, 140, 157), isolaram um retrovírus humano associado a casos de imunodeficiência adquirida, recebendo os nomes de LAV (do inglês, *lymphadenopathy associated virus* ou vírus associado à linfadenopatias) e HTLV-III (do inglês *human T-lymphotrophic virus* ou vírus T-linfotrópico humano tipo III), respectivamente nos dois países.

Em 1986, um comité internacional recomendou o termo HIV (Human Immunodeficiency Virus) (38) para denominá-lo, reconhecendo-o como capaz de infectar seres humanos; o CDC propôs pela primeira vez os critérios clínicos que permitiam definir os diversos estádios da infecção, bem como a lista das patologias de causa infecciosa ou neoplásica que demarcavam cada uma das fases de infecção.

Nesse mesmo ano, foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2 (35).

No ano de 1987 surgiu a primeira esperança de tratamento com a utilização da zidovudina (AZT). Nos 15 anos seguintes, o arsenal terapêutico passou para as duas dezenas de fármacos pertencentes a cinco grupos terapêuticos diferentes: inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTI), inibidores da protease (PI), inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTI), inibidores da ligação aos co-receptores e inibidores da integrase. Deste modo, é possível impedir ou atrasar o aparecimento de resistência aos fármacos e a progressão para SIDA.

1.2. Origem biológica

A história evolutiva do HIV tem sido reconstruída através de estudos filogenéticos realizados com os vírus da imunodeficiência simia, SIV (do inglês, *simian immunodeficiency virus*), com os quais o HIV partilha homologia considerável (72, 81). Os dois tipos de vírus associados à SIDA foram introduzidos na espécie humana por eventos de transmissão de carácter zoonótico, sendo esta teoria sustentada por fortes evidências genéticas, filogenéticas e epidemiológicas (81, 159). A hipótese mais provável sugere que o SIV tenha sido transmitido ao Homem como resultado da exposição directa ao sangue de primatas africanos infectados. Este facto pode ter ocorrido aquando do manuseamento de carne de símios usada na alimentação ou pela sua domesticação como animais de estimação, que são práticas comuns na África Equatorial (30, 31). Existe uma elevada semelhança na organização estrutural do genoma do HIV-1 com o SIV de chimpanzés da subespécie *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpz P.t.t) e do HIV-2 com os macacos *Sooty mangabey* da espécie *Cercocebus atys* (SIVsmm) (84). Existe também uma coincidência geográfica entre o habitat natural dos primatas hospedeiros dos SIV filogeneticamente mais próximos dos HIV e as áreas de

infecção original da espécie humana por estes últimos. O habitat natural de *Pan troglodytes troglodytes* encontra-se na África Ocidental (Gabão, Guiné Equatorial, Camarões e República do Congo) coincidindo com as áreas de infecção ancestral do HIV-1 (72, 81). Relativamente ao HIV- 2, as áreas endémicas estão localizadas na costa oeste africana (Senegal, Guiné-Bissau, Costa do Marfim e partes da Serra Leoa e da Libéria), o que coincide com o habitat natural da espécie *Cercocebus atys* (30). Outra evidência relevante é a elevada prevalência de SIVcpz e SIVsmm nos seus hospedeiros naturais, sem causar doença (30, 94, 133), o que parece provar uma circulação, de longa data, dos vírus nessas espécies. Finalmente, estudos filogenéticos comprovam que os dois tipos de HIV partilham uma maior proximidade evolutiva com os respectivos SIV, do que entre si (Figura 1.1), não sendo possível separá-los, nas árvores filogenéticas, de acordo com a respectiva espécie hospedeira de origem (30, 43, 72).

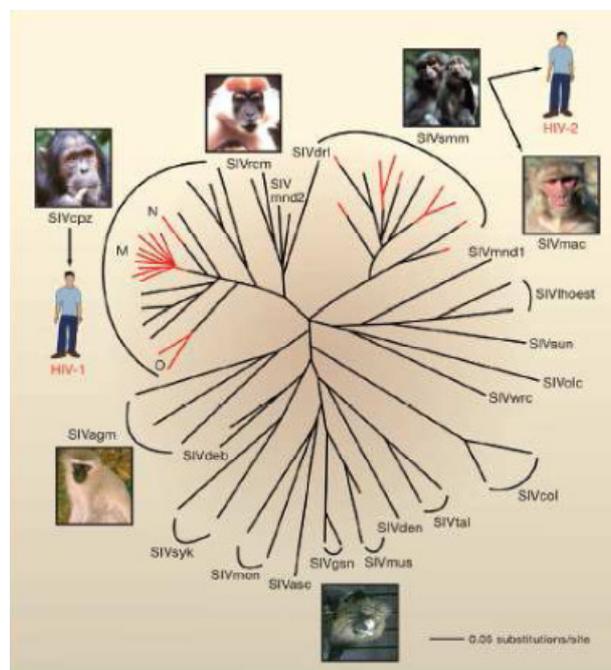


Figura 1.1: Relação filogenética entre HIV-1/SIVcpz e HIV-2/SIVsmm (Ho *et al.*, 2008).

1.3. Taxonomia e características gerais

O HIV, agente responsável pela SIDA, pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, género dos *Lentivirus*. É um retrovírus com genoma RNA e pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogénicos que necessitam, para multiplicar-se, de uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia de DNA de dupla cadeia, que pode, então, integrar-se no genoma do hospedeiro (24). Todos os membros desta família de retrovírus possuem estrutura genómica semelhante, apresentando identidade em torno de 50% e todos têm a capacidade de infectar linfócitos através do receptor CD4.

Análises filogenéticas, utilizando sequências de DNA, permitem a classificação do HIV em grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes circulantes (CRFs) (146). O HIV-1 pode ser dividido em três grupos: grupo O, grupo M e grupo N (146, 183). O grupo M é composto por nove subtipos filogeneticamente distintos, os subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K (135, 146). Os vírus do grupo O e M divergem entre si cerca de 47% ao nível das sequências de aminoácidos do gene *env* (176). Dentro do grupo M, vírus pertencentes ao mesmo subtipo genético divergem entre si cerca de 3-23%; vírus pertencentes a subtipos diferentes podem ter divergências de 25-35% (76, 196).

Embora ainda não conhecida, especula-se a possibilidade de variantes virais possuírem diferentes índices de transmissibilidade e/ou patogenicidade.

A variante viral prevalente, na epidemia mundial, é o subtipo C e é responsável pela maior parte das infecções na África Oriental e do Sul. Foi também detectado na Europa, China, Índia e Brasil. O subtipo A é sobretudo prevalente na África Central, mas também foi encontrado na Europa, Ásia Oriental e América. Vírus do subtipo G foram encontrados em África mas também na Rússia, Suécia e Bélgica. Os vírus do subtipo B são os vírus

prevalentes na América do Norte e do Sul, na Europa e na Austrália. Foram também já detectados em numerosos outros locais, incluindo Tailândia, Japão, África, China, Malásia e Índia (180, 185).

A co-circulação de múltiplos subtipos de HIV num único local favorece episódios de co-infecção que, por sua vez, levam ao aparecimento de estirpes virais recombinantes que podem ser viáveis e transmissíveis. Os eventos de recombinação são responsáveis pela formação de genomas mosaicos compostos, inclusive, por diferentes subtipos em regiões genómicas distintas. Quando os vírus recombinantes se transmitem entre diferentes hospedeiros, e originam novas infecções, são designados de formas recombinantes circulantes (CRFs) (144, 145). Actualmente, estão descritas CRFs que resultam da recombinação entre HIV-1 do subtipo A e E (CRF_AE), A e G (CFR_AG), A e B (CFR_AB) e A, G, K e U (U significa sequência genética por classificar) (CRF_AGKU) (98).

Os CRFs_AE (anteriormente designados de subtipo E) estão associados à epidemia de SIDA, sobretudo, na Tailândia e China. Foram também já detectados em diferentes países Africanos, na América do Norte e do Sul, Japão, França e Índia (21, 22). A maior parte dos indivíduos infectados por HIV-1 do grupo O são residentes ou originários da África Central, sobretudo dos Camarões (134). Assim, todos os subtipos genéticos estão presentes na África Central, enquanto apenas um ou dois subtipos predominam noutras partes do mundo. No entanto, dada a elevada mobilidade da maior parte das pessoas em risco de contrair a infecção por HIV, é inevitável a progressiva disseminação mundial de todos os subtipos de HIV (21, 22).

Recentemente foram também detectados recombinantes entre vírus do grupo M e do grupo O.

1.4. Epidemiologia da infecção pelo HIV

Os últimos dados epidemiológicos sobre o número de indivíduos infectados pelo HIV e com SIDA, revela que o crescimento da epidemia da SIDA, em todo o mundo, parece ter estabilizado na última década. Desde os finais da década de 90 do século passado que a taxa anual de novas infecções por HIV tem vindo a decrescer e a taxa de mortalidade por HIV tem vindo a diminuir devido à crescente cobertura da terapêutica anti-retrovírica durante os últimos anos (90).

Em 2009, estimou-se que o número de novas infecções por HIV fosse de 2,6 milhões de indivíduos, o que representa uma redução de, aproximadamente, um quinto (19%) do número de novas infecções registadas em 1999 (3,1 milhões de indivíduos). A análise de 33 países, dos quais 22 da África Sub-Sahariana, revelou que a incidência de HIV diminuiu mais de 25% entre 2001 e 2009. É importante notar que a maioria das novas infecções por HIV continua a ocorrer na África Sub-Sahariana, onde se estima que 1,8 milhões de indivíduos foram infectados em 2009, um valor consideravelmente inferior ao número estimado em 2001 (cerca de 2,2 milhões de indivíduos) (Figura 1.2) (90). Segundo o último relatório epidemiológico da ONU (2010), esta tendência reflecte uma combinação de factores, incluindo o impacto das medidas e campanhas de prevenção contra o HIV e o curso natural da epidemia (90).

Apesar destes dados, a análise epidemiológica, por regiões geográficas, tem demonstrado que várias regiões e Países não seguem esta tendência. Entre 2001 e 2009, verificou-se, em sete países, um aumento de incidência de HIV superior a 25%. Na Europa Ocidental, Central e do Leste, na Ásia Central e na América do Norte tem-se assistido a uma estabilização da taxa anual de novas infecções por HIV nos últimos cinco anos. Contudo, o relatório destaca que

em muitos Países desenvolvidos têm-se assistido a um aumento de casos de infecção por HIV entre a comunidade homossexual. Na Europa de Leste e na Ásia Central, as altas taxas de transmissão por HIV continuam a ocorrer entre pessoas que consomem drogas injectáveis (90).

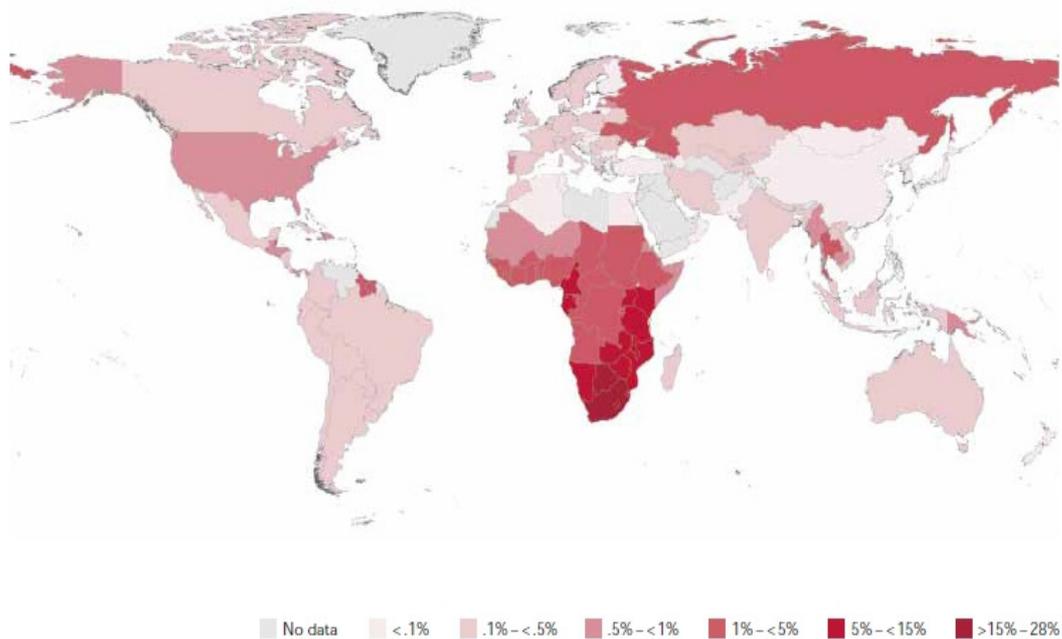


Figura 1.2: Prevalência global do HIV, 2009 (adaptado de UNAIDS).

O número de mortes anuais por HIV tem vindo a decrescer, consistentemente, desde o pico de 2,1 milhões em 2004, para um número estimado de 1,8 milhões em 2009, o que reflecte claramente o aumento da acessibilidade à terapêutica anti-retrovírica, assim como os cuidados prestados às pessoas infectadas por HIV, particularmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (90).

1.5. Organização Estrutural

As partículas virais maduras do HIV, quando observadas ao microscópio electrónico, apresentam uma estrutura esférica, de aproximadamente 110 nm de diâmetro e uma simetria complexa (Figura 1.3).

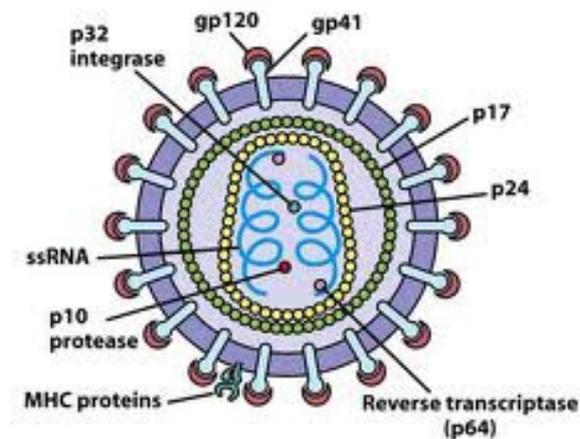


Figura 1.3: Ilustração esquemática de um virião de HIV-1 (disponível em http://www.pipelinedrugs.com/biotechnology_encyclopedia/250px-Hiv_gross.png).

Possuem um invólucro fosfolipídico, derivado da membrana citoplasmática das células hospedeiras, no qual se encontram inseridas duas glicoproteínas de origem viral, derivadas de um precursor poliproteico (gp140/gp160). Após clivagem por proteases celulares, a gp140/gp160 dá origem às glicoproteínas de superfície gp105/gp120/SU (do inglês, *surface protein*) e transmembranar gp36/gp41/TM (do inglês, *transmembrane protein*), as quais, no virião, se associam na forma de homotrímeros de heterodímeros. Estas são responsáveis pela mediação do processo de fusão do invólucro do vírus com a membrana citoplasmática, após a ligação a receptores específicos situados na superfície das células alvo. A superfície interna

do invólucro encontra-se intimamente associada à matriz viral, constituída pela proteína p17/MA (do inglês, *matrix protein*), a qual é extremamente importante para a integridade estrutural do virião. A envolver o material genético do vírus encontra-se a cápside viral, na forma de cone truncado, constituída pela proteína p24/p26/CA (do inglês, *capsid protein*). No interior desta, encontra-se o genoma, associado às proteínas da nucleocápside p7/NC (do inglês, *nucleocapsid protein*), as proteínas de natureza enzimática transcriptase reversa p51/66/p53/68/RT (do inglês, *reverse transcriptase*), protease p15/p10/PR (do inglês, *protease*) e integrase p31/p32/IN (do inglês, *integrase*), e, por último, as proteínas virais acessórias Vif, Vpr, Nef e Vpu/Vpx (24, 163).

1.6. Organização Genómica

O genoma do HIV é constituído por duas moléculas lineares de RNA, idênticas, de cadeia simples e polaridade positiva, com cerca de 9 kb. Na forma proviral, este encontra-se flanqueado por duas regiões terminais não codificantes, de cerca de 600 nucleótidos, designadas por repetições terminais longas, LTR (do inglês, *long terminal repeats*), com a estrutura U3RU5. Nas LTR estão localizados elementos promotores importantes que asseguram a transcrição do DNA proviral. O genoma viral é ainda constituído por uma região central codificante, que inclui os seguintes genes (Figura 1.4):

- *gag*, *pol* e *env*, que codificam as proteínas estruturais do virião e enzimas;
- *tat* e *rev*, que codificam as duas proteínas reguladoras Tat e Rev;
- *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu/vpx*, que codificam as quatro proteínas acessórias Nef, Vif, Vpr e Vpu/Vpx.

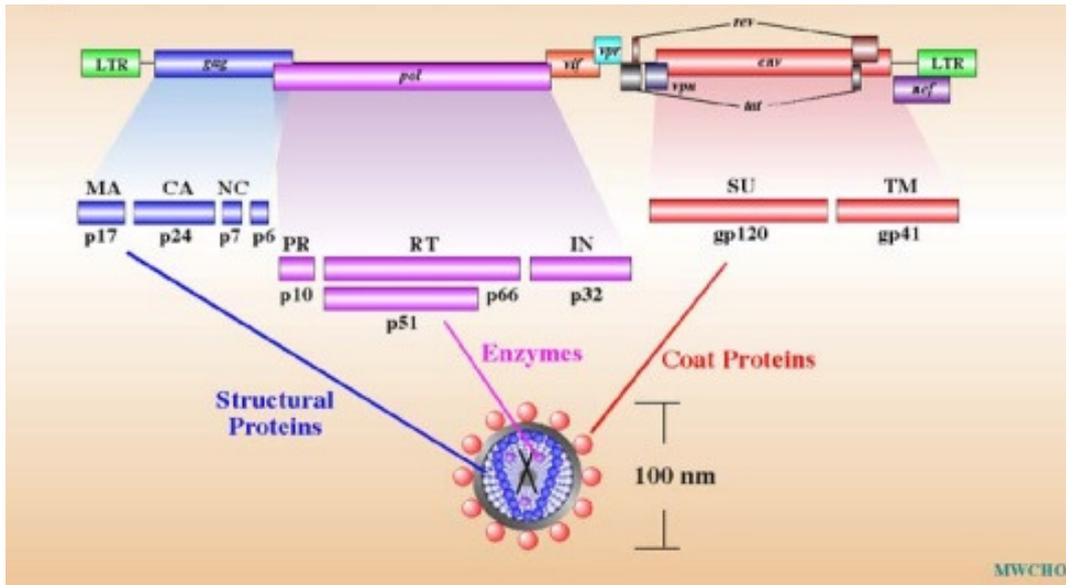


Figura 1.4: Representação esquemática da organização genômica do HIV-1 (disponível em www.stanford.edu/.../2005gongishmail/HIV.html). Estão identificadas as nove regiões codificantes, as extremidades LTR e as principais proteínas codificadas.

As funções de cada uma das proteínas codificadas pelos nove genes que constituem o genoma do HIV encontram-se resumidas no esquema que se segue (127, 163).

Genes Estruturais

gag	pol	env
<p>MA (p16/p17) - Proteína estrutural da matriz; participa no transporte do complexo de pré-integração para o núcleo da célula; direcciona as poliproteínas Gag e Gag-Pol para a membrana citoplasmática; intervém na saída dos viriões.</p> <p>CA (p24/p26) - Proteína estrutural da cápside.</p> <p>NC (p7) - Proteína estrutural da nucleocápside.</p> <p>p6^{Gag} - Proteína essencial na montagem e libertação dos viriões para o exterior da célula.</p>	<p>PR (p10) - Responsável pelo processamento das glicoproteínas Pr55^{Gag} e Pr160^{Gag-Pol}, durante a fase de maturação, cuja clivagem dita a infecciosidade das partículas virais.</p> <p>RT (p51/66/p53/p68) - Implicada na conversão do RNA viral de cadeia simples em DNA proviral de cadeia dupla (transcrição reversa).</p> <p>IN (p32) - Envolvida no transporte do complexo de pré-integração para o núcleo da célula e no mecanismo de integração do DNA retrotranscrito no genoma das células hospedeiras (provírus).</p>	<p>SU (gp120/gp105) - Glicoproteína de superfície, responsável pela ligação ao receptor celular CD4 e a co-receptores presentes nas células-alvo (CCR5/CXCR4)</p> <p>TM (gp41/gp36) - Glicoproteína transmembranar, responsável pela fusão do invólucro viral com a membrana celular.</p>

Genes acessórios

nef	vif	vpr	vpu/vpx
<p>Nef (p27) - Modulação negativa, entre outras, das moléculas CD4, MHC I e II à superfície da célula (escape imunitário) e aumento da infecciosidade do virião; proteína multifuncional, importante factor de patogenicidade.</p>	<p>Vif (p23) - Promove a infecciosidade viral, impedindo a incorporação das proteínas APOBEC3F e G; contribui para a paragem do ciclo celular na fase G2.</p>	<p>Vpr (p15) - Participa no transporte do complexo de pré-integração para o núcleo da célula infectada e tem a capacidade de reter as células em divisão na fase G2 do ciclo celular. Induz a apoptose.</p>	<p>Vpu/Vpx (p16) - Induz a degradação de CD4 no proteossoma, aumentando a capacidade de libertação das partículas virais das células infectadas.</p>

Genes reguladores

tat	rev
<p>Tat (p14) - Aumento da actividade da RNA polimerase II celular, fundamental para a transcrição viral a partir do promotor LTR.</p>	<p>Rev (p19) - Exportação nuclear dos RNAs virais não processados, ou parcialmente processados, para o citoplasma.</p>

1.7. Ciclo de Replicação

1.7.1. Entrada na célula

A entrada do vírus na célula ocorre como resultado da adsorção do invólucro viral à membrana citoplasmática. Estão envolvidos neste fenómeno as glicoproteínas do invólucro viral e receptores celulares específicos: o receptor CD4, e um co-receptor pertencente ao grupo dos receptores de quimiocinas, proteínas G integrais com sete domínios transmembranares. A glicoproteína de superfície do HIV interage, primeiro com o receptor CD4, induzindo alterações conformacionais que conduzem à exposição do local onde o co-receptor irá, por sua vez, ligar-se. Estas alterações conformacionais conduzem à libertação da extremidade NH₂ hidrofóbica da glicoproteína transmembranar, o péptido de fusão, que vai inserir-se na membrana citoplasmática da célula alvo (69, 127, 136, 163). Ocorre, então, a fusão entre o invólucro viral e a membrana citoplasmática, por um mecanismo ainda não totalmente conhecido (Figura 1.5).

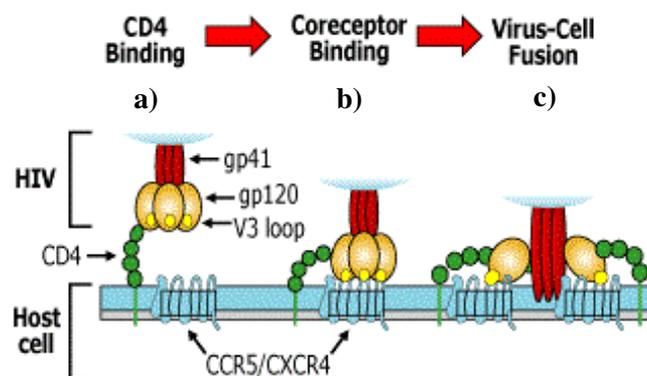


Figura 1.5: Modelo esquemático das fases iniciais da entrada do HIV-1 na célula hospedeira. a) Ligação da gp120 ao receptor membranar CD4; b) Formação do complexo gp120/CD4/receptor transmembranar de quimiocina (co-receptor); c) Exposição do péptido de fusão da gp41 e sua inserção na membrana plasmática da célula hospedeira (adaptado de Zhang *et al.*, 1998).

1.7.2. Transcrição reversa e produção do DNA proviral

Desta etapa do ciclo replicativo resulta a penetração da cápside viral no citoplasma da célula, onde é destruída por acção de enzimas celulares (descapsidação) (65, 127). A transcriptase reversa e a ribonuclease H (RNaseH), presentes no chamado complexo de pré-integração (CPI), realizam a síntese de uma molécula de DNA complementar tomando como molde o RNA genómico. Deste processo gera-se uma molécula linear de DNA que irá servir de molde para a síntese de uma cadeia de DNA complementar (122).

Uma vez no núcleo, o DNA proviral é integrado no genoma da célula, aparentemente num *locus* ao acaso. Esta integração é dirigida pelas sequências das regiões LTR e catalisada pela integrase viral. O DNA viral integrado (provírus) torna-se, assim, parte integrante do genoma da célula hospedeira que, deste modo, adquire a capacidade para produzir novos viriões (136).

1.7.3. Expressão genética (transcrição e tradução)

Para que haja produção de novos viriões, o provírus terá que ser transcrito pela RNA polimerase II celular. No entanto, este processo depende da activação da polimerase resultante da ligação específica de proteínas celulares a sequências reguladoras, elementos *enhancer*, existentes na região U3 do LTR do provírus. O HIV utiliza as proteínas NF-kB/Rel resultantes da activação dos linfócitos T para a sua própria transcrição (149). Contudo, a quantidade de RNA viral produzida pelo sistema de transcrição celular é baixa. A expressão eficiente dos genes do provírus requer, para além da maquinaria transcripcional da célula, as proteínas virais Tat e Rev (69, 138). Da transcrição do provírus resulta um RNA de cerca de 9 kb, com toda a informação genética do vírus.

A transcrição do genoma proviral leva à produção de três classes de RNAs (87, 138) (Figura 1.6). Os mRNA poliprocessados são os primeiros a atingirem o citoplasma, para serem traduzidos nos ribossomas. Têm cerca de 1,7-2,0kb e codificam a síntese de proteínas reguladoras e acessórias Tat, Rev e Nef. A proteína Tat actua como activadora da transcrição do provírus, aumentando, consideravelmente, a velocidade de transcrição da RNA polimerase II da célula, daí resultando a síntese de quantidades elevadas de RNAs virais. Este aumento da transcrição do provírus conduz à acumulação de uma segunda proteína reguladora pós-transcricional, a proteína Rev. Esta proteína inibe a clivagem do RNA viral em pequenos RNAs, resultando da sua acção a produção de dois novos tipos de mRNAs, um parcialmente processado com cerca de 5kb e outro não processado com cerca de 9kb. O mRNA de 5kb codifica para a proteína Vif, Vpr e Vpu e para as glicoproteínas do invólucro. Por sua vez, o mRNA de 9Kb contém a informação para a síntese da protease, integrase, transcriptase reversa, proteínas da cápside, nucleocápside e da matriz do virião (87, 138).

A replicação do HIV requer a exportação nuclear e a tradução de todos estes tipos de mRNA para o citoplasma. Os mRNA poliprocessados são transportados para o citoplasma, como qualquer mRNA celular; a exportação nuclear dos mRNA não processados e, parcialmente processados é assegurada pela proteína Rev.

No citoplasma dá-se uma alteração conformacional do complexo de transporte, que induz a libertação do Rev do mRNA viral; este último é reconhecido pela maquinaria de tradução proteica. O processo de tradução do mRNA vírico é determinado pelo *internal ribosome entry segment* (IRES), uma região líder não traduzida, presente no início do mRNA vírico e que é composta por vários outros elementos genéticos que controlam a replicação vírica (50). O IRES liga-se a subunidades 40S ribossomais e a diversos factores de iniciação da tradução, mas o seu papel exacto, na regulação da tradução, ainda não é conhecido.

A maturação do vírus inicia-se junto ao folheto interno da membrana celular em locais onde, previamente, se juntaram múltiplos trómeros de glicoproteínas do invólucro. As duas moléculas de RNA genómico reúnem-se com as glicoproteínas Gag e Gag-Pol e este complexo interage com as regiões citoplasmáticas das múltiplas moléculas de gp41 presentes na membrana (24, 69).

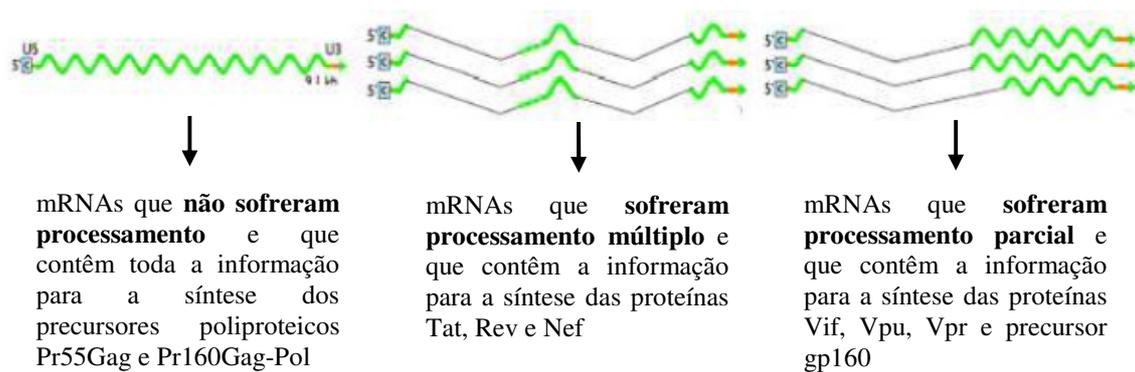


Figura 1.6: Representação esquemática das três classes de mRNAs virais sintetizados durante o ciclo replicativo, baseado no processamento de *splicing* sofrido.

1.7.4. Formação, libertação e maturação das partículas virais

Ocorre, então, à superfície da célula, um processo de gemulação, de que resulta a saída de uma partícula viral imatura, que irá sofrer rearranjos intramoleculares, mediados pela protease viral. Esta processa, proteoliticamente, os precursores Gag e GagPol gerando-se as proteínas maduras do Gag e do Pol. Dá-se depois uma série de rearranjos estruturais e relocalização destes componentes na partícula viral. A MA passa a ser a única proteína ligada ao invólucro, enquanto a CA e a NC se condensam à volta do genoma viral, originando a cápside cónica característica do virião maduro e infeccioso (24, 69) (Figura 1.7 e 1.8).

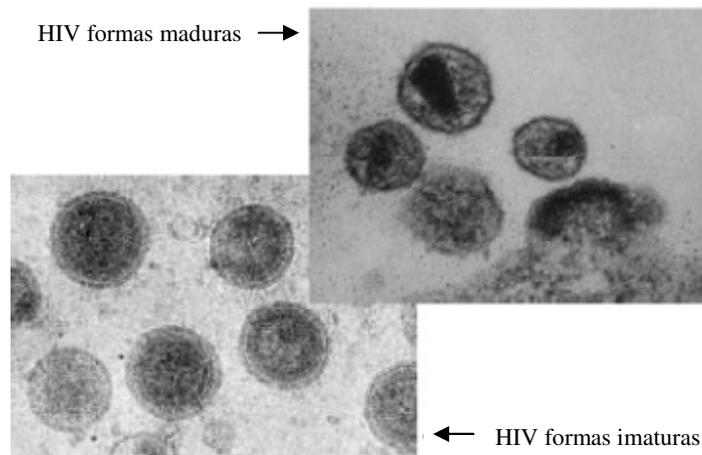


Figura 1.7: Microfotografias electrónicas das diferentes formas do HIV-1: forma madura e imatura (disponível em http://hvd.enslyon.fr/human_virology_dpt/teams/g_s_lr/pr_lr/fp_lr/2008-0612.4108167593/image).

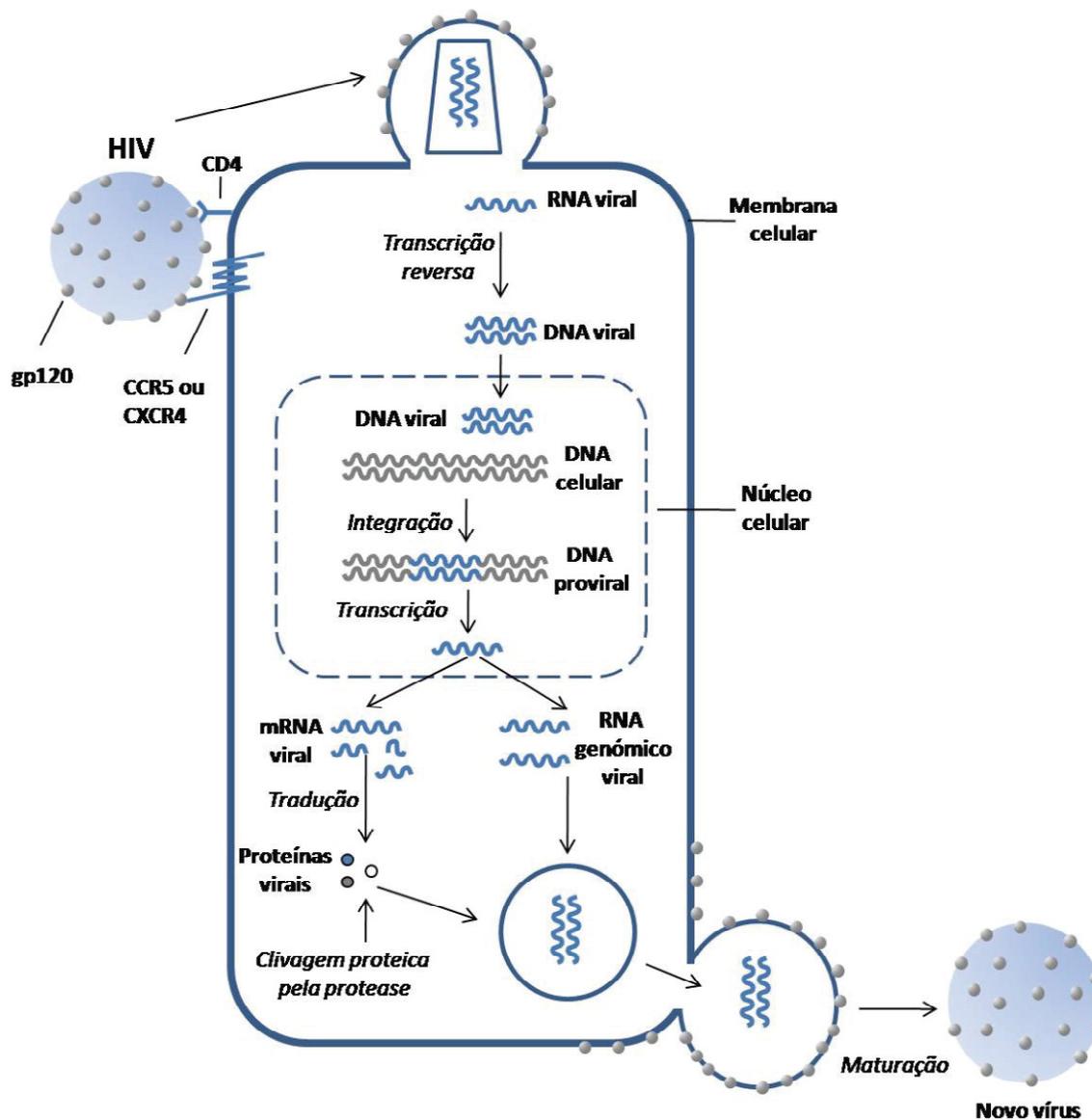


Figura 1.8: Ciclo biológico do HIV-1 (adaptado de Groot, 2006).

1.8. Aspectos celulares e moleculares relacionados com a utilização de co-receptores

Um dos principais factores que condicionam a capacidade replicativa é a entrada do vírus na célula (96). Neste contexto, os receptores celulares usados são um dos principais determinantes da patogénese e tropismo celular (34).

1.8.1. O CD4 como receptor primário do HIV

A proteína CD4 é uma glicoproteína transmembranar de 58 kDa, pertencente à superfamília das imunoglobulinas, e que, funcionalmente, intervém nas interacções que dão início à activação das células T. Pode ser detectada na superfície celular de cerca de 60% dos linfócitos T, dos precursores das células T na medula óssea e timo, nos monócitos e macrófagos (128), eosinófilos, células dendríticas e células da microglia do sistema nervoso central (SNC).

Em 1984, um ano após a identificação do HIV-1 como agente etiológico da SIDA, foi conhecida a susceptibilidade dos linfócitos T auxiliares CD4+ à infecção (49, 95); esta susceptibilidade foi explicada pelo facto do CD4 funcionar como receptor com elevada afinidade para a gp120. Dessa ligação resulta a activação de diversas vias intracelulares de transdução de sinal, bem como a indução de apoptose das células T CD4+ (17, 198).

O CD4 liga-se ao complexo receptor das células T (TCR) e aumenta a sua afinidade para as proteínas do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe II nas células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen-presenting cell*), contribuindo directamente para a transdução de sinal que resulta na activação dos linfócitos T. Os linfócitos T CD4+ activados segregam linfocinas que

participam na activação de outras células, particularmente, linfócitos B e macrófagos. O CD4 também se encontra presente na membrana das células da linha monócitos/macrófagos (128). De facto, o papel crucial dos linfócitos T CD4+ numa vasta gama de funções de sistema imunitário, parecia ser suficiente para explicar os efeitos clínicos da infecção pelo HIV-1; no entanto, verificou-se uma discrepância entre o número de linfócitos T CD4+ infectados detectados no sangue e a extensão da disfunção imune (177). Outra inconsistência foi o facto da transfecção de linhas celulares não-humanas com o gene CD4 humano não as tornar susceptíveis à infecção por HIV, o que implicava que a presença deste receptor, por si só, não era o único factor determinante da infecção (11, 128, 177). Deste modo, foi postulada a necessidade de outra molécula adicional para a entrada viral.

Quase uma década depois foi identificado um segundo grupo de receptores – os receptores de quimiocinas ou co-receptores (177).

1.8.2. Receptores das quimiocinas - co-receptores para a entrada do HIV na célula

O grupo dos receptores das quimiocinas (co-receptores) consiste em receptores da membrana celular ao qual se ligam as quimiocinas, uma família de citocinas que controlam, selectiva e especificamente, a adesão, a quimiotaxia e activação leucocitária.

Estruturalmente, as quimiocinas possuem, no meio da molécula, ligações dissulfuradas, que fazem ponte entre dois pares de cisteínas. A classificação é feita tendo em conta o número de aminoácidos existentes no 1º e 2º resíduo de cisteína. Estão divididas em quatro subfamílias com base em se os dois resíduos de cisteína estão imediatamente adjacentes (CC); separados por um aminoácido (CXC); com um único resíduo de cisteína (C); ou com dois resíduos de

cisteína separados por três aminoácidos (CX3C) (124, 150). Estas diferenças correlacionam-se com a organização das duas subfamílias em agrupamentos génicos separados. Na inflamação, as quimiocinas CXC actuam principalmente sobre neutrófilos e, as quimiocinas CC, principalmente sobre monócitos, linfócitos e eosinófilos (150). Uma nova classificação foi introduzida em 2000, para os ligandos de quimiocinas e cada quimiocina tem uma designação diferente, tal como, CXCL, CCL, XCL, ou CX3CL1 (209).

No final dos anos 80 do século passado, Walker e colaboradores, demonstraram que a infecção pelo HIV era inibida por factores solúveis, produzidos pelos linfócitos T CD8⁺. Esta foi a primeira evidência do possível envolvimento das quimiocinas e dos seus receptores na patogénese do HIV (197). Posteriormente, foram identificadas, em sobrenadantes de células T CD8⁺, derivadas de doentes infectados por HIV, as β -quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β como parte destes factores solúveis (37). Em alguns isolados virais, mas não em todos, a presença destas moléculas, foi considerada responsável pela progressão para a fase sintomática da doença, assim como pela protecção relativa à infecção em indivíduos não infectados e frequentemente expostos.

As quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β são ligandos naturais para o co-receptor CCR5 e podem induzir a internalização do receptor e diminuir a sua expressão celular, contribuindo, por último, para uma maior actividade anti-HIV-1. Por sua vez, o SDF-1 α , o ligando natural para o CXCR4, inibe a entrada dos isolados com tropismo para linfócitos T.

Os receptores das quimiocinas pertencem ao grupo dos receptores de sinalização intracelular acoplados a proteínas G (GTP-binding), com sete domínios transmembranares ligados por três

ansas intracitoplasmáticas e três ansas extracitoplasmáticas. Os receptores das quimiocinas partilham até 90% da sequência de aminoácidos e dividem-se em quatro famílias:

- Receptores da família α ou CXCR – são cinco subtipos (CXCR1-5) e estão envolvidos em funções diferentes;
- Receptores da família β ou CCR – são nove subtipos (CCR1-9) e estão envolvidos, essencialmente, na inflamação (CCR1,2,3,5,8) e na regulação do trânsito celular (CCR4,6,7,9);
- Receptores da família δ ou CX3CR – actuam na ancoragem dos leucócitos ao endotélio;
- Receptores da família γ ou XCR – actuam na chamada de células T.

A expressão dos receptores das quimiocinas podem ser constitutiva ou induzida e o mesmo receptor pode ligar-se a várias quimiocinas (Figura 1.9).

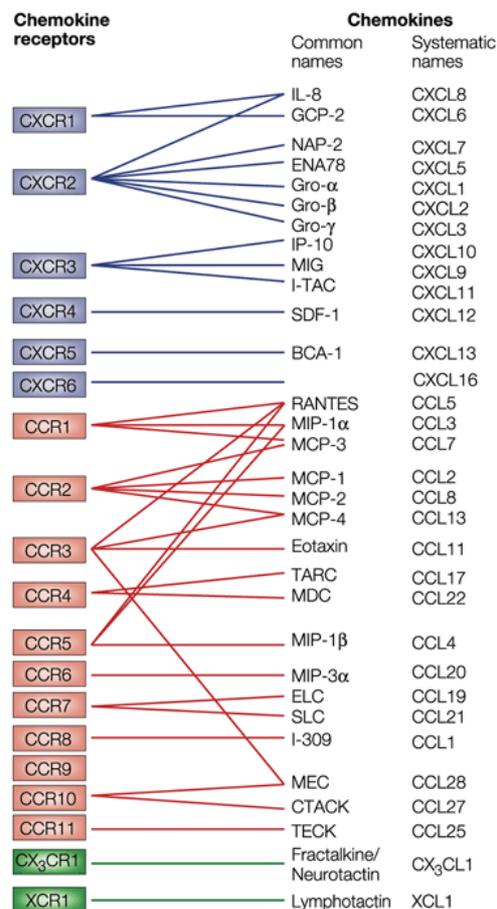


Figura 1.9 – Redundância dos receptores das quimiocinas (Proudfoot, 2002)

A ligação das quimiocinas aos receptores é uma ligação de alta afinidade e, da activação das proteínas G, resulta a activação de cascatas de segundos mensageiros intracelulares, culminando na entrada de cálcio, na mobilização de microtúbulos e na activação celular.

Estas descobertas proporcionaram novas ferramentas para a compreensão de características importantes da biologia básica do HIV, incluindo o tropismo selectivo das variantes virais para as diferentes células CD4⁺ e o mecanismo de fusão das membranas.

1.8.2.1. Principais co-receptores para a entrada do HIV: CCR5 e CXCR4

Actualmente, conhecem-se 23 receptores de quimiocinas, ou moléculas estruturalmente relacionadas, que funcionam como receptores para a entrada do HIV-1, HIV-2 e SIV *in vitro* (CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9B, CCR10, CCR11, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, XCR1, D6, DARC, FPRL1 e GPR1 (6, 7, 126, 162).

No entanto, o CXCR4 e CCR5 parecem ser os mais importantes para a patogénese da infecção pelo HIV-1, *in vivo* (9, 18).

1.8.2.1.1. Locais de expressão

A infecção dos linfócitos T *naive* por estirpes X4 parece ocorrer muito precocemente na ontogenia das células T e pode contribuir para o aumento da depleção deste tipo celular. Estudos relacionados com o desenvolvimento dos timócitos demonstraram que o CXCR4 é altamente expresso nos progenitores das células T imaturas residentes no córtex tímico.

Durante a diferenciação dos tímócitos este receptor de quimiocinas é sub-regulado enquanto o CCR5 é expresso, predominantemente, nos tímócitos maduros. Como resultado, a infecção dos tímócitos imaturos por estirpes X4 pode desregular a timopoiése levando a uma diminuição do desenvolvimento dos linfócitos T e a depleção acelerada destas mesmas células (7).

O co-receptor mais importante para a patogénese das infecções pelo HIV é o CCR5 (Figura 1.10) e parece ser essencial para uma transmissão eficaz do vírus. Este co-receptor encontra-se expresso em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ assim como noutros alvos celulares importantes, como por exemplo os macrófagos, células dendríticas imaturas e células de Langerhans (34).

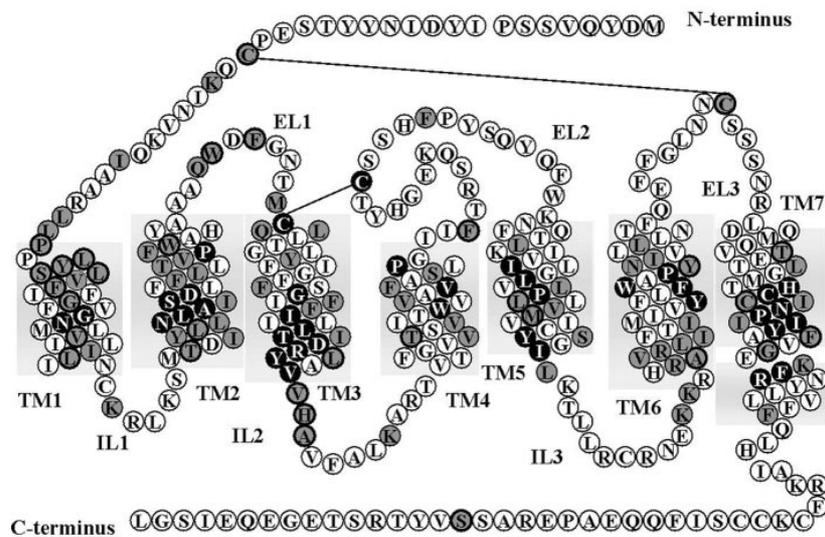


Figura 1.10 – Representação esquemática da sequência do CCR5. Os rectângulos cinzentos representam sete regiões transmembranares, TM1 a TM7 e 8 hélices. EL e IL são regiões *loop* externas e internas. Ligações bissulfito entre as cisteínas, C20-C269 e C101-C178. (adaptado de Paterlini et al, 2002)

1.8.2.1.2. Perfil biológico

Algumas características relacionadas com o perfil biológico do vírus têm sido estudadas *in vitro* permitindo classificar os isolados virais de acordo com a cinética de replicação, tropismo celular, indução da formação de sincícios e uso preferencial dos receptores de quimiocinas. Foram observados dois comportamentos distintos de isolados virais cultivados quanto à taxa de replicação. Uns replicam-se rapidamente e atingido títulos altos em curto período de tempo (vírus rápido/alto), enquanto outros se replicam de forma lenta, com baixa produção de títulos de p24 (vírus lento/baixo) (63).

O tropismo celular é uma característica utilizada para descrever a “especificidade” dos vírus relativamente à sua capacidade para infectar diversos tipos celulares. Esta especificidade, e portanto a capacidade viral para infectar um tipo celular e não outro, reside na codificação do gene *env* do HIV para a glicoproteína de superfície do invólucro viral. Os vírus podem ter tropismo para células de linhagem T CD4+ (vírus linfocitotrópicos – TL) ou para monócitos/macrófagos (vírus monocitotrópicos – TM), não tendo sido observada nestes últimos replicação e efeito citopático *in vitro* em células tumorais T CD4+. Inúmeros isolados virais, entretanto, podem ser duplo-trópicos, com capacidade de replicar-se tanto em células tumorais de linhagem T CD4+ como também em macrófagos (11) (vírus duplo-trópicos – DT) (Figura 1.11), mas com eficiências de replicação diversas, dependendo do isolado em particular e do tipo de doador das células (193).

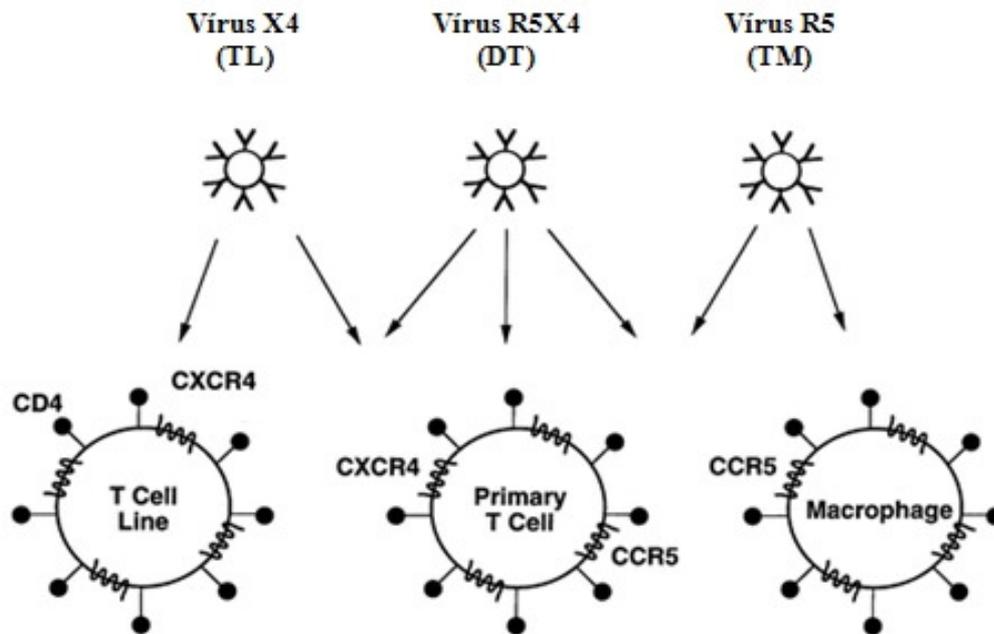


Figura 1.11 – Modelo representativo do tropismo celular do HIV (adaptado de Berger et al., 1999).

Um terceiro sistema de classificação é baseado na habilidade do vírus em induzir a formação de sincícios (células gigantes) ao infectar células MT-2, podendo os isolados ser classificados como indutores de sincícios (IS) ou não indutores de sincícios (NIS). Além disso, de acordo com o receptor de quimiocina utilizado, os isolados virais são classificados como vírus R5 para aqueles com capacidade de utilizarem o co-receptor CCR5, X4 para aqueles que utilizam o CXCR4 e aqueles com capacidade de utilizar ambos os co-receptores CXCR4 e CCR5 são denominados vírus R5X4 (11).

Em geral, existe uma associação entre estes diferentes sistemas de classificação das propriedades fenotípicas de HIV, na qual dois perfis principais são observados: isolados R5 têm, geralmente, tropismo para macrófagos, não induzem a formação de sincícios e replicam-

se mais lentamente do que os isolados X4, que têm geralmente tropismo para células de linhagem T CD4+, levando à formação de sincícios nestas células (10).

1.8.2.1.3. Fenótipo viral *versus* fase clínica

Outra associação que tem sido demonstrada é a relação do fenótipo viral com a fase clínica da infecção do indivíduo a partir do qual o vírus foi isolado, na qual, isolados R5 estão associados com a fase inicial assintomática, enquanto, estirpes X4 são isoladas, normalmente, de indivíduos em fase avançada da infecção (42). Os vários mecanismos envolvidos nesta selecção diferenciada de estirpes virais em fase distintas da infecção ainda não estão totalmente entendidos. A transmissão de vírus de um indivíduo para outro tende a resultar no estabelecimento de uma linhagem de vírus que utiliza, preferencialmente, o co-receptor CCR5, a despeito, de algumas vezes, o transmissor ser caracterizado pela predominância de variantes X4 (189). De facto, estudos indicam que a selecção de certas variantes pode ocorrer durante a transmissão sexual (207). Esta selecção das estirpes R5, em detrimento das variantes X4 pode estar, em parte, relacionada com o facto de células epiteliais do colo do útero e do cólon apresentarem uma maior expressão de receptores CCR5 em relação à CXCR4 (202). O aumento da cinética de replicação viral, que ocorre com o tempo de infecção, propicia o aparecimento de variantes virais com configurações genéticas distintas (*quasispecies*) que podem ser, eventualmente, capazes de utilizar diferentes co-receptores (201). Diversos estudos mostram que o declínio do número de células T CD4+ e a consequente progressão para a fase de SIDA estão relacionados com a emergência e predomínio de estirpes capazes de utilizar o co-receptor CXCR4 (41, 156). Só em cerca de 50% dos casos ocorre um predomínio de estirpes X4 na fase assintomática sendo que, em

indivíduos infectados por HIV-1 do subtipo C, este é um acontecimento raro (27). Assim, parece ocorrer um processo de selecção ao nível das células das mucosas a partir da população (*quasispecies*) de HIV inoculada pelo indivíduo transmissor (16). Por outro lado, o facto das estirpes utilizadoras do CXCR4 (em exclusivo ou não) serem, geralmente, mais citopáticas do que as estirpes R5, *in vitro*, levanta a possibilidade da utilização do CXCR4 poder contribuir, directa ou indirectamente, para a morte celular das células alvo (11).

Essa mudança, provavelmente, ocorre como consequência de pressões selectivas do hospedeiro. Entre estas possíveis forças ambientais estão a prevalência de células com maior expressão da molécula CXCR4 em relação à CCR5 (194), aumento dos níveis de β -quimiocinas bloqueando a entrada via co-receptor CCR5 (113), níveis limitantes de CCR5 como ocorre, por exemplo, nos indivíduos heterozigóticos para a mutação CCR5 Δ 32, estimulação da expressão de CXCR4 pelas quimiocinas CC, susceptibilidade a anticorpos neutralizantes e ao ataque de CTL (*cytotoxic T-lymphocytes*) e/ou propriedades intrínsecas dos isolados virais (132).

É importante salientar que as estirpes, que têm a capacidade de infectar células independentemente dos co-receptores normalmente utilizados (CCR5 e CXCR4), revelam particularidades na sua capacidade de interacção com as mesmas. Uma replicação menos eficiente, assim como, a possível necessidade de uma maior quantidade de passos na ligação da glicoproteína SU aos co-receptores, de modo a permitir a fusão da membrana celular com o invólucro viral ou para induzir alterações conformacionais de um modo muito mais lento do que aquele efectuado com os co-receptores CCR5 ou CXCR4, são algumas das hipóteses levantadas (6).

1.8.2.2. Delecção de 32 pb (CCR5-Δ32)

O receptor de quimiocinas CCR5 é codificado pelo gene *CMKBR5* localizado na região p21.3 do cromossoma 3, dentro de um grupo de genes que codificam múltiplos receptores de quimiocinas (153). Polimorfismos de certas quimiocinas e de genes receptores de quimiocinas têm sido correlacionados com a resistência à infecção pelo HIV-1, ou progressão mais lenta para SIDA. Experiências *in vitro* revelaram que os linfócitos derivados destes doentes são resistentes à infecção por isolados de HIV-1 com tropismo para macrófagos mas não a infecções com isolados com tropismo para linfócitos T. Os linfócitos destes indivíduos não expressam CCR5 na membrana celular e têm geneticamente uma delecção de 32 nucleótidos no gene que codifica para a proteína CCR5 (52, 64, 108, 153). Globalmente, foram identificados poucos doentes infectados por HIV-1, que apresentem esta delecção em homozigotia (*ccr5Δ32+/ccr5Δ32+*), tendo-se verificado que todos foram infectados por isolados que usam o CXCR4. Os indivíduos que são heterozigóticos para a delecção de 32 pares de bases no gene *ccr5* (*ccr5/ccr5Δ32+*) mostram uma expressão diminuída de CCR5 na membrana celular e são frequentemente encontrados nos indivíduos que têm uma lenta progressão para a doença (52, 64, 107, 108, 153).

A resistência à infecção pelo HIV-1 foi descrita em indivíduos que permanecem seronegativos apesar de repetidas exposições ao vírus. Alguns estudos têm, contudo, sugerido que indivíduos heterozigóticos *ccr5Δ32* são mais susceptíveis a infecções oportunistas durante os estadios mais tardios da progressão para SIDA (64, 107).

A frequência da delecção de 32 pares de bases no gene *ccr5*, tem sido estudada em várias populações e demonstrou-se que a menor frequência é encontrada na população europeia (13%), enquanto na população de origem africana e asiática esta delecção é muito frequente (107).

1.8.2.3. Co-receptores alternativos

Para além do CCR5 e do CXCR4, outros co-receptores podem também ser importantes para a replicação viral em certos tipos de células ou compartimentos celulares, o que provavelmente conduz a alterações profundas na progressão e manifestação da doença. Esta noção sugere a importância da análise da utilização de co-receptores por isolados primários obtidos a partir de diferentes células e tecidos. Por exemplo, o CXCR6 é abundantemente expresso na placenta, o que levanta a possibilidade deste co-receptor ter um papel importante na transmissão vertical (11). Por seu lado, o GPR15/BOB, ao contrário do CCR5 e do CXCR4, encontra-se expresso abundantemente na superfície basal do epitélio intestinal, apesar de estar descrito como um co-receptor indutor de infecção pouco eficiente (36). Por sua vez, o CCR3 é expresso pelos microglia (macrófagos residentes do cérebro), neurónios e astrocitos nos cérebros normais e encefalíticos e tem sido descrito como mais predominantemente expresso nas crianças com SIDA (179), assim como em macacos infectados com SIV (195). A presença deste co-receptor, juntamente com o CCR5 e o receptor CD4, no endotélio cerebral de crianças, pode explicar o aumento da incidência de alterações no SNC em crianças com SIDA, quando comparados com o mesmo tipo de doentes adultos (179). O CCR2 também tem sido proposto como um receptor importante nos processos fisiológicos e patológicos do SNC, uma vez que se demonstrou a sua funcionalidade como receptor para MCP-1, em astrocistos de fetos humanos, principal mediador da inflamação do SNC em diversos estados patológicos (2).

O CCR8, inicialmente denominado TER1, ChemR1 e CKR-L1 é expresso em diferentes tipos de células incluindo monócitos, e linfócitos T (78, 148, 152, 186). Nos linfócitos T, é particularmente evidente a sua expressão na sub-população de linfócitos T-auxiliadores do tipo 2 (Th2) (47, 208). Este receptor das quimiocinas pode igualmente ser detectado na

membrana dos linfócitos NK e em células não-hematopoiéticas, tais como células endoteliais, células da musculatura lisa e células do SNC (82, 89). Para além do seu papel fisiológico, o CCR8 tem sido descrito como um possível co-receptor de certas estirpes de HIV-1 e SIV (33, 85, 105, 151). Devido ao seu padrão de expressão, o CCR8 pode potencialmente servir como co-receptor do HIV *in vivo* e, dessa forma, desempenhar um papel importante na patogénese da infecção pelo HIV.

Uma das características mais marcantes das estirpes de HIV-2 é a enorme variabilidade no modo como os vírus interagem com os receptores de quimiocinas. A forma como o HIV-2 utiliza os receptores das quimiocinas é considerada promíscua, uma vez que, contrariamente ao HIV-1, que tem sido descrito como tendo um padrão de utilização bem definido, pode usar um espectro mais alargado de co-receptores para infectar linhas celulares CD4⁺, *in vitro*, utilizando-os, em alguns casos, de um modo tão eficaz como o CCR5 ou o CXCR4. Perante esta utilização indistinta, foi proposto que as glicoproteínas do invólucro do HIV-2 poderiam apresentar uma estrutura oligomérica mais flexível, por comparação com as do HIV-1 (6).

A menor patogenicidade observada no HIV-2 entra em conflito com o maior tropismo e a gama mais alargada de utilização de co-receptores (15). A capacidade das estirpes de HIV-2 de interagirem e de usarem, eficientemente, os diferentes receptores de quimiocinas como factores de entrada viral, pode levar à infecção inapropriada de células não-activadas ou não-permissivas, nas quais o vírus é incapaz de completar o seu ciclo replicativo devido a bloqueios intracelulares (7).

1.8.3. Topologia dos co-receptores

Os co-receptores estão, topologicamente, organizados numa região extracelular N-terminal, sete segmentos transmembranares, três *loops* extracelulares, três *loops* intracelulares e uma região intracelular C-terminal. As regiões extracelulares dos co-receptores têm sido o alvo de mais estudos, uma vez que está estabelecido que a glicoproteína SU efectua o contacto directo inicial com estas regiões. No entanto, as regiões transmembranares e/ou citoplasmáticas dos co-receptores também influenciam a sua actividade, possivelmente afectando o funcionamento das regiões extracelulares. Cada uma das regiões extracelulares tem sido implicada na função dos co-receptores, e vários autores sugerem que o segmento N-terminal tem uma importância particular (11).

1.8.4. Factores determinantes do tropismo celular

1.8.4.1. Gene *env*

As glicoproteínas do invólucro viral possuem um papel crucial nos eventos iniciais da infecção pelo HIV, mediando a ligação do vírus à célula hospedeira e a fusão do invólucro viral e membrana celular.

A análise comparativa das sequências de nucleótidos do gene *env* de vários isolados de HIV demonstrou que a glicoproteína SU é composta por cinco regiões hipervariáveis, V1 a V5, separadas por cinco regiões relativamente mais conservadas, C1 a C5 (200). A região de ligação ao receptor CD4 é descontínua, dependendo do correcto *folding* da glicoproteína SU. A maioria dos aminoácidos envolvidos na ligação ao CD4 está localizada na região carboxi-

terminal da glicoproteína, da região C2 à região C5. A região hipervariável V3, localizada no meio da glicoproteína SU, é formada por cerca de 33-35 aminoácidos delimitados por duas cisteínas envolvidas em pontes dissulfureto. A glicoproteína TM é constituída por uma região extracelular, uma região de inserção na membrana citoplasmática (região transmembranar) e uma região intracitoplasmática (29) (Figura 1.12). A glicoproteína TM tem um papel determinante na fusão viral, necessária para a entrada na célula, e na ligação do invólucro à proteína de matriz MA, necessária para a formação de novos viriões. Tanto a proteína SU como a TM são altamente antigénicas, ou seja suscitam a produção de anticorpos nos hospedeiros infectados.

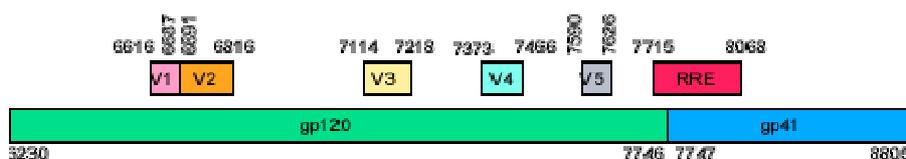


Figura 1.12 – Representação pormenorizada do gene *env* (adaptado de http://bioquest.org/bedrock/problem_spaces/hiv/background.php)

A interacção entre a SU e a molécula CD4 provoca alterações na conformação desta glicoproteína, nomeadamente nas regiões variáveis V1, V2 e V3, que levam à exposição do local de ligação ao co-receptor (131, 200).

As mutações na região V1/V2, ou perto dela, parecem compensar directa ou indirectamente as mutações da V3 que condicionam as alterações na utilização dos co-receptores. As mutações da V3 são necessárias para que ocorra a troca de utilização de co-receptor, mas são

insuficientes para produzir intermediários infecciosos na evolução para a utilização de CXCR4. Vários estudos indicam que no HIV-1, o aumento da carga positiva de um ou dois aminoácidos (posições 11 e/ou 25) na extremidade carboxi-terminal da região V3, é responsável pela alteração do fenótipo R5 para X4 (45, 192).

Em analogia com o HIV-1, o papel determinante da utilização de co-receptores por estirpes de HIV-2 tem sido atribuído à região V3 (45, 192). No entanto, a ausência de variabilidade significativa nesta região parece difícil de correlacionar com a imprevisibilidade da utilização de co-receptores detectada na maioria das estirpes HIV-2, o que sugere que outras regiões, tais como a V1/V2, altamente variáveis entre as várias estirpes caracterizadas de HIV-2, possam influenciar directamente a ligação do co-receptor (7).

A baixa variabilidade da região V3 pode também indicar que, no HIV-2, esta região está menos exposta à pressão imunológica do hospedeiro do que no HIV-1.

O padrão de glicosilação da glicoproteína SU do HIV tem sido descrita como tendo um papel importante no uso dos vários co-receptores. A falta de um local de glicosilação a seguir à primeira cisteína da região V3 é importante para um uso eficiente do CXCR4 (139). No HIV-2 ainda não foi estabelecida uma correlação entre o grau de glicosilação e a utilização de co-receptores (161).

A utilização indiferenciada dos co-receptores por parte do HIV-2 sugere por outro lado que a conformação da SU do HIV-2 seja mais relaxada do que a do HIV-1, permitindo ao vírus interagir com vários co-receptores, embora nem sempre com eficiência (7).

1.8.4.2. Concentração e localização dos receptores celulares

Existem vários factores, para além da distribuição/regulação de co-receptores na membrana celular, envolvidos na selecção dos diferentes co-receptores utilizados. Um factor que pode contar para o sucesso do processo da entrada viral é a concentração relativa de receptores celulares e a sua co-localização em locais específicos da membrana plasmática (99, 100). Diferentes tipos celulares revelam diferentes concentrações de CD4 e de co-receptores na membrana plasmática (102, 103). A variação natural destes níveis é também observada durante a activação/diferenciação dos linfócitos T e dos macrófagos e está directamente correlacionada com a susceptibilidade celular à infecção pelo HIV-1 (190). É necessária a existência de um nível basal de concentração de receptores celulares, numa determinada região da membrana plasmática, para que a infecção ocorra tanto nas células primárias como em linhas celulares linfocíticas T ou em macrófagos. A utilização de co-receptores tem sido testada *in vitro* por ensaios de infecciosidade em linhas celulares que expressam vários milhares de cópias de CD4, CCR5 e de outros co-receptores. Para os linfócitos primários e macrófagos a quantidade de CCR5 e CXCR4 é muito inferior, dependente do dador e do estado de activação/diferenciação celular (7). Este factor de densidade de receptores celulares é particularmente crítico nos linfócitos primários e nos macrófagos, ao contrário do que acontece nas linhas celulares normalmente utilizadas para inferir o papel dos co-receptores *in vitro*.

Em tecidos linfóides como os nódulos linfáticos e timo, entre 1 a 10% dos linfócitos e dos macrófagos expressam co-receptores. No timo, um elevado número de linfócitos T imaturos e maduros apresentam CXCR4 e CCR8, tornando-os susceptíveis à infecção de variantes que usem estes receptores para a entrada celular (4, 23, 143). A elevada expressão do CXCR4, tanto em timócitos imaturos como maduros, torna estas células susceptíveis à infecção por

variantes X4. Esta observação é consistente com resultados que demonstram que as variantes X4 revelam tropismo para os timócitos e replicam-se mais rápido que as variantes R5. O HIV pode mediar a depleção de linfócitos ao infectar directamente e replicar-se em timócitos durante os vários estadios de maturação dos linfócitos T (203).

As mucosas têm um papel primordial na transmissão e patogénese do HIV-1 (160, 168). Os tecidos subepiteliais genitais e rectais têm uma elevada densidade de células dendríticas, macrófagos e linfócitos T que expressam CD4, CCR5 e, num menor grau, CXCR4. Cada um destes tipos celulares é, portanto, susceptível à infecção pelo HIV (118). Os linfócitos T e macrófagos positivos para os co-receptores na porção distal do tracto gastro-intestinal (TGI) e tracto genito-urinário (TGU) podem servir como porta de entrada e fonte de disseminação viral (203).

No recto, várias células CCR5+ e CCR3+ são detectadas na lâmina própria enquanto células CXCR4+ são raramente detectadas (118, 203). Na vagina, ainda que não se detecte a expressão de co-receptores, são encontradas um grande número de células positivas para CXCR4 e CCR3 mas não para CCR5. Contudo, são as variantes R5 e não X4 as predominantemente transmitidas através do TGI e TGU, o que sugere a existência de uma pressão selectiva em favor de R5 durante o contacto sexual (203).

Relativamente ao TGI, após translocação pelo epitélio da mucosa, o HIV-1 encontra potenciais células alvo nas populações de linfócitos e macrófagos da lâmina própria (118, 160, 167, 168). A expressão de CCR5, mas não de CXCR4, nas células epiteliais pode ser relevante para a transmissão preferencial das variantes R5 (118).

Os linfócitos T CD4+ da lâmina própria expressam o CCR5 e o CXCR4 e são as únicas células mononucleadas capazes de suportar a replicação do HIV-1 na mucosa (160, 167, 168).

Os macrófagos intestinais têm níveis reduzidos de CD4 e CCR5, o que contribui para a menor

permissividade dos macrófagos intestinais ao HIV-1 (159). Deste modo, os linfócitos, mas não os macrófagos, são as primeiras células alvo do HIV-1 na mucosa intestinal (167).

A partir da mucosa, o vírus é disseminado para locais sistémicos, seguido de profunda depleção de linfócitos T CD4+, primeiro na lâmina própria intestinal e depois no sangue (160, 167, 168). Apesar da prevalência dos macrófagos infectados pelo HIV-1 na mucosa ser baixo, o extraordinário tamanho da mucosa GI atribui aos macrófagos intestinais um papel importante como reservas do HIV-1, uma vez que à medida que os linfócitos T CD4+ da mucosa e circulantes são eliminados, os monócitos do sangue periférico são recrutados para a mucosa onde se diferenciam em macrófagos da lâmina própria (167).

Quanto ao TGU, são os macrófagos e não os linfócitos que detêm o papel mais importante. Os macrófagos vaginais expressam os co-receptores CD4, CCR5 e CXCR4. Os macrófagos vaginais e não os intestinais são permissivos às variantes R5 após o vírus se translocar através do epitélio (160).

A replicação robusta do HIV-1 nos macrófagos vaginais indica que são uma fonte viral no tracto genital feminino durante a infecção pelo HIV-1. Além disso, a susceptibilidade dos macrófagos, na mucosa vaginal, ao HIV-1 sugere a potencial contribuição dos macrófagos vaginais na transmissão heterossexual do HIV-1, particularmente na presença de infecções genitais que aumentem a expressão de CCR5, a replicação do HIV-1 e a produção de citocinas que, por sua vez, intensificam a replicação do HIV-1 (160).

Consistente com outros estudos, um elevado nível de expressão do CXCR4 é encontrado nos neurónios tanto no SNC como no sistema nervoso periférico (SNP). Além deste co-receptor, também o CCR3 está presente nos tecidos neuronais em concentrações elevadas (203).

O HIV-1 entra no SNC com a passagem de células mononucleadas infectadas pelo HIV-1 através da barreira hemato-encefálica (BHE) (70).

As células da microglia, o maior alvo da infecção pelo HIV-1 no SNC, macrófagos e outros tipos celulares expressam CXCR4, CCR5 e CCR3 (70). O CCR5 e o CCR3, juntamente com o CD4, são co-receptores do HIV-1 nas células microgliais. Já a infecção mediada pelo CXCR4 é relativamente ineficiente e pode reflectir as diferenças na capacidade dos vírus para usar CCR5 e CXR4 em células que expressam baixos níveis de CD4. Enquanto as variantes R5 requerem apenas uma baixa concentração de CD4, as variantes que usam o CXCR4 necessitam de concentrações elevadas. Como tal, a baixa concentração de CD4 nas células da microglia pode ser o motivo do uso ineficiente de CXCR4 (70).

Outros receptores das quimiocinas como CXCR2, GPR1, GPR15, CXCR6 e US28 também são expressos no cérebro, mas o seu papel ainda está por determinar (70, 203).

1.8.4.3. Estado fisiológico da célula

Outro factor é o efeito do envolvimento do co-receptor no estado fisiológico da célula. Numerosos autores têm referido que a ligação da glicoproteína SU do invólucro do HIV-1 aos receptores de quimiocinas potencia a activação da transdução de sinal e que pode ser responsável pelo recrutamento dos linfócitos T CD4⁺ aos locais de replicação viral ou pelo incremento da replicação viral, *in vivo*, através da activação das células alvo (4, 28, 51, 104). Apesar desta sinalização de receptores não ser necessária para a entrada do vírus na célula, estas cascatas de sinalização de quimiocinas, *in vivo*, podem preparar as células alvo para a replicação viral e, conseqüentemente, podem ser responsáveis por algumas das respostas celulares ao vírus (3, 62).

1.9. O papel dos monócitos/macrófagos na imunopatogénese da infecção pelo HIV

Quando ocorre uma infecção, os monócitos/macrófagos desempenham diversas actividades antimicrobianas. Como células fagocíticas que são, internalizam e digerem bactérias e outras células, removem compostos tóxicos produzidos pelo metabolismo, produzem mediadores inflamatórios que podem destruir bactérias, parasitas e vírus, e contribuem para a activação de outras células. Deste modo, os monócitos/macrófagos desempenham funções importantes em processos inflamatórios (5).

Os monócitos/macrófagos desempenham um papel importante em múltiplos aspectos da patogénese da infecção por HIV. Tal como as células T e as células dendríticas, os monócitos/macrófagos expressam os receptores para a entrada do vírus e, como tal, constituem potenciais alvos do HIV (40). Apesar disso, os dados da literatura sugerem que os monócitos só raramente são produtivamente infectados *in vitro* (39). No entanto, ao diferenciarem-se em macrófagos *in vitro*, os monócitos sofrem um aumento da expressão de CCR5, tornando-se mais susceptíveis à infecção por HIV-1 (123, 190). *In vivo*, o HIV-1 pode ser isolado a partir de monócitos de indivíduos infectados, mas numa baixa frequência (75, 175).

Apesar do número absoluto de monócitos/macrófagos infectados no organismo ser baixo comparativamente ao de células T CD4+ (175), a infecção de macrófagos reveste-se de características peculiares. Ao contrário das células T, os macrófagos são mais resistentes aos efeitos citopáticos do vírus (25). Assim, na ausência de morte celular, os macrófagos infectados são preservados, produzindo e acumulando viriões durante um longo período de tempo (25), constituindo reservatórios virais. Na realidade, foi documentada a presença de monócitos infectados por HIV em indivíduos sob tratamento com HAART (101), tendo sido possível quantificar o DNA proviral nestas células, mesmo em situações de supressão de

virémia (83, 171). A longevidade dos macrófagos, relativamente à dos linfócitos T infectados por HIV-1, pode reflectir diferenças na dinâmica de replicação viral. Tendo em conta a sua capacidade de invasão dos tecidos a partir da corrente sanguínea, os macrófagos infectados podem transmitir o vírus para tecidos e órgãos, incluindo o cérebro. Assim, os monócitos/macrófagos têm um papel fundamental na persistência e disseminação do vírus pelo organismo (25).

Apesar dos monócitos/macrófagos não sofrerem uma depleção significativa na infecção por HIV e de alguns estudos não terem documentado alterações na função de monócitos/macrófagos de indivíduos infectados por HIV-1 (129), vários outros estudos têm reconhecido anomalias nas suas funções *in vivo* e *in vitro* (93). Tais defeitos incluem anomalias na fagocitose (93) na capacidade de destruir microrganismos intracelulares e na sua função de apresentação antigénica (60).

Os defeitos funcionais dos monócitos/macrófagos podem ter um importante impacto na imunopatogénese da infecção por HIV.

1.10. Vírus CD4-independentes

Em certos casos têm sido descritas interacções SU-co-receptor na ausência de CD4 (11, 97). Este fenómeno foi primeiramente observado para o HIV-2 (59, 142). Estes vírus CD4-independentes possuem a glicoproteína SU numa conformação nativa, na qual o local de ligação ao co-receptor está, total ou parcialmente, exposto, podendo assim interagir directamente com os co-receptores (11, 97). No entanto, esta via é relativamente menos eficaz do que a via normalmente utilizada (11, 184).

Assim, o HIV parece ter evoluído no sentido de utilizar o CD4 não apenas como um modo eficaz de aderir às células alvo, mas também como mecanismo protector das regiões conservadas, necessárias à interacção com o co-receptor, e alvos importantes dos anticorpos neutralizantes (161). Não é de estranhar, por isso, que uma infecção independente do CD4 seja muito mais sensível à neutralização. Esta maior sensibilidade à neutralização pode, em parte, explicar a menor carga viral e a progressão mais lenta para a doença, observadas nos indivíduos infectados por HIV-2 (184).

Os vírus com uma necessidade reduzida do CD4 podem, no entanto, apresentar vantagens adaptativas quando as concentrações de anticorpos neutralizantes são baixas. Tais condições podem ocorrer nos progressores rápidos, nos órgãos imunopreviligados, como por exemplo o cérebro, e na fase terminal da doença, quando a resposta imune é diminuta. A emergência de estirpes menos dependentes do CD4 para efectuar a infecção, pode conferir uma colonização mais extensa dos macrófagos no cérebro e outros tecidos não-linfáticos, assim como das subpopulações de células T que expressam níveis baixos de CD4 (13).

1.11. O HIV-2 como modelo de estudo da patogénese da SIDA

Os factores virais e do hospedeiro que podem conferir protecção contra a infecção ou retardarem a progressão da doença, constituem um dos principais aspectos que permanece por elucidar na patogénese da infecção por HIV. Neste sentido, o estudo de modelos mais atenuados de doença, tal como os vírus HIV-1 isolados a partir de indivíduos que apresentam uma progressão lenta da infecção, *long-term non-progressors (LTNP)* (154, 158) e como a infecção por HIV-2, pode permitir identificar mecanismos subjacentes a uma menor taxa de progressão da doença.

Apesar de o HIV-1 e o HIV-2 se associarem a um espectro clínico semelhante, estudos comparativos entre as duas infecções têm demonstrado que o declínio de células T CD4+ em circulação e a progressão para doença ocorrem mais lentamente na infecção por HIV-2 do que na infecção por HIV-1 (114, 115). Para além disso, a maioria dos indivíduos infectados por HIV-2 têm níveis de virémia abaixo do limite de detecção das técnicas utilizadas e, nos casos em que a virémia é detectável, os valores são muito inferiores aos observados na infecção por HIV-1 (141, 164). Esta reduzida virémia contribui para a menor transmissibilidade sexual (92, 121) e perinatal (61, 114) da infecção por HIV-2 e, conseqüentemente, para uma disseminação geográfica mais limitada, sobretudo confinada a países de África Ocidental (115, 130). Em alguns desses países, a infecção por HIV-2 tem vindo mesmo a decrescer nos últimos anos, provavelmente devido à sua baixa taxa de transmissão (48). Devido às relações com as suas ex-colónias, Portugal é o único país não-africano com uma prevalência significativa de infecção por HIV-2 (cerca de 3% dos casos notificados, segundo a Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA) (44), tornando-se um local privilegiado para o estudo desta infecção.

Os factores responsáveis pelas diferenças entre as infecções por HIV-1 e por HIV-2 não estão clarificados, mas envolvem provavelmente mecanismos virológicos e imunológicos.

Apesar da menor quantidade de vírus em circulação nos indivíduos infectados por HIV-2, os níveis de DNA proviral, ou seja, DNA integrado no genoma da célula hospedeira, são equivalentes entre as duas infecções (77, 141, 169). Esta aparente discrepância entre a semelhança na quantidade de DNA proviral e a diferença de virémia observadas nas duas infecções pode ser devida a uma menor capacidade replicativa do HIV-2. Com efeito, foram recentemente detectados menores níveis de mRNA *in vivo* na infecção por HIV-2 do que na

infecção por HIV-1, sugerindo que, apesar de ser capaz de se estabelecer como provírus na célula hospedeira, o HIV-2 se associa a uma menor transcrição viral (110). Tal pode ser devido à selecção de distintos locais de integração (111), a diferenças entre os LTR e, por conseguinte, a diferenças quanto à regulação da transcrição (187). A menor taxa de replicação do HIV-2 pode ajudar a explicar os menores níveis de virémia que se observam na infecção por este vírus. Para além disso, análises da evolução da sequência C2-V3-C3 do invólucro viral ao longo de cerca de 10 anos mostraram menor divergência e diversificação em indivíduos infectados por HIV-2 do que nos infectados por HIV-1, o que é consistente com um menor *turnover* do vírus (112).

Do ponto de vista do hospedeiro, há evidências de que o sistema imunitário tem uma melhor capacidade de controlar a infecção por HIV-2 do que a infecção por HIV-1.

Por exemplo, tem sido documentada uma prevalência superior de anticorpos neutralizantes contra vírus autólogos (14) e heterólogos (147) na infecção por HIV-2 do que na infecção por HIV-1. Comparativamente aos indivíduos infectados por HIV-1, os indivíduos infectados por HIV-2 parecem conseguir produzir anticorpos com uma actividade neutralizante mais alargada (184).

Os estudos disponíveis sobre a avaliação de respostas de células T CD4+ específicas de Gag, considerada a proteína mais imunogénica na infecção por HIV-2, sugerem ainda que as respostas específicas são superiores na infecção por HIV-2 do que na infecção por HIV-1, particularmente na capacidade dos linfócitos T CD4+ específicos produzirem IL-2 e de proliferarem (55, 56). Foi também documentada uma correlação negativa entre a frequência de células T CD4+ específicas de Gag e os níveis de DNA proviral na infecção por HIV-2 (67).

Têm sido feitos diversos estudos centrados no estudo comparativo entre as duas infecções desde o início da epidemia, com o objectivo de compreender a imunopatogénese da infecção por HIV em geral a partir dos mecanismos envolvidos na menor patogenicidade da infecção por HIV-2 (1, 26, 67, 68, 74, 169, 173, 174). Sousa e colaboradores realizaram um estudo em que, relativamente à representação relativa de células *naive versus* memória/efectoras, não foram detectadas diferenças significativas entre as duas infecções quando foram comparados indivíduos infectados por HIV-1 e por HIV-2 com o mesmo grau de depleção de células T CD4+ (173). Por outro lado, foi documentada uma maior preservação da frequência de células T CD4+ produtoras de IL-2 na infecção por HIV-2 do que na infecção por HIV-1, o que, tendo em conta o papel desta citocina na proliferação e sobrevivência linfocitárias, pode contribuir para a menor taxa de declínio de células T CD4+ na imunodeficiência associada ao HIV-2 (1). Foi também sugerido que a infecção por HIV-2 se associa a uma melhor preservação da actividade tímica do que a infecção por HIV-1, que pode compensar, pelo menos parcialmente, a perda de células T CD4+ (74).

São diversos os estudos que têm sido feitos e que revelam potenciais mecanismos para a menor patogenicidade do HIV-2. Torna-se pois claro a importância do estudo do HIV-2 para melhor compreender a imunopatogénese da infecção por HIV em geral.

2. OBJETIVOS

2. Objectivos

2.1. Geral

Com o desenvolvimento deste projecto pretende-se dar continuidade à linha de investigação já iniciada na Unidade de Tropismo e Patogénese do HIV do CPM-URIA, relativamente ao estudo da utilização dos co-receptores por parte de isolados primários de HIV-1 e HIV-2. Neste projecto será dada prioridade a HIV-2, devido ao número relativamente elevado de infecções em Portugal (3,5% dos casos de SIDA reportados) e porque os dados relativos ao HIV-2 são escassos e o seu uso como modelo de uma infecção naturalmente menos patogénica pode abrir novas perspectivas sobre a patogénese da infecção pelo HIV, bem como de novas estratégias para o seu tratamento e profilaxia. Apesar disso, serão igualmente incluídos isolados virais de HIV-1 com o duplo objectivo de servirem de grupo de referência e, também, para averiguar qual o padrão dominante do uso dos co-receptores, nomeadamente CCR8, CCR5 e CXCR4. Desta forma será possível pôr-se em evidência eventuais diferenças entre HIV-1 e HIV-2.

2.2. Específicos

Neste contexto um dos objectivos deste trabalho prende-se com a caracterização de várias estirpes primárias de HIV-1 e HIV-2 quanto à sua capacidade de utilização do co-receptor alternativo CCR8, paralelamente com os co-receptores mais comuns, CCR5 e CXCR4. Este objectivo será importante para a compreensão dos mecanismos patogénicos associados à infecção pelo HIV.

É também objectivo deste trabalho caracterizar a capacidade para infectar macrófagos derivados de monócitos (MDM) por parte dos isolados que venham a revelar capacidade de utilizar o co-receptor CCR8.

Com base nos diferentes resultados entretanto obtidos será tentada uma correlação entre o perfil de utilização dos co-receptores e os dados imunológicos e clínicos disponíveis dos indivíduos a partir dos quais os vírus foram isolados.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e métodos

3.1. Amostras

Neste estudo foi analisado um conjunto de 95 isolados primários, dos quais 65 eram estirpes de HIV-2 e 30 eram estirpes de HIV-1. A escolha das amostras deveu-se ao facto de serem isolados virais provenientes de indivíduos em diferentes fases de infecção e das quais existem amostras na Viroteca da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

As estirpes primárias de HIV utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) dos indivíduos infectados por co-cultura com CMSP de dadores não infectados pelo HIV conforme técnica descrita em Ulrich *et al.*, 1988 (191). Em alguns casos foi possível ter acesso a vírus isolados dos mesmos indivíduos em alturas diferentes (amostras de seguimento).

3.2. Criação de uma base de dados

Um estudo como o que aqui se propõe passou, numa primeira fase, pela criação de uma base de dados informatizada onde foi incluída a informação possível relativamente a:

- Doente (número de registo, origem);
- Dados laboratoriais (número de linfócitos T CD4+, serologia);
- Características virológicas apresentadas pelo isolado viral (tipo de co-receptores usados, carga viral, fenótipo viral);
- Dados clínicos e de terapêutica mais relevantes, do indivíduo a partir do qual se isolou o vírus, sempre que possível.

Desta forma foi possível compilar toda a informação relevante para a caracterização clínica e virológica - e a interligação entre as duas - num único documento. Mediante a criação desta base de dados tornou-se, igualmente, possível ter acesso a amostras sequenciais do mesmo indivíduo, com o potencial interesse de se averiguar eventuais evoluções no contexto clínico e/ou virológico.

3.3. Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ no gene *ccr5*

A propagação dos vírus foi feita em CMSP, isoladas de diferentes *buffy-coats*, com genótipo *wild-type* no gene *ccr5* (*wtccr5*). Para confirmação do genótipo procedeu-se à detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ no gene *ccr5*, com a finalidade de se confirmar a inexistência desta mutação nas CMSP utilizadas, que pudesse ser directamente responsável pela selecção de uma sub-população viral não-CCR5. Esta mutação foi identificada como responsável pela ausência ou expressão diminuída do co-receptor CCR5, verificando-se também que esta deleção influencia a susceptibilidade da infecção pelo HIV-1 e a progressão para a doença. De forma a garantir a inexistência da deleção $\Delta 32$ no gene *ccr5*, amplificou-se o DNA genómico das CMSP pela reacção de PCR com os primers CCR5-R e CCR5-F (Tabela 3.1), já descritos na literatura (6).

Tabela 3.1 – Primers para amplificação por PCR do gene *ccr5*.

Primer	Região	Sequência 5' - 3'
CCR5-F	UTR	cct ggc tgt cgt cca tgc tg
CCR5-R	UTR	agc cat gtg cac aac tct

A reacção de amplificação foi efectuada com o kit comercial *puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences, UK) e a mistura e condições da reacção encontram-se descritas na tabela seguinte (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Condições de PCR para amplificação do fragmento de 735pb.

Pares de primer	Tamanho do fragmento	Mistura de reacção	Condições da reacção
		1ºPCR	
CCR5-F	735		1 ciclo
			94°C, 2 min
		<i>Primer F</i> (10 µM) – 2µl	35 ciclos
		<i>Primer R</i> (10 µM) – 2µl	94°C, 30 seg
CCR5-R		DNA – 3µl	60°C, 45 seg
		dH ₂ O – 1 µl	68°C, 90 seg
			1 ciclo
			68°C, 10 min

Posteriormente fez-se electroforese em gel de agarose a 1% utilizando os protocolos existentes na literatura (6).

3.4. Criação de um stock viral

As CMSP foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll e foram estimuladas com 3µg/ml fitohemaglutinina (PHA; *SIGMA, USA*) durante três dias e mantidas em meio RPMI 1640 (*Invitrogen, UK*) suplementado com 15% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) inactivado (*Invitrogen, UK*), L-glutamina 2mM (*GIBCO™, UK*), 50µg/ml de gentamicina e 250 µg/ml de fungizona, (*GIBCO™, UK*), 3 µg/ml de polibrene (*SIGMA®*, *USA*) e 20U/ml de interleucina 2 (IL-2; *NIH AIDS, USA*). As CMSP utilizadas em todos os ensaios provinham de uma única *pool* de diferentes *buffy-coats* para evitar variações inter-individuais na susceptibilidade à infecção por HIV.

O método utilizado para a produção de *stock* viral consistiu em concentrar os vírus fazendo uma ultracentrifugação a 50.000 rpm, durante 30 minutos, após a qual se procedeu à incubação das partículas virais com CMSP numa concentração de 5×10^6 /ml, durante 3-4 horas, a 37°C com 5% de CO₂. Após este período ajustou-se a concentração celular a 2×10^6 /ml e mantiveram-se as co-culturas durante 21 dias.

A detecção de produção viral nas culturas foi realizada duas vezes por semana, utilizando um *kit* para a detecção do antígeno p24 (Ag p24); no caso do HIV-2, a detecção foi realizada por detecção do antígeno p26 (Ag p26), por reacção cruzada, utilizando o mesmo *kit* de detecção do antígeno p24 (*Innotest, Innogenetics, Belgium*). Cerca de 75% do sobrenadante de cultura era renovado aquando da detecção do antígeno p24.

Após os 21 dias centrifugaram-se as culturas e guardou-se o sobrenadante de cultura e as células infectadas a -80°C, para posteriores ensaios de infecciosidade e extracção de DNA.

Na tabela seguinte encontram-se representados os dados clínicos, imunológicos e virológicos, dos indivíduos a partir dos quais se obtiveram os isolados virais.

Tabela 3.3 – Caracterização clínica, imunológica e virológica dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e HIV-2 a partir dos quais se isolaram os vírus.

Cohort (n)	Estadio clínico ^a		Células T CD4 ⁺ ^b		Carga viral ^c		
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	SD ^d
	Assintomático	Sintomático	≤200	>200	≥500	<500	
HIV-1 (n=30)	26,7 (8)	73,3 (22)	20,0 (6)	80,0 (24)	76,7 (23)	20,0 (6)	3,3 (1)
HIV-2 (n=65)	27,7 (18)	72,3 (47)	32,3 (21)	67,7 (44)	26,1 (17)	58,5 (38)	15,4 (10)

^a Estadio clínico de acordo com a classificação do CDC (CDC, 1992); Assintomático = estadio clínico A; Sintomático = estadio clínico B ou C

^b Número de linfócitos T CD4⁺/μl

^c Cópias de RNA viral/ ml

^d SD, sem dados

3.5. Quantificação da actividade da transcriptase reversa (RT) de cada um dos stocks virais

De forma a uniformizar o inóculo usado em cada uma das experiências de infecciosidade, tornou-se necessário avaliar a quantidade de vírus presente em cada *stock* viral criado. A replicação viral foi monitorizada pela actividade da transcriptase reversa (RT), de acordo com as instruções do fabricante (*Lenti-RT kit, Cavid, Sweden*).

Resumidamente, o procedimento consiste em duas etapas, a síntese de DNA e a quantificação do DNA. São fornecidas placas de 96 poços revestidas com um template de RNA; a reacção de mistura, constituída por primer e um nucleótido (BrdUTP), é adicionada aos poços, assim como a amostra a ser analisada. Se existir RT na amostra esta irá sintetizar a cadeia de DNA.

O próximo passo implica a ligação do anticorpo α -BrdU à cadeia dupla de DNA/RNA. Depois adiciona-se um substrato colorimétrico e o produto é quantificado. A actividade do substrato é proporcional à actividade de RT na amostra.

A quantidade de inóculo estabelecida, e usada em todos os ensaios, foi de 1ng RT de vírus num volume total de 100 μ l.

3.6. Estudos de infecciosidade

3.6.1. Linha celular GHOST

Com o objectivo de analisar a utilização dos receptores de quimiocinas como co-receptores para a entrada e infecção das células alvo, foram inoculadas, com quantidades iguais de inóculo viral, várias linhas celulares GHOST co-expressando cada uma delas a molécula CD4 e um dos receptores das quimiocinas estudado (CCR8, CCR5 e CXCR4). A linha celular de osteosarcoma humano GHOST e as células derivadas desta linha celular que expressam diferentes co-receptores (CCR5, CXCR4 e CCR8), provenientes de *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*, foram cultivadas em monocamada em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; *GIBCOTM, UK*) suplementado com 10% (v/v) de SBF inactivado, 250 μ g/ml de fungizona (*GIBCOTM, UK*), 50 μ g/ml de gentamicina (*GIBCOTM, UK*),

500µg/ml de geneticina (*GIBCO™, UK*), 100µg/ml de higromicina (*ROCHE, USA*) e 1µg/ml de puromicina (*SIGMA®, USA*).

As linhas celulares GHOST, foram semeadas em placas de 24 poços um dia antes da infecção, numa concentração celular de $1,5 \times 10^4$ /poço. Para a obtenção do perfil de utilização de co-receptores procedeu-se à inoculação de cada linha celular com a mesma quantidade dos diferentes isolados virais (1 ng RT de vírus num volume total de 100 µl) e incubação durante 3-4 horas a 37°C na presença de 3 µg/ml de polibrene (Hexadimethrine bromide; *SIGMA®, USA*). As células foram então lavadas com tampão fosfato salino (PBS), cultivadas num volume de 500 µl de DMEM completo (descrito acima) e mantidas em cultura durante 15 dias. Durante este período o meio de cultura foi renovado nos dias três, seis, nove, 12 e 15 após a infecção.

A capacidade de infectar as células foi monitorizada através da detecção do antígeno p24 (Ag p24) no sobrenadante das culturas expostas aos diferentes vírus. Como controlos foram usadas estirpes de HIV-2 e HIV-1 já caracterizadas.

3.6.2. Macrófagos derivados de monócitos (MDM)

Com o objectivo de analisar a capacidade de infecção dos monócitos derivados de macrófagos (MDM) por parte de estirpes seleccionadas de HIV-1 e HIV-2, foram separados os monócitos do sangue periférico de dadores não infectados pelo HIV, por técnica de aderência ao plástico (73). Após isolamento, os monócitos foram colocados em placas de 24 poços numa proporção de $2,6 \times 10^6$ /poço e incubados durante três horas a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS aquecido de modo a eliminar as células não aderentes e mantidas em meio RPMI 1640 (*Invitrogen, UK*) suplementado com 15% (v/v) de soro bovino

fetal (SBF) inactivado (*Invitrogen, UK*), L-glutamina 2mM (*GIBCOTM, UK*), 50µg/ml de gentamicina e 250 µg/ml de fungizona (*GIBCOTM, UK*).

Os monócitos foram mantidos em cultura durante sete dias para se diferenciarem em macrófagos, tendo-se feito mudança de meio de dois em dois dias. A metodologia usada na infecção dos MDM foi a mesma usada para as linhas celulares GHOST. As culturas foram mantidas durante um período de 18 dias, tendo-se recolhido o sobrenadante nos dias um, dois, três, seis, nove, 12, 15 e 18. No final da cultura os MDM foram lisados para a extracção do DNA.

A infecção produtiva foi determinada por análise dos resultados da actividade da RT, nos sobrenadantes de cultura. A infecção foi confirmada pela detecção da DNA proviral pela técnica de PCR.

3.6.3. Células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)

Como controlo dos ensaios de infecciosidade em MDM procedeu-se igualmente a ensaios de infecciosidade em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP). As CMSP foram cultivadas em placas de 24 poços, numa concentração celular de 1×10^6 /poço. A metodologia utilizada foi a mesma usada para as infecções em GHOST e MDM. As células foram mantidas num volume de 500 µl de RPMI completo (descrito anteriormente) e mantidas em cultura durante 18 dias. Durante este período recolheram-se amostras nos dias um, dois, três, seis, nove, 12, 15 e 18. No final da cultura as CMSP foram lisadas para extracção do DNA.

A infecção produtiva foi determinada por análise dos resultados da actividade da RT, nos sobrenadantes de cultura. A infecção foi confirmada pela detecção de DNA proviral pela técnica de PCR.

3.7. Extracção de DNA em colunas a partir CMSP e MDM infectados com HIV-1 e HIV-2

Para a extracção do DNA a partir de células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) e macrófagos derivados de monócitos (MDM), foram utilizadas colunas e reagentes incluídos no QIAamp DNA Mini Kit (*QIAGEN, UK*), tendo sido seguidas as instruções do fabricante.

3.8. Quantificação Espectrofotométrica do material genético

O DNA extraído foi quantificado através da absorvância a 260nm no espectrofotómetro *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V3.7 (Thermo Fisher Scientific Wilmington, DE 19810 USA)*. Os valores foram controlados pela razão de absorvância 260/280nm, indicativa do grau de pureza do DNA obtido, em que a absorvância a 280nm quantifica a presença de proteínas. Após cálculo das concentrações, foi estimada a quantidade de DNA a utilizar nas reacções de amplificação.

3.9. Amplificação da região genómica LTR de HIV-1 e HIV-2

Após a extracção de DNA e respectiva quantificação, foi realizada a amplificação pela técnica de *nested* PCR da região LTR de HIV-1 e HIV-2, tanto nas CMSP como nos MDM.

Recorreu-se para a amplificação, ao sistema *puReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, UK)* com concentração de *primers* de 1,5µl. A partir do produto de

PCR do 1º *round* (*primers* externos) procedeu-se à amplificação de um fragmento utilizando *primers* internos.

Para determinar se o genoma do vírus estava integrado no genoma celular procedeu-se a um primeiro PCR para amplificar a região cromossomal *Alu* e o LTR do vírus. Seguiu-se um segundo PCR em que a partir do produto do primeiro PCR se amplificou uma parte da região genómica LTR.

As misturas e condições de amplificação encontram-se descritas nas tabelas 3.4 - 3.7. A quantidade de DNA adicionada na primeira reacção de amplificação foi de 10µl no caso das CMSP e 15µl nos MDM, enquanto na segunda reacção foram utilizados 3µl de produto amplificado.

Tabela 3.4 – Primers para amplificação por PCR do LTR do HIV-1.

Primer	Região	Localização no genoma ^A (pb)	Sequência 5' - 3'
Alu ^E	Alu	-	tcc cag cta ctg ggg agg ctg agg
1LTR1 ^E	LTR	516-540	agg caa gct tta ttg agg ctt aag c
1LTR2 ^I	LTR	45-71	ctg tgg atc tac cac aca caa ggc tac
1LTR3 ^I	LTR	411-436	gct gct tat atg tag cat ctg agg gc

A- posição na sequência genómica completa do HIV-1 HXB2 (número de acesso: K03455)

E- *primer* externo

I- *primer* interno

Tabela 3.5 – Condições de PCR usadas para HIV-1.

Pares de primer	Tamanho do fragmento	Mistura de reacção	Condições da reacção
1º PCR			
Alu	-	<i>Primer F</i> (10 µM) – 1,5µl <i>Primer R</i> (10 µM) – 1,5µl DNA – 10µl (CMSP) / 15µl (MDM) dH2O – 12 / 7µl	1 ciclo 94°C, 10 min
			35 ciclos 94°C, 20 seg 50°C, 30 seg 72°C, 40 seg
1LTR1			1 ciclo 72°C, 10 min
2º PCR			
1LTR2	391	<i>Primer F</i> (10 µM) – 1,5µl <i>Primer R</i> (10 µM) – 1,5µl DNA – 3µl dH2O – 19µl	1 ciclo 94°C, 10 min
			35 ciclos 94°C, 20 seg 50°C, 30 seg 72°C, 40 seg
1LTR3			1 ciclo 72°C, 10 min

Tabela 3.6 – Primers para amplificação por PCR do LTR do HIV-2.

Primer	Região	Localização no genoma ^A (pb)	Sequência 5' - 3'
Alu ^E	Alu	-	tcc cag cta ctg ggg agg ctg agg
2LTR1 ^E	LTR	513-537	gcc tct ccg cag agc gac tga ata c
2LTR2 ^I	LTR	75-100	cca gat tgg cag gat tac acc tca gg
2LTR3 ^I	LTR	363-384	gcc atg tta gaa ggc ctc ttg c

A- posição na sequência genómica completa do HIV-2 ALI (número de acesso: AF082339)

E- *primer* externo

I- *primer* interno

Tabela 3.7 – Condições de PCR usadas para HIV-2.

Pares de primer	Tamanho do fragmento	Mistura de reacção	Condições da reacção
1º PCR			
Alu	-	<i>Primer F</i> (10 µM) – 1,5µl	1 ciclo 94°C, 10 min
		<i>Primer R</i> (10 µM) – 1,5µl	35 ciclos 94°C, 20 seg
2LTR1	-	DNA – 10µl (CMSP) / 15µl (MDM)	64°C, 30 seg
		dH2O – 12 / 7µl	72°C, 40 seg
2º PCR			
2LTR2	309	<i>Primer F</i> (10 µM) – 1,5µl	1 ciclo 94°C, 10 min
		<i>Primer R</i> (10 µM) – 1,5µl	35 ciclos 94°C, 20 seg
2LTR3	-	DNA – 3µl	63°C, 30 seg
		dH2O – 19µl	72°C, 40 seg
3º PCR			
1 ciclo 72°C, 10 min			

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados sob luz ultravioleta, após integração de brometo de etídio directamente no gel de agarose a 1%. O marcador molecular aplicado nos géis de agarose foi *λ*X174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen, UK) no sentido de identificar a banda correspondente.

4.RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ no gene *ccr5*

Para garantir que a produção de um novo *stock* viral é o mais semelhante possível aos *stocks* virais originais, é necessário propagar os vírus em estudo, numa população linfocitária que não seleccione sub-populações virais. Para tal procedeu-se à detecção, por PCR, da mutação $\Delta 32$ no gene *ccr5*, com a finalidade de confirmar a inexistência desta mutação nas CMSP utilizadas, que pudesse ser directamente responsável pela selecção de uma sub-população viral não-CCR5.

De forma a garantir o genótipo *wild-type* no gene *ccr5*, amplificou-se o DNA genómico das CMSP de dadores saudáveis pela reacção de PCR, conforme descrito anteriormente (6).

A análise das amostras em estudo, depois de amplificadas, foi realizada por separação electroforética num gel de agarose a 2%, tendo-se verificado que nenhum dos dadores usados era homozigótico ou heterozigótico para esta deleção, dando, portanto, origem a uma única banda com 735 pb (*wild-type ccr5/ccr5*) (Figura 4.1).

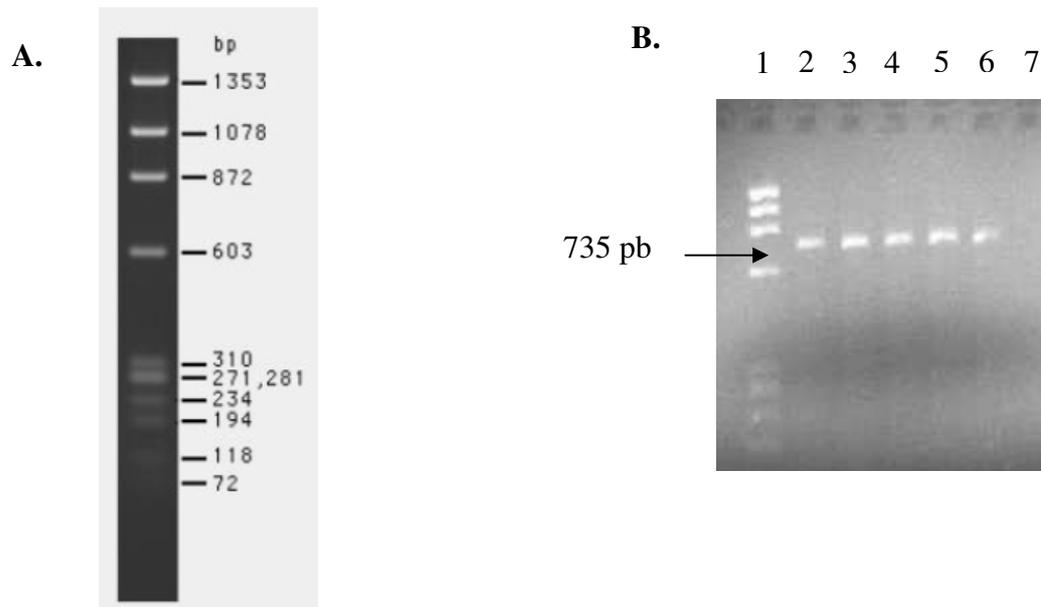


Figura 4.1: Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ gene *ccr5*; A - marcador de pesos moleculares (*FX174 RF DNA/Hae III Fragments*, Invitrogen); B- Observação dos produtos de PCR. Identificação das pistas: 1- marcador de peso molecular (*FX174 RF DNA/Hae III Fragments*, Invitrogen, UK); 2 a 5 – amostras de DNA genómico das CMSP; 6-controlo positivo; 7- controlo negativo.

4.2. Estudos de infecciosidade na linha celular GHOST

4.2.1. Dados clínicos e imunológicos dos indivíduos estudados

Através de um protocolo otimizado de co-cultura para HIV, efectuou-se a propagação do *stock* viral de 30 isolados HIV-1 e de 65 isolados HIV-2. Foi efectuada a caracterização destes 95 isolados, com base na análise da capacidade de utilização de co-receptores, usando linhas celulares GHOST que expressam o receptor CD4 e um dos co-receptores, CCR5, CXCR4 ou CCR8.

A monitorização das infecções foi determinada por análise dos resultados da quantificação de antígeno p24, nos sobrenadantes das culturas.

Na realização deste ensaio tentou-se estabelecer uma correlação entre o perfil de utilização dos co-receptores e os dados imunológicos e clínicos dos respectivos indivíduos infectados.

A maioria dos indivíduos infectados por HIV-2 incluídos neste trabalho era sintomática (72,3%; 47/65). A contagem de linfócitos T CD4+ variou entre 50 e 964 com uma média de 338 linfócitos T CD4+/ μ l de sangue periférico: 40,4% (19/47) dos indivíduos infectados, sintomáticos, tinham contagem de T CD4+ abaixo dos 200 e 31,9% (15/47) tinham carga viral, no plasma, acima das 500 cópias de RNA/ml. Relativamente aos indivíduos assintomáticos, 88,9% (16/18) tinham contagem de T CD4+ acima ou igual a 200 e 77,8% (14/18) tinham carga viral no plasma abaixo das 500 cópias de RNA/ml (Figura 4.2 e Figura 4.3).

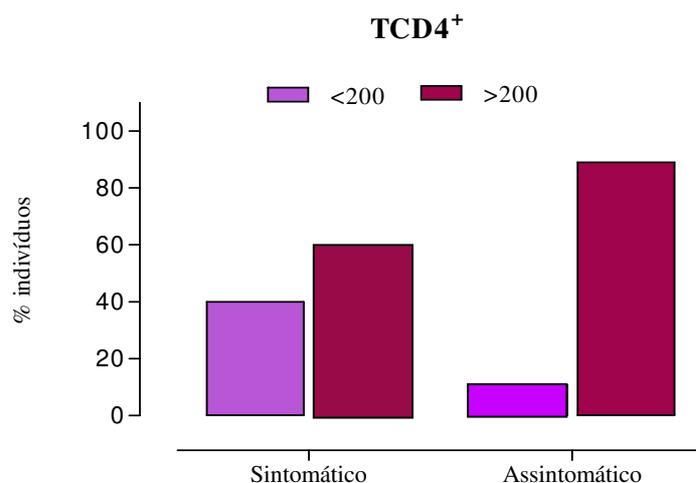


Figura 4.2: Percentagem de indivíduos infectados por HIV-2, sintomáticos e assintomáticos, com valores de contagem de células T CD4+ inferior ou superior a 200/ μ l.

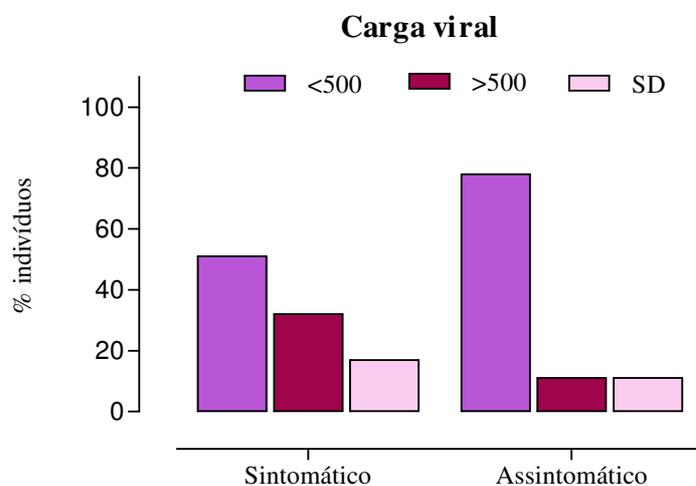


Figura 4.3: Percentagem de indivíduos infectados por HIV-2, sintomáticos e assintomáticos, com níveis de carga viral inferior ou superior a 500 cópias de RNA/ml.

No grupo infectado por HIV-1, 73,3% (22/30) dos indivíduos infectados eram sintomáticos; o intervalo de contagem de células T CD4+ encontra-se entre 106-1455 (média de 455). Nos indivíduos sintomáticos, a contagem de células T CD4+ abaixo de 200 é de 27,3% (6/22) e o número de cópias de RNA/ml de plasma acima ou igual a 500 foi verificado em 91% dos indivíduos (20/22) incluídos no estudo. No grupo de indivíduos assintomáticos, 100% (8/8) tinham contagem de T CD4+ acima de 200 e 62,5% (5/8) tinham carga viral no plasma abaixo das 500 cópias de RNA/ml (Figura 4.4 e Figura 4.5).

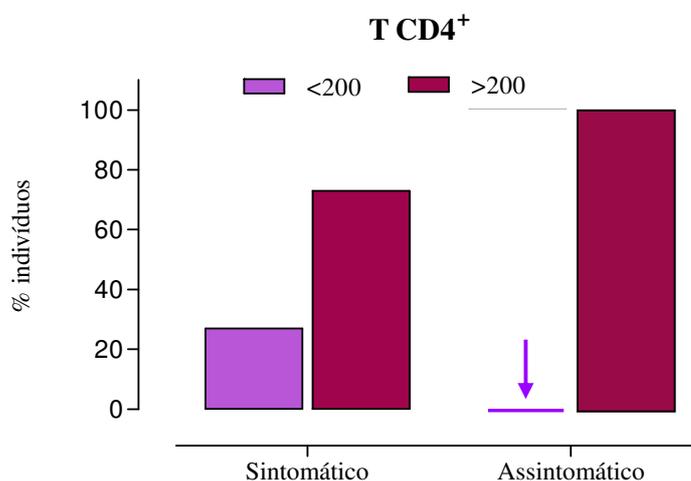


Figura 4.4: Percentagem de indivíduos infectados por HIV-1, sintomáticos e assintomáticos, com valores de contagem de células T CD4+ inferior ou superior a 200/ μ l.

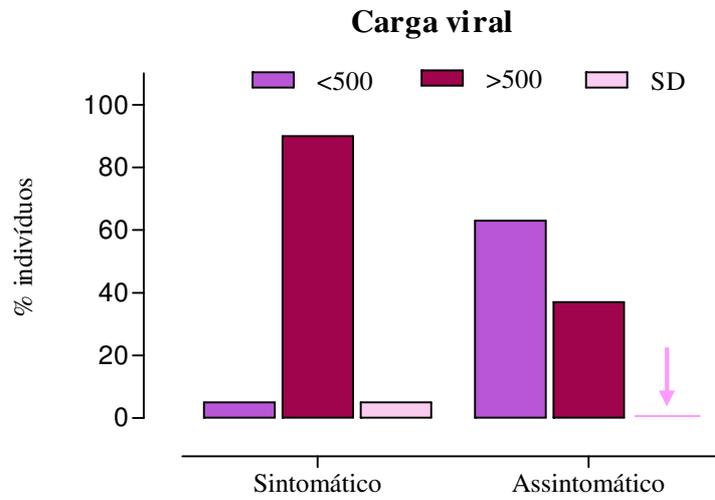


Figura 4.5: Percentagem de indivíduos infectados por HIV-1, sintomáticos e assintomáticos, com níveis de carga viral inferior ou superior a 500 cópias de RNA/ml.

4.2.2. Utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e CCR8 por isolados primários de HIV-2

Embora tenham sido descritos isolados primários de HIV-2 que utilizam uma vasta gama de co-receptores, a frequência com a qual estes co-receptores são utilizados não tem sido conclusivamente determinada, principalmente porque a maioria dos estudos desenvolvidos têm sido baseados em *cohorts* pequenos.

Neste estudo analisou-se um total de 65 isolados primários HIV-2 obtidos de indivíduos em diferentes estádios da doença, com diferentes contagens de células T CD4⁺ e níveis de carga viral. Pretendeu-se verificar a sua capacidade de infectar células GHOST-CD4 que expressam individualmente os co-receptores CCR5, CXCR4 e CCR8. A utilização destes co-receptores *in vitro* foi analisada pela capacidade de infectar produtivamente células GHOST que expressam os co-receptores, quantificando a produção viral pelo nível de Ag p24. O biotipo de cada isolado foi atribuído de acordo com perfil de utilização dos diferentes co-receptores.

Os resultados mostram que 62 dos 65 isolados HIV-2 são capazes de usar o CCR5 (95,4%) enquanto o CXCR4 mediou a infecção de 31 das 65 estirpes (47,7%). Além disso, 17 isolados de HIV-2 são capazes de utilizar o CCR8 como co-receptor (26,2%).

Devido ao grande número de isolados testados, e à heterogeneidade do grupo, analisou-se a correlação entre o uso de um determinado co-receptor, o estádio clínico do indivíduo infectado e a contagem de células T CD4⁺.

Pretendeu-se abordar duas questões centrais: se o uso do CCR5 é observado principalmente em indivíduos com contagem de células T CD4+ acima de 200 células/ml e carga viral baixa, e se a aquisição da capacidade de utilizar o CXCR4 pode estar relacionada com uma imunodeficiência mais grave (definida por contagens de células T CD4+ abaixo de 200 células/ml) e com níveis de virémia mais elevados (acima de 500 cópias de RNA/ml).

A análise estatística dos dados apresentados na Tabela 4.2 indica que o uso diferencial de CCR5, CXCR4 ou CCR8 por isolados de HIV-2 não é correlacionado ($P > 0,05$) com o estadio clínico ou com os dados imunológicos/virológicos dos indivíduos infectados. Os valores de P obtidos foram: $P = 0,522$ (contagem de linfócitos T CD4 *versus* utilização de CCR5), $P = 0,149$ (contagem de linfócitos T CD4 *versus* utilização de CXCR4), $P = 0,289$ (contagem de linfócitos T CD4 *versus* utilização de CCR8), $P = 0,912$ (carga viral *versus* utilização de CCR5), $P = 0,056$ (carga viral *versus* utilização de CXCR4) e $P = 0,057$ (carga viral *versus* utilização de CCR8).

A partir dos nossos resultados foi possível verificar que apenas três dos 65 isolados HIV-2 testados (4,6%) apresentam um fenótipo X4 (uso exclusivo do CXCR4), em contraste com 46,2% (30/65) das estirpes que usam apenas o co-receptor CCR5 (fenótipo R5) (Figura 4.6). Isto é especialmente notável, considerando que 47 das 65 (72,3%) estirpes de HIV-2 testadas foram obtidas de indivíduos sintomáticos (Tabela 3.3 e Tabela 4.1). Além disso, o fenótipo R5 foi observado independentemente da contagem de células T CD4+ e/ou carga viral plasmática.

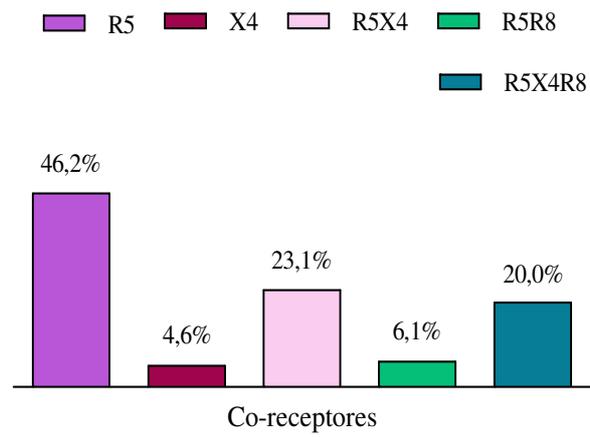


Figura 4.6: Percentagem de utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e/ou CCR8 por isolados de HIV-2.

Tabela 4.1: Caracterização dos isolados primários de HIV-2, utilizando células GHOST que expressam CD4 e CCR5, CXCR4 ou CCR8.

Isolado	Estadio clínico ^a	Contagem linfócitos T CD4+/ μ l	Carga Viral	Co-receptores ^b			Biotipo
				CCR5	CXCR4	CCR8	
ALI	Sintomático	491	SD	+++	-	-	R5
UCFL2001	Sintomático	230	<500	+++	-	-	R5
UCFL2003	Sintomático	145	2373	+	+++	+++	R5X4R8
UCFL2004	Sintomático	442	1418	+	+	-	R5X4
UCFL2005	Sintomático	365	<500	+	+	+	R5X4R8
UCFL2006	Assintomático	562	<500	+	+	+	R5X4R8
UCFL2007	Assintomático	331	<500	+	-	+	R5R8
UCFL2008	Sintomático	52	2285	+++	+++	+++	R5X4R8
UCFL2009	Sintomático	527	<500	+	+	-	R5X4
UCFL2010	Assintomático	456	<500	++	-	-	R5
UCFL2012	Sintomático	375	1268	+++	-	-	R5
UCFL2013	Sintomático	500	816	+	-	-	R5
UCFL2014	Sintomático	213	<500	++	-	-	R5
UCFL2015	Sintomático	220	<500	+	+	-	R5X4
UCFL2016	Sintomático	213	<500	+	-	-	R5
UCFL2017	Sintomático	50	23454	++	++	++	R5X4R8
UCFL2018	Sintomático	392	<500	+++	++	+++	R5X4R8
UCFL2019	Sintomático	258	1870	++	-	-	R5
UCFL2020	Sintomático	358	<500	+	+	-	R5X4
UCFL2022	Sintomático	578	<500	+	+	-	R5X4
UCFL2023	Sintomático	70	<500	++	-	-	R5
UCFL2024	Assintomático	683	<500	+	-	-	R5
UCFL2026	Assintomático	921	<500	+++	-	-	R5

UCFL2027	Assintomático	730	<500	++	-	-	R5
UCFL2028	Assintomático	760	<500	+++	-	-	R5
UCFL2029	Sintomático	230	3454	+	+	+	R5X4R8
UCFL2030	Sintomático	346	<500	++	-	-	R5
UCFL2031	Sintomático	92	<500	+++	-	-	R5
UCFL2032	Sintomático	106	1072	-	+	-	X4
UCFL2033	Sintomático	139	>100000	++	-	-	R5
UCFL2034	Assintomático	432	9470	++	-	-	R5
UCFL2035	Sintomático	292	6431	+++	++	-	R5X4
UCFL2036	Sintomático	195	<500	+++	-	-	R5
UCFL2037	Sintomático	419	<500	+++	-	+	R5R8
UCFL2038	Sintomático	318	<500	+++	-	-	R5
UCFL2039	Sintomático	384	<500	+	+	-	R5X4
UCFL2040	Sintomático	91	<500	+	-	-	R5
UCFL2041	Sintomático	184	<500	++	-	-	R5
UCFL2042	Assintomático	413	<500	+	+	-	R5X4
UCFL2043	Sintomático	324	<500	+	-	+	R5R8
UCFL2045	Assintomático	267	1947	+++	-	-	R5
UCFL2046	Assintomático	130	<500	+++	-	-	R5
UCFL2048	Sintomático	59	1698	+	-	++	R5R8
UCFL2049	Sintomático	84	<500	-	+	-	X4
UCFL2050	Assintomático	697	<500	+++	-	-	R5
UCFL2051	Assintomático	605	<500	+++	++	+++	R5X4R8
UCFL2053	Sintomático	259	<500	+++	-	-	R5
UCFL2054	Assintomático	801	<500	+	+	-	R5X4
UCFL2055	Sintomático	127	13883	+	+	+	R5X4R8

UCFL2056	Sintomático	230	831	+	+	+	R5X4R8
UCFL2057	Sintomático	219	<500	+++	-	-	R5
UCFL2058	Sintomático	224	<500	++	-	-	R5
UCFL2059	Assintomático	197	<500	+++	+++	-	R5X4
UCFL2060	Assintomático	896	SD	+++	+++	-	R5X4
UCFL2061	Assintomático	964	SD	+++	+	-	R5X4
UCFL2062	Assintomático	554	<500	+	-	-	R5
UCFL2063	Sintomático	304	<500	+	-	-	R5
UCFL2064	Sintomático	144	>100000	+	++	-	R5X4
UCFL2065	Sintomático	263	SD	+	+	+	R5X4R8
UCFL2066	Sintomático	126	SD	+	+	-	R5X4
UCFL2067	Sintomático	186	SD	+++	+	+++	R5X4R8
UCFL2068	Sintomático	96	SD	-	+	-	X4
UCFL2069	Sintomático	485	SD	+	-	-	R5
UCFL2070	Sintomático	108	SD	+++	++	-	R5X4
UCFL2071	Sintomático	74	SD	+	+	+	R5X4R8

^a Estadio clínico de acordo com a classificação do CDC (CDC, 1992); Assintomático = estadio clínico A; Sintomático = estágio clínico B ou C.

^b A replicação viral foi detectada pela presença de Ag p24 no sobrenadante das culturas.

Vírus com valores de antígeno: (-) O.D. <0,300; (+) 0,290 < O.D.<1,500; (++) 1,500 < O.D.< 2,500; (+++) O.D. > 2,500.

4.2.3. Utilização dos co-receptores por isolados primários de HIV-2 obtidos de amostras sequenciais

Um dos objectivos deste trabalho foi o estudo da dinâmica evolutiva da utilização dos co-receptores durante a progressão da doença. Assim, para averiguar se as variantes X4 surgem como consequência da diminuição da capacidade da resposta imunológica e, por isso, predominarem nas fases sintomáticas de infecção, analisou-se a evolução do uso do co-receptor de vários indivíduos infectados a partir dos quais conseguimos obter amostras de sangue sequenciais.

Foi estudado um total de 20 vírus sequenciais isolados de nove indivíduos diferentes, incluindo quatro que eram assintomáticos no início do seguimento. O tempo decorrido entre as amostras consecutivas variou de 30 a 246 semanas (média: 76 semanas).

Os resultados (Tabela 4.2) revelam que apenas um indivíduo evoluiu do estadio clínico assintomático ao estadio clínico sintomático (indivíduo #5). A diminuição da contagem das células T CD4+ foi observada em seis dos nove indivíduos. Todos os isolados iniciais obtidos a partir das primeiras amostras eram R5 excepto as dos indivíduos #2 (R5X4R8), #6 (R5R8) e #8 (R5R8). Curiosamente, os isolados #2 e #6 perderam a capacidade de utilizar os co-receptores CXCR4 e/ou CCR8 nas amostras obtidas após 90 e 73 semanas, respectivamente. Já o isolado viral do indivíduo #8 perdeu a capacidade de utilizar o co-receptor CCR5 e CCR8 na amostra obtida 32 semanas após a primeira colheita.

Embora o número de amostras tenha sido pequeno para ser feita uma análise consistente, podemos ainda assim, concluir que, neste grupo, não há correlação entre a diminuição da contagem de células T CD4+ e a aquisição de utilização de CXCR4 ou CCR8 ($P > 0,05$).

Apesar desta discordância entre biotipo viral e estado imunológico, é de salientar a dinâmica evolutiva do biotipo viral, observada nos isolados obtidos do indivíduo #5 (UCFL2034, UCFL2035 e UCFL2036). Este paciente foi o único que apresentou uma evolução clínica durante o período de acompanhamento, de estadió clínico assintomático para sintomático e virologicamente mudou de R5 (UCFL2034) para R5X4 (UCFL2035) voltando novamente a R5 (UCFL2036). Esta evolução de coreceptor foi concomitante com uma diminuição em ambos os casos da carga viral e da contagem das células T CD4+. Curiosamente, após o isolamento de UCFL2035, o indivíduo iniciou a terapia anti-retroviral com inibidores de protease e dois análogos de nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa.

Também foi notável a evolução do biótipo viral observado nos indivíduos #2, #6 e #8. Em todos eles, as variantes CCR8 parecem ter sido suprimidas da população viral predominante no sangue periférico. Embora qualquer hipótese sobre as razões subjacentes a esta evolução precise de ser mais testada, esta observação pode sugerir que estas variantes podem ter desvantagens intrínsecas, talvez uma menor capacidade replicativa ou uma susceptibilidade aumentada à resposta imunológica.

Tabela 4.2: Dados das amostras sequenciais de isolados de HIV-2 obtidas de indivíduos seguidos ao longo do tempo.

Indivíduos	Vírus	Período de tempo entre amostras (semanas) ^a	Estadio clínico ^b	Contagem linfócitos T CD4/ μ l	Cópias de RNA viral/ml	Co-receptores ^c		
						CCR5	CXCR4	CCR8
Indivíduo #1	UCFL2013		S	500	816	+	-	-
	UCFL2014	52	S	213	<500	++	-	-
	UCFL2015	41	S	220	<500	+	+	-
Indivíduo #2	UCFL2018		S	392	<500	+++	++	+++
	UCFL2019	90	S	258	1870	++	-	-
Indivíduo #3	UCFL2027		A	730	<500	++	-	-
	UCFL2028	61	A	760	<500	+++	-	-
Indivíduo #4	UCFL2030		S	346	<500	++	-	-
	UCFL2031	246	S	92	<500	++	-	-
Indivíduo #5	UCFL2034		A	432	9470	++	-	-
	UCFL2035	57	S	292	6431	+++	++	-
	UCFL2036	30	S	195	<500	+++	-	-
Indivíduo #6	UCFL2037		S	419	<500	+++	-	+
	UCFL2038	73	S	318	<500	+++	-	-
Indivíduo #7	UCFL2045		A	267	1947	+++	-	-
	UCFL2046	79	A	130	<500	+++	-	-
Indivíduo #8	UCFL2048		S	59	1698	+	-	++
	UCFL2049	32	S	84	<500	-	+	-
Indivíduo #9	UCFL2050		A	697	<500	+++	-	-
	UCFL2051	78	A	605	<500	+++	++	+++

^a Período de tempo decorrido entre as colheita do mesmo indivíduo. ^b Estadio clínico de acordo com a classificação do CDC (CDC, 1992); Assintomático = estadio clínico A; Sintomático = estágio clínico B ou C. ^c A replicação viral foi detectada pela presença de Ag p24 no sobrenadante das culturas.

4.2.4. Utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e CCR8 por isolados primários de HIV-1

Na infecção por HIV-1, o aparecimento de variantes capazes de usar outros co-receptores para além do CCR5 e CXCR4, tem sido referida ocasionalmente, e com muito menos frequência do que no HIV-2 (23, 33, 105).

Com o objectivo de averiguar qual o perfil de utilização dos co-receptores por parte dos HIV-1 e, assim, permitir uma comparação com o *cohort* de vírus HIV-2, estudou-se a contribuição do CCR5, CXCR4 e CCR8, como co-receptores para diversos isolados HIV-1. O principal interesse foi o de determinar a frequência com que o CCR8 era usado como co-receptor viral.

Com este objectivo foram analisadas 30 isolados primários do HIV-1 de indivíduos em diferentes estadios clínicos e com contagens de células T CD4+ e níveis de carga viral distintos (Tabelas 3.3 e 4.3).

Os resultados, resumidos na Tabela 4.3 e analisados segundo os mesmos critérios mencionados para a Tabela 4.1, revelam que, como no grupo HIV-2, o CCR5 e o CXCR4 são os principais co-receptores usados pelo HIV-1: 93,4% e 83,3% dos isolados foram capazes de infectar produtivamente células que expressam o CCR5 e CXCR4, respectivamente (Figura 4.7).

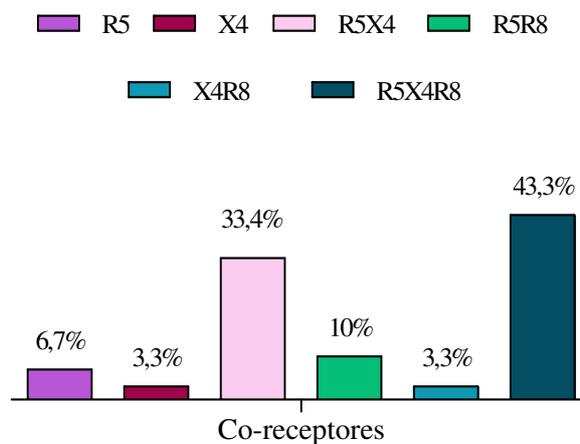


Figura 4.7: Percentagem de utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 e/ou CCR8 por isolados de HIV-1.

No entanto, inesperadamente, mas com significância estatística, verificou-se que o CCR8 era usado como co-receptor por 17 dos 30 isolados testados (56,6%) (Figura 4.6), mais frequentemente do que no grupo HIV-2 (26,1%, $P < 0,001$) (Figura 4.5).

Como já foi observado nos isolados de HIV-2, o uso deste co-receptor alternativo foi observado independentemente do estadió clínico, carga viral ou contagem de células T CD4+.

Em relação ao uso do CXCR4 pelo HIV-1 e HIV-2, é de salientar que a capacidade de infectar células que expressam CXCR4 foi mais frequente em isolados de HIV-1 (83,3%) (Figura 4.6) do que em isolados HIV-2 (47,7%, $P < 0,001$) (Figura 4.5).

Tabela 4.3: Caracterização dos isolados primários de HIV-1, utilizando células GHOST que expressam CD4 e CCR5, CXCR4 ou CCR8.

Isolado	Estadio clínico ^a	Contagem linfócitos T CD4+/ µl	Carga viral	Co-receptores ^b			Biótipo
				CCR5	CXCR4	CCR8	
UCFL1001	Sintomático	561	10513	-	+	-	X4
UCFL1002	Sintomático	348	19568	+++	+++	++	R5X4R8
UCFL1003	Sintomático	249	112010	+++	++	-	R5X4
UCFL1005	Assintomático	1003	<500	+	+	-	R5X4
UCFL1004	Assintomático	1125	<500	+++	++	-	R5X4
UCFL1006	Sintomático	227	280738	++	+++	+	R5X4R8
UCFL1007	Sintomático	106	75639	+++	++	++	R5X4R8
UCFL1008	Sintomático	238	172720	+++	-	++	R5R8
UCFL1009	Sintomático	409	2742788	+	++	+	R5X4R8
UCFL1010	Sintomático	274	SD	+++	++	-	R5X4
UCFL1011	Sintomático	1428	1595	++	+++	+	R5X4R8
UCFL1013	Assintomático	446	1876150	++	-	++	R5R8
UCFL1014	Sintomático	305	67508	++	+	-	R5X4
UCFL1015	Sintomático	259	120345	+++	+++	+++	R5X4R8
UCFL1016	Assintomático	453	6521	+++	+++	+++	R5X4R8
UCFL1017	Assintomático	563	281934	++	-	-	R5
UCFL1018	Sintomático	451	192969	+	+	+	R5X4R8
UCFL1019	Sintomático	125	5765	-	+	+	X4R8
UCFL1020	Sintomático	118	164230	++	+	++	R5X4R8
UCFL1021	Assintomático	1076	<500	++	++	++	R5X4R8
UCFL1022	Sintomático	394	246641	+++	++	++	R5X4R8
UCFL1023	Assintomático	349	<500	+	+	-	R5X4
UCFL1024	Sintomático	187	387659	++	+	++	R5X4R8

UCFL1025	Assintomático	578	<500	++	-	-	R5
UCFL1026	Sintomático	278	178364	+++	+	-	R5X4
UCFL1027	Sintomático	451	70557	+++	+++	+++	R5X4R8
UCFL1028	Sintomático	218	237482	+++	+	-	R5X4
UCFL1029	Sintomático	1455	<500	+++	+	-	R5X4
UCFL1030	Sintomático	183	56457	+++	-	+	R5R8
UCFL1031	Sintomático	123	387237	++	++	-	R5X4

^a Estadio clínico de acordo com a classificação do CDC (CDC, 1992); Assintomático = estadio clínico A; Sintomático = estágio clínico B ou C.

^b A replicação viral foi detectada pela presença de Ag p24 no sobrenadante das culturas.

Vírus com valores de antígeno: (-) O.D. <0,300; (+) 0,290 < O.D.<1,500; (++) 1,500 < O.D.< 2,500; (+++) O.D. > 2,500.

4.3. Estudos de infecciosidade em macrófagos derivados de monócitos (MDM)

4.3.1. Dados clínicos e imunológicos dos indivíduos estudados

Após ter sido determinado o biotipo dos diversos HIV-1 e HIV-2 em estudo, seleccionou-se um grupo de cinco isolados primários de HIV-1 e cinco isolados primários de HIV-2 para determinar o tropismo destes para MDM. Foi ainda incluindo o HIV-1 Ba-L como controlo de infecção, por ser um vírus com tropismo para monócitos/macrófagos (vírus monocitotrópicos – TM). Os isolados escolhidos tiveram como critério de selecção o diferente perfil de utilização de co-receptores (Tabela 4.4 e 4.5).

Tabela 4.4 – Caracterização clínica, imunológica e virológica dos indivíduos infectados por HIV-1, seleccionados para analisar a capacidade de infecção dos MDM e CMSP.

Isolado	Estadio Clínico	Contagem linfócitos T CD4+	Carga viral	Biotipo
UCFL1006	Sintomático	227	280738	R5X4R8
UCFL1018	Sintomático	451	192969	R5X4R8
UCFL1026	Sintomático	278	178364	R5X4
UCFL1027	Sintomático	451	70557	R5X4R8
UCFL1029	Sintomático	1455	<500	R5X4
Ba-L	Sintomático	-	-	R5

Tabela 4.5 – Caracterização clínica, imunológica e virológica dos indivíduos infectados por HIV-2, seleccionados para analisar a capacidade de infecção dos MDM e CMSP.

Isolado	Estadio Clínico	Contagem linfócitos T CD4+	Carga viral	Biotipo
UCFL2004	Sintomático	442	1418	R5X4
UCFL2007	Assintomático	331	<500	R5R8
UCFL2037	Sintomático	419	<500	R5R8
UCFL2043	Sintomático	324	<500	R5R8
UCFL2050	Assintomático	697	<500	R5

A monitorização das infecções foi determinada por quantificação da actividade da RT nos sobrenadantes de cultura das infecções em MDM e CMSP.

4.3.2. Tropismo do HIV-1 para MDM

Para caracterizar o tropismo dos MDM por HIV-1 utilizaram-se sobrenadantes virais para infectar MDM e CMSP, tendo a infecção nestas últimas células sido utilizada como controlo da infecção.

Na infecção de CMSP por HIV-1, os resultados obtidos foram diferentes para os vários isolados: o UCFL1026 e o UCFL1029 demonstraram actividade da RT a partir do dia seis (435 pg/ml e 115 pg/ml de actividade da RT, respectivamente), que se manteve até ao dia

nove (414 pg/ml e 121 pg/ml de actividade da RT, respectivamente), tendo diminuído nos dias posteriores. Como se pode verificar o UCFL1029 foi menos eficiente na infecção de CMSP em comparação com o UCFL1026.

Relativamente aos isolados UCFL1006, UCFL1018 e UCFL1027 não se detectou actividade da RT durante os 18 dias de infecção, ou seja não houve infecção produtiva por parte destes vírus.

A infecção com HIV-1 Ba-L foi a mais produtiva, com aumento de actividade da RT até ao dia 6 (1227 pg/ml de actividade de RT), tendo diminuído nos dias posteriores.

Em relação às infecções em MDM por HIV-1, constatamos que não houve produção viral durante os 18 dias de cultura. Isto sucedeu igualmente para o isolado Ba-L apesar de este ser um vírus monocitotrópico.

É de salientar que após cada ponto de amostragem lavaram-se as células de modo que apenas os vírus recém produzidos fossem quantificados em cada amostragem.

4.3.3. Tropismo do HIV-2 para MDM

No grupo dos HIV-2 os resultados da infecção em CMSP foram semelhantes aos observados para o HIV-1. Os isolados UCFL2004, UCFL2037 e UCFL2007 demonstraram actividade de RT a partir do dia seis (474 pg/ml, 191 pg/ml e 302 pg/ml de actividade da RT, respectivamente), que se manteve até ao dia nove (370 pg/ml, 229 pg/ml e 446 pg/ml da actividade de RT, respectivamente), tendo diminuído nos dias posteriores.

Em relação ao isolado UCFL2050 foi possível quantificar a actividade da RT ao dia seis, no entanto esta infecção foi muito menos eficiente em comparação com os isolados anteriores (18 pg/ml de actividade da RT) tendo aumentado ligeiramente entre o dia seis e nove para 43 pg/ml de actividade da RT. Nos dias posteriores deixou de se detectar produção de vírus nas CMSP.

Excepcionalmente, só foi possível detectar a presença de vírus no sobrenadante das CMSP infectadas com o isolado UCFL2043 a partir do dia nove, com 138 pg/ml de actividade da RT, havendo um decréscimo nos dias seguintes.

Os ensaios para determinar o tropismo dos isolados de HIV-2 para MDM tiveram resultados iguais aos do HIV-1. Não foi detectada produção viral durante os 18 dias de cultura.

Tal como para os ensaios de infecciosidade com HIV-1, após cada ponto de amostragem lavaram-se as células de modo que apenas os vírus recém produzidos fossem quantificados em cada amostragem.

4.3.4. Amplificação da região genómica LTR

Em 2004, Stremlau e colaboradores (178), identificaram uma proteína, a TRIM 5 α que actua como factor de restrição da replicação do HIV-1, resultando numa infecção abortiva antes da conclusão da transcrição reversa. Vários autores têm também reportado restrições pré- e pós-transcrição reversa de alguns HIV-1 R5 em monócitos/macrófagos (155).

Procurou-se, então, determinar se a entrada e os eventos de replicação precoce, tais como a transcrição reversa e a integração do DNA proviral, ocorrem de forma eficiente nos MDM. Para tal, amplificou-se por *Nested-PCR* a região genómica LTR usando primers específicos, com o objectivo de detectar se houve integração do DNA do vírus no genoma da célula.

O PCR *Alu*-LTR compreendeu um primeiro PCR no qual se amplificou a sequência de DNA entre o LTR do HIV-1 e HIV-2 e o elemento cromossomal *Alu*. Os elementos *Alu* têm cerca de 300 pb e estão intercalados ao longo do genoma humano, estimando-se que cerca de 10,7% do genoma humano consiste em sequências *Alu*. O segundo PCR consistiu na amplificação da região LTR de maneira a aumentar a especificidade de detecção. Desta forma, não só se detecta a presença da região LTR, como é assegurada que essa região (e portanto o resto do genoma proviral) se encontra integrada no DNA celular.

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados sob luz ultravioleta, após integração de brometo de etídio directamente no gel de agarose a 1%. O marcador molecular aplicado nos géis de agarose foi *ΦX174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen, UK)* no sentido de identificar a banda correspondente ao fragmento amplificado pretendido. O tamanho do fragmento amplificado para o HIV-1 é de 391 pb e para o HIV-2 é de 309 pb.

4.3.4.1. Amplificação do LTR do HIV-1 em CMSP e MDM

Como se pode verificar na Figura 4.8, referente às amostras dos ensaios de infecciosidade em CMSP, todos os vírus de HIV-1 integraram o genoma proviral no DNA da célula hospedeira com sucesso, tal como era esperado, uma vez que em todos eles foi possível detectar a presença de partículas virais no sobrenadante das culturas infectadas.

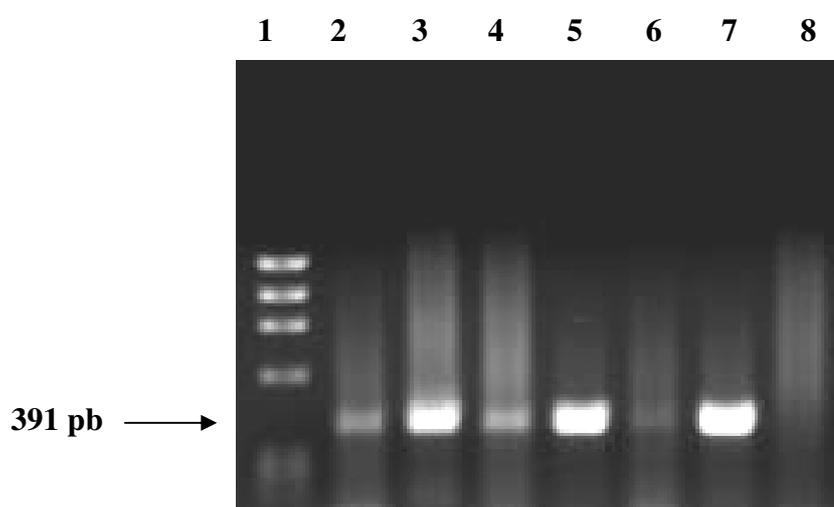


Figura 4.8 – Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de CMSP infectadas por isolados de HIV-1. 1- Marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL1006, 3- UCFL1018, 4- UCFL1026, 5- UCFL1027, 6-UCFL1029, 7- Ba-L (controlo positivo), 8- controlo negativo.

Foi, igualmente, possível constatar que, nos macrófagos infectados com HIV-1, também houve integração do DNA proviral no genoma celular. Somente o isolado primário

UCFL1018 não integrou o genoma dos macrófagos, apesar de ser proveniente de um indivíduo com 451 linfócitos T CD4+/ μ l e com biotipo R5X4R8 (Figura 4.9).

Relativamente ao isolado UCFL1027, com biotipo R5X4R8, apesar de ter havido amplificação, a banda referente ao fragmento amplificado é muito ténue.

É ainda de salientar que a banda relativa à amplificação da amostra correspondente ao isolado Ba-L é a mais intensa, o que pode sugerir que terá havido um maior número de MDM a serem infectados por este vírus, em concordância com o seu fenótipo monocitotrópico. O mesmo se pode verificar para o isolado UCFL1026, com biotipo R5X4 e uma contagem de 278 células T CD4+/ μ l.

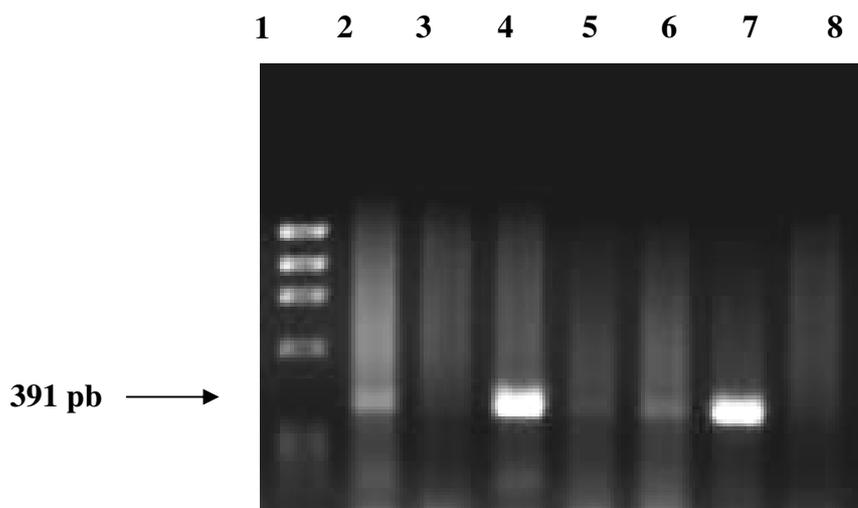


Figura 4.9 – Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 391 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de MDM infectados por isolados de HIV-1. 1- Marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL1006, 3- UCFL1018, 4- UCFL1026, 5- UCFL1027, 6-UCFL1029, 7- Ba-L (controlo positivo), 8- controlo negativo.

4.3.4.2. Amplificação do LTR do HIV-2 em CMSP e MDM

Tal como se demonstrou para o HIV-1, também todos os isolados de HIV-2 conseguiram, pelo menos, integrar o DNA viral no genoma das CMSP, apesar de não se ter detectado a presença de partículas virais no sobrenadante das culturas infectadas. Na Figura 4.10 é possível visualizar as bandas correspondentes à amplificação da região genómica LRT para todos os isolados primários de HIV-2

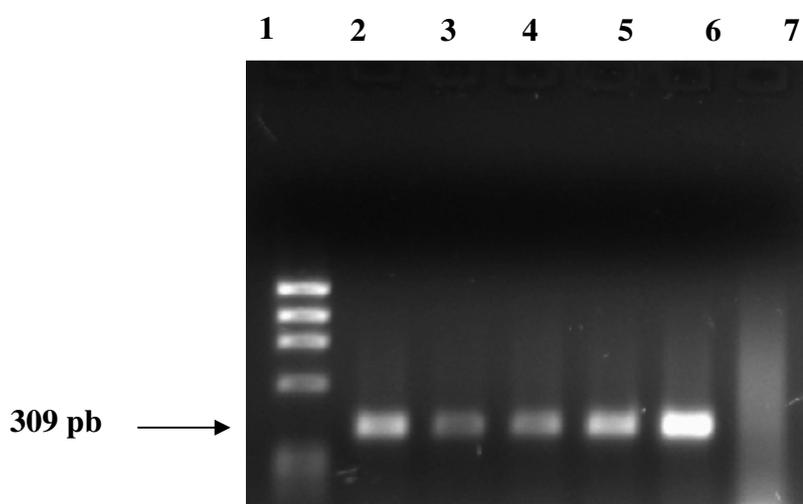


Figura 4.10 – Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 309 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de CMSP infectadas por isolados de HIV-2. 1- Marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL2004, 3- UCFL2007, 4- UCFL2037, 5- UCFL2043, 6-UCFL2050, 7- Controlo negativo.

O fragmento de 309 pb, compreendido entre o início e o fim da região U3 do LTR, foi amplificado com sucesso em todas as amostras de HIV-2, como se pode observar na Figura 4.11.

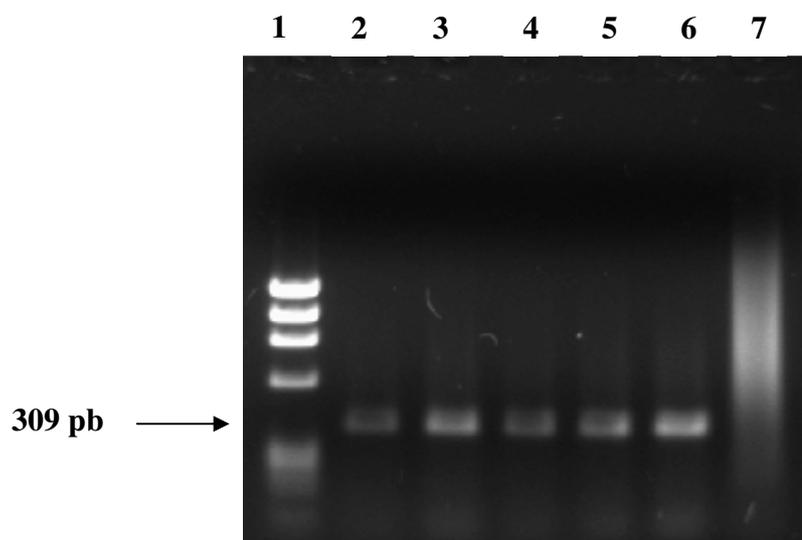


Figura 4.11 – Fotografia do gel de agarose a 1% resultante da amplificação dos produtos de PCR, do fragmento com 309 pb da região LTR, das amostras de DNA proviral extraído de MDM infectados por isolados de HIV-2. 1- Marcador de peso molecular (fX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen), 2- UCFL2004, 3- UCFL2007, 4- UCFL2037, 5- UCFL2043, 6-UCFL2050, 7- Controlo negativo.

Os resultados obtidos indicam-nos que apesar de não se ter detectado a presença de partículas virais no sobrenadante das culturas infectadas tanto em CMSP como em MDM, infectados por HIV-1 e HIV-2, existe pelo menos a integração do DNA proviral no genoma das células hospedeiras.

5.DISSCUSSÃO E CONCLUSÕES

5. Discussão e Conclusões

A infecção por HIV, *in vitro*, pode ser mediada por uma vasta gama de diferentes receptores de quimiocinas pertencentes ao grupo dos receptores de sinalização intracelular acoplados a proteínas G (GTP-binding), com sete domínios transmembranares ligados por três ansas intracitoplasmáticas e três ansas extracitoplasmáticas.

Actualmente, conhecem-se 23 receptores de quimiocinas, ou moléculas estruturalmente relacionadas, que funcionam como receptores para a entrada do HIV-1, HIV-2 e SIV *in vitro*. No entanto, apesar da utilização relativamente promíscua desses co-receptores *in vitro* por algumas estirpes de HIV-1 e, principalmente, de HIV-2 (19, 20, 89, 116, 120), a maioria dos estudos sobre a utilização dos co-receptores por isolados de HIV têm sido focados nos dois principais receptores de quimiocinas: o CCR5 e o CXCR4. Assim existem poucos dados disponíveis sobre o uso CCR8 (ou outros co-receptores) por isolados primários de HIV-1 e HIV-2.

O papel dos co-receptores alternativos, além do CCR5 e CXCR4, na infecção por HIV-1 é considerado como sendo de importância reduzida *in vitro* e provavelmente *in vivo* (204). Devido a isso, somente o CCR5 e o CXCR4 têm sido considerados como alvos potenciais de intervenção terapêutica.

No entanto, têm sido relatadas algumas excepções (38, 32, 53, 57, 137, 162, 199, 201), revelando que determinados isolados podem explorar co-receptores alternativos *in vitro*, permanecendo no entanto por esclarecer se esses co-receptores são utilizados por HIV-1 *in vivo* (205).

O mesmo acontece para as infecções por HIV-2, onde uma utilização mais promíscua dos receptores de quimiocinas como co-receptores tem sido amplamente referida *in vitro* (20, 89, 116). Para além disso, a existência de isolados primários com perfil atípico de uso de co-receptor (7, 170, 206), sugere que, no HIV-2, a capacidade de utilizar outros co-receptores para além do CCR5 e CXCR4 deve ser ainda mais comum.

Neste trabalho, analisámos o papel do receptor de quimiocina CCR8 como co-receptor para isolados primários de HIV-1 e HIV-2. O CCR8, anteriormente conhecido como TER1, ChemR1 e CKR-L1, é o receptor para a quimiocina CCL1/I-309 (149, 186). Para além disso, três moléculas de origem viral interagem, igualmente, com o CCR8: vMIP-I e vMIP-II (codificados pelo HHV-8) e o vMCC-I codificado pelo poxvírus *Molluscum contagiosum* (46). A lógica subjacente à inclusão do co-receptor alternativo CCR8, como mediador da infecção pelo HIV-2 e HIV-1, deriva da sua distribuição celular e tecidual deste receptor de quimiocinas *in vivo*, que inclui alguns dos principais alvos celulares da infecção por HIV. A expressão do CCR8 foi detectada nomeadamente em monócitos, tímócitos e linfócitos T no sangue periférico, onde é particularmente evidente a sua expressão na sub-população de linfócitos T-helper do tipo 2 (Th2) (46, 47, 186, 208); este receptor de quimiocinas pode também ser detectado nas células da microglia do SNC (89).

A utilização do CCR8 por determinadas estirpes de HIV foi anteriormente descrita por diversos autores (86, 109, 151, 162, 165, 199). A maioria destes grupos utilizaram variantes virais adaptadas a linhas celulares linfocitárias e o número total de estirpes testadas variou entre sete (202) e 22 (151). Nestes estudos, a percentagem de vírus com capacidade de usar o CCR8 foi bastante heterogénea, variando entre 12,5% (86) e 81,8% (199). Curiosamente,

segundo Willey e colaboradores (199), todas as estirpes de HIV-1 testadas (incluindo isolados primários) provaram ser capazes de infectar a linha celular NP2/CD4 expressando CCR8; algumas destas estirpes infectaram tão eficientemente as células que expressam o CCR8 como as que expressam o CCR5 ou CXCR4. Além disso, a utilização do CCR8 em células primárias foi demonstrado por dois isolados de HIV-1 (33), sugerindo que se pode de facto considerar o CCR8 como um potencial co-receptor para determinadas estirpes de HIV-1 e HIV-2.

Os nossos resultados demonstram que o CCR8 foi efectivamente usado por dezassete dos 65 isolados HIV-2 testados (26,2%). O uso de co-receptores alternativos nomeadamente do CCR8, na infecção por HIV-2, seria um resultado previsível, devido à largamente descrita utilização promíscua dos receptores de quimiocina que, em geral, caracteriza as estirpes de HIV-2 (20, 89, 116). Mais surpreendente, no entanto, foi a frequência com que o CCR8 foi usado pelos isolados de HIV-1: 56,7% das estirpes testadas (17/30) foram capazes de infectar células que expressam o CCR8. Estes dados têm dois tipos de implicações: por um lado levantam a questão de saber se as moléculas alternativas, tais como o CCR8, podem, *in vivo*, contribuir para a infecção por HIV das células-alvo, pelo menos sob determinadas circunstâncias. Por outro lado, a elevada frequência com que, no HIV-1, são encontradas variantes utilizadoras do CCR8, é particularmente importante no momento em que estão a ser usados antagonistas do CCR5 na prática clínica e os ensaios fenotípicos apenas detectam variantes CCR5 *versus* CXCR4. Se uma população viral, ainda que minoritária, capaz de utilizar o CCR8 (ou outros co-receptores), estiver presente num indivíduo infectado, essa população não será detectada, o que irá trazer potenciais implicações para o sucesso terapêutico e, possivelmente, também para a patogénese.

No entanto, é importante realçar que a capacidade dos isolados primários de HIV para explorar co-receptores em linhas celulares laboratorialmente manipuladas, como a linha celular GHOST-CD4+, não fornece uma indicação exacta dos co-receptores utilizados *in vivo*. Os níveis de expressão dos co-receptores nas células primárias são, em geral, inferiores aos observados em linhas de células geneticamente modificadas que expressam o receptor primário CD4 e um receptor de quimiocina. Logo, a inferência da utilização dos co-receptores *in vivo*, com base em ensaios *in vitro*, utilizando estas células, deve ser assumida com precaução. Apesar disso, os resultados apresentados neste trabalho, conjuntamente com os dados descritos anteriormente, indicando que o CCR8 pode funcionar eficientemente como co-receptor para diversos isolados HIV-1 e HIV-2, quer em linhas celulares indicadoras quer em células primárias (33, 85, 89, 105, 151, 162), permitem sugerir a potencial importância deste co-receptor para a patogénese viral.

Outro dado interessante é a evolução do biotipo viral observado em amostras sequenciais de HIV. Em três indivíduos foi observada a supressão da população viral utilizadora do CCR8, o que sugere que estas variantes podem ter desvantagens intrínsecas, talvez uma menor capacidade replicativa ou uma susceptibilidade aumentada à resposta imunológica.

É amplamente reconhecido que, durante as fases mais tardias da infecção por HIV-1, uma proporção significativa de variantes virais que constituem as *quasispecies* presentes no indivíduo infectado, evolui no sentido de usar eficientemente o CXCR4 (e provavelmente outros receptores de quimiocinas), além/em vez das, variantes que utilizam o CCR5, as quais predominam durante a primeira fase da infecção (42). O aparecimento de variantes X4, ocorre em cerca de 50% dos indivíduos infectados e está associada a uma mais rápida progressão da doença e ao aumento da depleção dos linfócitos T CD4+ (42). Estas elevadas taxas de progressão da doença e depleção das células T CD4 + tem sido relacionada com diversos factores virais, nomeadamente com o aumento da capacidade de replicação, e com o facto do fenótipo viral X4 ser mais citopático para os linfócitos primários CD4+ (66, 83).

Os nossos resultados revelam que a utilização do CXCR4, isoladamente ou em conjunto com o CCR5 e/ou CCR8 (biotipo R5X4 ou R5X4R8, respectivamente), foi mais frequentemente detectada no grupo de isolados de HIV-1 do que em isolados de HIV-2 (83,3% e 47,7%, respectivamente). Directamente relacionada com estes dados é a conclusão de que a não utilização de CXCR4 e CCR8 (biotipo R5) é significativamente mais comum nos isolados HIV-2 do que nos isolados HIV-1 (46,2% e 6,7%, respectivamente).

O isolamento e propagação *in vitro* de isolados de HIV pode reflectir, quer a diversidade de *quasispecies* virais ou, pelo contrário, resultar na selecção de apenas um conjunto de variantes do HIV presentes nas CMSP dos indivíduos infectados (aqueles com o fenótipo que melhor se adapte às condições de cultura *in vitro*). Os dados obtidos sugerem que a aquisição de uso do CXCR4 parece ser mais comum nas *quasispecies* do HIV-1 e a preservação do biotipo R5 pode ser mais frequentemente observado em populações virais HIV-2. Ambas as hipóteses

podem estar relacionadas com uma progressão mais lenta para a doença, geralmente observada nos indivíduos infectados com HIV-2 em comparação com indivíduos infectados por HIV-1. Apesar de tentadora, esta inferência deve ter também em conta a existência de diferenças intrínsecas entre os indivíduos que constituem os *cohort* de HIV-1 e HIV-2, mesmo considerando que ambos os *cohort* mostram uma percentagem semelhante de indivíduos sintomáticos, bem como um número proporcional de indivíduos com um número baixo de linfócitos T CD4+.

Apesar de não podermos excluir a possível contribuição de outros co-receptores, para além daqueles incluídos no estudo (CCR5, CXCR4 e CCR8), o aparecimento e predomínio de uma população viral CXCR4, mais frequentemente observada em *cohorts* de HIV-1, pode ser vista como um contributo adicional para uma progressão mais rápida para a doença. Especificamente, a capacidade de infectar células T naive por variantes X4, o que poderia ocorrer no início da ontogenia dos linfócitos T, pode contribuir para o aumento da depleção de células T por estirpes X4.

Diversos estudos sobre o desenvolvimento dos timócitos, demonstraram que as células T imaturas progenitoras expressam altos níveis de CXCR4 (12, 182, 202). Como resultado, a infecção de timócitos imaturos por estirpes X4 pode perturbar a timopoiese levando a um comprometimento do desenvolvimento de células T e à depleção acelerada dessas mesmas células (12, 182). Além disso, as variantes X4 do HIV-1 estão associadas com a indução maciça de apoptose em células T CD4 vizinhas das infectadas enquanto as estirpes R5 parecem induzir níveis mais baixos de morte celular programada (88). Assim, o predomínio de variantes não-CXCR4 em indivíduos infectados por HIV-2, pode ajudar a preservar melhor o reportório dos linfócitos CD4+ e a funcionalidade do sistema imune, quando comparado com os indivíduos infectados por HIV-1, onde a predominância mais frequente de variantes

CXCR4 pode ser responsável pelo aumento da apoptose e regeneração limitada de células T, com impacto directo na homeostasia das células T CD4+ e na função imune.

Para compreender, com mais clareza, a dinâmica evolutiva da utilização dos co-receptores durante a progressão da doença, fomos caracterizar isolados primários obtidos de amostras sequenciais de HIV-2.

Aos estudarmos vírus sequenciais, isolados de nove indivíduos diferentes, podemos observar que não há correlação entre a diminuição da contagem de células T CD4+ e a aquisição de utilização do CXCR4 ou CCR8.

Apesar disto, houve um isolado que apresentou uma evolução clínica durante o período em que foi seguido, de estadio clínico assintomático para sintomático e virologicamente mudou de R5 para R5X4. No intervalo entre esta colheita e a seguinte, o indivíduo iniciou terapêutica anti-retroviral, e o seu biotipo voltou novamente a R5 (Tabela 4.3). Segundo Skrabal e colaboradores, a reversão da predominância de estirpes X4 para R5, em indivíduos submetidos a terapêutica, parece estar correlacionada com reduções significativas nos valores de carga viral (166), tal como pode ser observado no caso anteriormente exposto. Este facto poderá estar relacionado com uma elevada pressão de selecção, exercida pela terapêutica, sobre as estirpes X4. Sob condições que suprimem a replicação viral, os vírus presentes nos compartimentos com menor permeabilidade aos fármacos, ou os vírus provenientes de células que permanecem infectadas durante um maior período de tempo (como por exemplo os macrófagos e linfócitos T de memória), podem passar para a circulação. Assim, os vírus R5, que provavelmente têm estado presentes desde o início da infecção, passam a constituir a população predominante (166).

Com base nos diferentes resultados entretanto obtidos, tentamos perceber se existiria uma correlação entre o perfil de utilização dos co-receptores e os dados imunológicos e clínicos disponíveis dos indivíduos a partir dos quais os vírus foram isolados. A análise estatística dos dados indica que o uso diferencial de CCR5, CXCR4 ou CCR8 por HIV-1 e HIV-2 não se correlaciona com o estadio clínico ou com os dados imunológicos/virológicos dos indivíduos infectados, contrariamente ao descrito anteriormente (23).

Sabe-se que os locais anatómicos e celulares de replicação do HIV influenciam o curso da infecção, a capacidade da terapêutica anti-retroviral para reduzir a virémia e o estabelecimento de reservatórios virais. Os monócitos/macrófagos desempenham um papel importante em múltiplos aspectos da patogénese da infecção pelo HIV. Tal como as células T e as células dendríticas, os monócitos/macrófagos expressam os receptores para a entrada do vírus e, como tal, constituem potenciais alvos do HIV (39). Apesar disso, *in vitro*, os dados existentes da literatura sugerem que os monócitos só raramente são infectados produtivamente (39). No entanto, quando os monócitos se diferenciam em macrófagos *in vitro*, sofrem um aumento da expressão de CCR5, tornando-se assim mais susceptíveis à infecção por HIV-1 (123, 190).

Uma vez que os macrófagos são alvos celulares importantes, foi caracterizada a capacidade para infectar macrófagos derivados de monócitos (MDM) por parte de um grupo de isolados HIV-1 e HIV-2 que demonstraram capacidade de utilizar o co-receptor CCR8. A monitorização das infecções foi determinada por análise dos resultados da actividade da RT no sobrenadante das culturas.

Os resultados obtidos revelam que, independentemente dos isolados virais utilizarem o co-receptor CCR8 conjuntamente com o CCR5 e/ou CXCR4 (biotipo R5R8 e R5X4R8, respectivamente) ou não utilizarem este co-receptor (biotipo R5 ou R5X4), não existe uma relação aparente entre o biotipo e a produção de partículas virais infecciosas, dado que não foi possível detectar actividade da RT em nenhum dos sobrenadantes de cultura testados durante os 18 dias de infecção.

O processo de diferenciação dos monócitos regula a expressão diferencial dos co-receptores CCR5 e CXCR4 (54). Joly e Pinto referem que as sub-populações de macrófagos, com expressão significativa de CCR5 e CXCR4, se mantêm depois do quinto dia de maturação e que a expressão de CCR5 nestas células apresenta uma regulação positiva significativa durante a maturação *in vitro*, desde o primeiro ao sétimo dia (91). Pode-se por isso concluir que, na altura da infecção dos macrófagos pelos isolados HIV-1 e HIV-2 do presente trabalho, havia expressão suficiente destes co-receptores para que ocorresse a infecção.

Para além das infecções em MDM também foram realizados ensaios de infecciosidade em CMSP, com o intuito de estas serem o controlo de infecção. O HIV infecta células que possuam na sua membrana os receptores CD4 e um dos receptores de quimiocinas (normalmente o CCR5 e o CXCR4). Devido a isso o seu tropismo *in vivo* resume-se aos linfócitos T auxiliares (Th), monócitos/macrófagos e células dendríticas. No nosso trabalho, o painel de isolados testados, utilizam o co-receptor CCR5, independentemente de este ser utilizado conjuntamente com o CXCR4 e/ou CCR8, logo todos eles tinham as condicionantes necessárias para que a infecção em CMSP ocorresse com sucesso.

Podemos constatar que foi possível detectar actividade da RT nos sobrenadantes de cultura dos isolados HIV-1, UCFL1021, UCFL1029 e Ba-L, e em todos os isolados HIV-2. É de salientar que o HIV-1 e HIV-2 têm uma cinética de replicação viral semelhante em CMSP, excepto o isolado viral Ba-L em que se detectaram níveis muito superiores de actividade da RT.

Os resultados, pelo menos relativamente a estes vírus, levaram-nos a considerar a hipótese de ter havido infecção dos MDM não tendo havido no entanto produção viral detectável.

Em 2004 foi identificada uma proteína, a *TRIM 5α*, que actua como factor de restrição da replicação do HIV-1 em linfócitos de primatas e de humanos (embora em humanos a restrição seja pouco significava), resultando numa infecção abortiva antes da conclusão da transcrição reversa (178). Outros autores têm reportado restrições pré e pós-transcrição reversa de alguns HIV-1 R5 em monócitos (58, 125, 172, 188).

Foi também descrito anteriormente um factor de restrição pós-entrada em MDM (117, 155), denominado Lv2. Este factor inibe a replicação inicial, logo após a transcrição reversa, mas antes da entrada nuclear. Isto leva a que esta restrição se torne ainda mais evidente após vários ciclos de infecção.

Fomos por isso determinar se a entrada e os eventos de replicação precoce, tais como a transcrição reversa e a integração do DNA viral no DNA celular, ocorrem de forma eficiente nos MDM. Para tal utilizou-se a técnica de *Nested-PCR* para amplificar a região U3 do LTR. O primeiro PCR *Alu-LTR* teve como objectivo a amplificação da sequência de DNA compreendida entre o LTR do HIV-1 e HIV-2 e o elemento cromossomal *Alu* mais próximo. O segundo *round* de PCR teve como intuito detectar a presença da região U3 do LTR. Assim,

para além de se detectar a presença da região LTR, também se assegurou que o DNA proviral se encontra integrado no DNA das células.

Nas culturas de CMSP, os nossos resultados confirmaram que ocorreu com êxito a etapa da integração, dado que o fragmento pretendido foi amplificado. Estes resultados foram idênticos para as culturas de HIV-1 e HIV-2.

Em relação aos ensaios de infecciosidade efectuados em MDM, após fazermos o PCR do DNA das células, constatamos que houve amplificação do fragmento pretendido. Estes resultados permitem-nos afirmar que houve integração do DNA viral no genoma celular, o que significa que a infecção não produtiva pode ser o resultado de 3 factores:

- o limiar de sensibilidade do *kit* de quantificação de RT ser superior à quantidade de RT (e, portanto de partículas virais) produzida nas culturas;
- a existência de um factor de inibição que esteja a actuar nas fase do ciclo de replicação pós-transcrição reversa e integração, não permitindo a produção de viriões ou de partículas virais infecciosas.
- a ausência de algum factor celular que permita a conclusão do ciclo replicativo.

Excepcionalmente, não houve amplificação da região genómica LTR do isolado viral HIV-1, UCFL1018, nas culturas de MDM. Na Tabela 4.3 podemos observar que neste isolado, com o biotipo R5X4R8, a replicação viral foi detectada pela presença de Ag p24 no sobrenadante das culturas de células GHOST, com níveis baixos de antigénio e dentro do mesmo intervalo ($0,290 < O.D. < 1,500$) para todas as culturas dos diferentes co-receptores. Este facto é reforçado

com a observação de que os outros isolados utilizaram o CCR5 muito mais eficientemente nas culturas de células GHOST-CD4/CCR5, independentemente de utilizarem conjuntamente os co-receptores CXCR4 e/ou CCR8. Provavelmente este isolado de HIV-1 necessita de utilizar outro(s) co-receptor(es) para entrar nas células alvo para além dos estudados, o qual estará ausente nos MDM.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

Em resumo, os nossos dados confirmam que o receptor de quimiocina CCR8 pode funcionar como co-receptor por um número significativo de isolados primários de HIV-1 e HIV-2 e pode, de facto, ser relevante como co-receptor alternativo, pelo menos sob determinadas circunstâncias e/ou populações de células específicas. Estes resultados são ainda mais importantes se tivermos em conta que a frequência com que o CCR8 foi usado pelos isolados de HIV-1 foi, aproximadamente, duas vezes superior à frequência pela qual foi utilizado pelas estirpes de HIV-2.

Concluimos também que a aquisição de uso do co-receptor CXCR4 parece ser mais comum nas *quasispecies* de HIV-1 e que a preservação do biótipo R5 é mais frequentemente observada nas populações virais HIV-2. Estas conclusões estão directamente relacionadas com a identificação caracterização de cerca de duas vezes mais isolados HIV-1 a utilizarem o CXCR4 do que o CCR5 e cerca de sete vezes mais estirpes HIV-2 a usarem o CCR5. Em ambos os casos estes factos podem estar relacionados com a progressão mais lenta para doença geralmente observada nas infecções por HIV-2 em comparação com pacientes infectados pelo HIV-1.

A caracterização de isolados primários obtidos de amostras sequenciais permite-nos concluir que a reversão da predominância de estirpes X4 para R5 em indivíduos submetidos a terapêutica parece estar correlacionada com reduções nos valores de carga viral.

Também foi possível verificar que houve uma supressão da população viral CCR8, o que pode sugerir que estas variantes podem ter desvantagens intrínsecas, talvez uma menor capacidade replicativa ou uma susceptibilidade aumentada à resposta imunológica.

A análise estatística dos dados obtidos na caracterização dos isolados de HIV-1 e HIV-2 indica que não existe uma correlação entre o perfil de utilização dos co-receptores CCR5, CXCR4 ou CCR8 por HIV-1 e HIV-2 e o estadió clínico ou com os dados imunológicos/virológicos dos indivíduos a partir dos quais os vírus foram isolados.

A caracterização da capacidade para estirpes de HIV-1 e HIV-2, com diferentes perfis de utilização de co-receptores, infectarem macrófagos derivados de monócitos, permite-nos concluir que não existe uma relação entre o biotipo dos isolados estudados e a infecção produtiva destas células, traduzida pela produção de partículas virais infecciosas.

No entanto, apesar de não ter sido possível detectar a actividade da RT nas culturas de MDM infectados com os vários vírus, constatamos que houve integração do DNA viral no genoma celular.

Para tentar explicar esta discrepância entre o resultado da amplificação da região LTR e a ausência de produção de partículas virais, colocamos a hipótese de o limiar de sensibilidade do método de quantificação de RT ser superior à quantidade de RT produzida nas culturas e, por essa razão, não termos tido valores detectáveis da RT ou em alternativa podem estes resultados discrepantes serem consequência de algum factor de inibição que esteja a actuar na fase do ciclo de replicação pós-transcrição reversa e integração, não permitindo a produção de viriões ou de partículas virais infecciosas, ou finalmente, a interrupção do ciclo replicativo destes vírus em MDM, pode ainda ser devida à ausência de algum factor celular que permita a conclusão desse mesmo ciclo.

7.REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas

- 1. Albuquerque AS, CS Cortesão, RB Foxall, RS Soares, RM Victorino, AE Sousa.** 2007. Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J Immunol*; 178:3252-3259.
- 2. Andjelkovic, A.V., L. Song, K.A. Dzenko, H. Cong, and J.S. Pachter.** 2002. Functional expression of CCR2 by human fetal astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 70:219-231.
- 3. Aramori, I., Zhang, J., Ferguson, S. S., Bieniasz, P. D., Cullen, B. R. and Caron, M. G.** 1997. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *EMBO J.* **16**, 4606-4616.
- 4. Arthos, J., Rubbert A., Rabin R.L., Cicala C., Machado E., Wildt K., Hanbach M., Steenbeke T.D., Swofford R., Farber J.M., and Fauci A.S.** 2000. CCR5 Signal Transduction in Macrophages by Human Immunodeficiency Virus and Simian Immunodeficiency Virus Envelopes. *J Virol.* 74: 6418–6424.
- 5. Auffray C, MH Sieweke, F Geissmann.** 2009. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.*
- 6. Azevedo-Pereira, J.M., Santos-Costa, Q., Mansinho, K., Moniz-Pereira, J.** 2003. Identification and characterization of HIV-2 strains obtained from asymptomatic patients that do not use CCR5 or CXCR4 coreceptors. *Virology* 313 (1), 136–146.
- 7. Azevedo-Pereira, J. M., Santos-Costa, Q., and Moniz-Pereira, J.** 2005. HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Curr HIV Res* 3, 3-16.

8. **Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220:868-871.
9. **Berger, E. A.** 1997. HIV-1 entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS*. 11 (supplement A): S3–S16.
10. **Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E.M, Korber, B. T. M., Littman, D. R., Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Schuitmaker, H., Sodroski, J., and Weiss, R. A.** 1997. HIV-1 phenotypes classified by coreceptor usage. *Nature* **In press**.
11. **Berger, E. A., Murphy, P.M., Farber, J.M.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657-700.
12. **Berkowitz, R.D., Beckerman, K.P., Schall, T.J., McCune, J.M.** 1998. CXCR4 and CCR5 expression delineates targets for HIV-1 disruption of T cell differentiation. *J. Immunol.* 161 (7), 3702–3710.
13. **Bhattacharya, J., P.J. Peters, and P.R. Clapham.** 2003. CD4-independent infection of HIV and SIV: implications for envelope conformation and cell tropism in vivo. *AIDS*. 17(4):535-543.
14. **Bjorling E, G Scarlatti, A von Gegerfelt, J Albert, G Biberfeld, F Chiodi, E Norrby, EM Fenyo.** 1993. Autologous neutralizing antibodies prevail in HIV-2 but not in HIV-1 infection. *Virology*. 193:528-530.
15. **Blaak, H., P.H. Boers, R.A. Gruters, H. Schuitemaker, M.E. van der Ende, and A. D. Osterhaus.** 2005. CCR5, GPR15, and CXCR6 are major coreceptors of human immunodeficiency virus type 2 variants isolated from individuals with and without plasma viremia. *J. Virol.* 79:1686-1700.

16. **Bomsel M., and V. David.** 2002. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nat. Med.* 8:114-116.
17. **Bour S, Geleziunas R, Wainberg MA.** 1995. The HIV type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev.* 59: 63-93.
18. **Broder, C. C. and Collman, R. G.** 1997. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc. Biol.* 62:20–29.
19. **Broder, C.C., Jones-Trower, A.** 1999. Coreceptor use by primate Lentiviruses. In: **Kuiken, C., Foley, B.T., Hahn, B., Korber, B., McCutchan, F., Marx, P.A., Mellors, J.W., Mullins, J. I., Sodroski, J., Wolinsky, S.** (Eds.), *Human Retroviruses and AIDS: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences* Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, pp. 517–541.
20. **Bron, R., Klasse, P.J., Wilkinson, D., Clapham, P.R., Pelchen-Matthews, A., Power, C., Wells, T.N., Kim, J., Peiper, S.C., Hoxie, J.A., Marsh, M.** 1997. Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J. Virol.* 71 (11), 8405- 8415.
21. **Buonaguro, L., M. L. Tornesello, and F. M. Buonaguro.** 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J. Virol.* 81:10209-10219.
22. **Butler, I., F., I. Pandrea, P. A. Marx, and C. Apetrei.** 2007. HIV Genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr. HIV Res.* 5:23-45.
23. **Calado M, Matoso P, Santos-Costa Q, Espirito-Santo M, Machado J, Rosado L, et al.** 2010. Coreceptor usage by HIV-1 and HIV-2 primary isolates: The relevance of CCR8 chemokine receptor as an alternative coreceptor. *Virology.* 408(2):174-182.

24. Carrasco L., and J. M. Almendral del Rio. 2006. Retroviridae, p. 281-305. Hélice, Madrid, Espanha.
25. Carter CA, LS Ehrlich. 2008. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu Rev Microbiol.* 62:425-443.
26. Cavaleiro R, AE Sousa, A Loureiro, RM Victorino. 2000. Marked immunosuppressive effects of the HIV-2 envelope protein in spite of the lower HIV-2 pathogenicity. *AIDS.* 14:2679-2686.
27. Cecilia D., S.S. Kulkarni, S.P. Tripathy, R.R. Gangakhedkar, R.S. Paranjape, and D.A. Gadkari. 2002. Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *J. Virology.* 76:253:258.
28. Chackerian, B., E.M. Long, P.A. Luciw, and J. Overbaugh. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection 2. *J. Virol.* 71:3932-3939.
29. Chan D.C., Fass d., Berger J.M., Kim P.S. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 89:263-273.
30. Chen, Z., P. Telfer, A. Gettie, P. Reed, L. Zhang, D. D. Ho, and P. A. Marx. 1996. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J. Virol.* 70:3617-3627.

31. **Chen, Z., A., A. D. Luckay, L. Sodora, P. Telfer, P. Reed, A. Gettie, J. M. Kanu, J. M. Sadek, J. Yee, D. D. Ho, L. Zhang, and P. A. Marx.** 1997. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J. Virol.* 71:3953-3960.
32. **Cilliers, T., Nhlapo, J., Coetzer, M., Orlovic, D., Ketas, T., Olson, W.C., Moore, J.P., Trkola, A., Morris, L.** 2003. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J. Virol.* 77 (7), 4449–4456.
33. **Cilliers, T., Willey, S., Sullivan, W. M., Patience, T., Pugach, P., Coetzer, M., Papathanasopoulos, M., Moore, J. P., Trkola, A., Clapham, P., and Morris, L.** 2005. Use of alternate coreceptors on primary cells by two HIV-1 isolates. *Virology* 339, 136-44.
34. **Clapham, P.R. and A. McKnight.** 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 83:1809-1829.
35. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346.
36. **Clayton F., D.P. Kotler, S.K. Kuwda, T. Morgan, C. Stepan, J. Kuang, J. Le, and J. Fantini.** 2001. Gp120-induced Bob/GPR15 activation: a possible cause of human immunodeficiency virus enteropathy. *Am. J. Pathol.* 159:1933-1939.
37. **Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya S, Gallo RC, Lusso P.** 1995. Identification of RANTES, MIP-1a, and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 270: 1811-5.

38. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and R. A. Weiss. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* 321:10.
39. Coleman CM, L Wu. 2009. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology*. 6:51.
40. Collman RG, CF Perno, SM Crowe, M Stevenson, LJ Montaner. 2003. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J Leukoc Biol*. 74:631-634.
41. Connor, R. I., Mohri, H., Cao, Y. Z., and Ho, D. D. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type-1 infected individuals. *J. Virol.* 67, 1772-1777.
42. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S. & Landau, N. R. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *Journal of Experimental Medicine* 185, 621-628.
43. Corbet, S., M. C. Muller-Trutwin, P. Versmisse, S. Delarue, A. Ayoub, J. Lewis, S. Brunak, P. Martin, F. Brun-Vezinet, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, and P. Maucere. 2000. Env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* 74:529-534.
44. Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA. 2010. Infecção VIH/SIDA. A situação em Portugal 2009. CVEDT/INSA. (<http://www.sida.pt/aaaDefault.aspx?f=3&back=1&id=8227>, acessado a 29 de Abril 2011).

45. **Cormier, E. G. and T. Dragic.** 2002. 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.* **76**:8953-8957.
46. **Dairaghi, D.J., Fan, R.A., McMaster, B.E., Hanley, M.R., Schall, T.J.** 1999. HHV8-encoded vMIP-I selectively engages chemokine receptor CCR8. Agonist and antagonist profiles of viral chemokines. *J. Biol. Chem.* **274** (31), 21569–21574.
47. **D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F.** 1998. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* **161**, 5111-5.
48. **Da Silva, ZJ, I. Oliveira, A. Andersen, F. Dias, A. Rodrigues, B. Holmgren, S. Andersson, P. Aaby.** 2008. Changes in prevalence and incidence of HIV-1, HIV-2 and dual infections in urban areas of Bissau, Guinea-Bissau: is HIV-2 disappearing? *AIDS.* **22**:1195-1202.
49. **Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763.
50. **Darlix, J.L., Lastra, M.L., Mély, Y., Roques, B.** 2002. Nucleocapsid protein chaperoning of nucleic acids at the heart of HIV structure, assembly and cDNA synthesis. In: **Kuiken, C., Foley, B., Freed, E., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Mellors, J.W., Wolinsky, S., Korber, B.** (Eds.), *HIV Sequence Compendium*. Los Alamos, NM, 69–88.
51. **Davis, C.B., I. Dikic, D. Unutmaz, C.M. Hill, J. arthos, M.A. Siani, D.A. Thompson, J. Schlessinger, and D.R. Littman.** 1997. Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.* **186**:1793-1798.

- 52. Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M.W., Allikmets, R., O'Brien, S.J.** 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science*, 273: 1856-1862.
- 53. Deng, H.K., Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., Littman, D.R.** 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388 (6639), 296–300.
- 54. Di Marzio P, Jeffrey T, Landau NR** (1998). Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-macrophages. *AIDS Res Hum Retrovirus* 14: 129-138.
- 55. Duvall MG, A Jaye, T Dong, JM Brenchley, AS Alabi, DJ Jeffries, M van der Sande, TO Togun, SJ McConkey, DC Douek, AJ McMichael, HC Whittle, RA Koup, SL Rowland-Jones.** 2006. Maintenance of HIV-specific CD4+ T cell help distinguishes HIV-2 from HIV-1 infection. *J Immunol*. 176:6973-6981.
- 56. Duvall MG, ML Precopio, DA Ambrozak, A Jaye, AJ McMichael, HC Whittle, M Roederer, SL Rowland-Jones, RA Koup.** 2008. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol*. 38:350-363.
- 57. Edinger, A.L., Hoffman, T.L., Sharron, M., Lee, B., O'Dowd, B., Doms, R.W.** 1998. Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249 (2), 367–378.
- 58. Eisert, V., Kreutz, M., Becker, K., Konigs, C., Alex, U., Rubsamen- Waigmann, H., Andreesen, R. & von Briesen, H.** 2001. Analysis of cellular factors influencing the replication of human immunodeficiency virus type I in human macrophages derived from blood of different healthy donors. *Virology* 286, 31–44.

- 59. Endres, M.J., P.R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J.D. Turner, A. McKnight, J.F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, s. Cheo, P.J. Vance, T.N.Wells, C.A. power, S.S. Sutterwala, R.W. Doms, N.R. Landau, and J.A. Hoxie.** 1996. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell.* 87:745-756.
- 60. Ennen J, I Seipp, SG Norley, R Kurth.** 1990. Decreased accessory cell function of macrophages after infection with human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Eur J Immunol.* 20:2451-2456.
- 61. Faye A, M Burgard, H Crosnier, JM Retbi, S Blanche.** 1997. Human immunodeficiency virus type 2 infection in children. *J Pediatr.* 130:994-997.
- 62. Farzan, M., H. Choe, K.A. Martin, Y. Sun, M. Sidelko, C.R. Mackay, N.P. Gerard, J. Sodroski, and C. Gerard.** 1997. HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1 beta- mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J. Biol. Chem.* 272:6854-6857.
- 63. Fenyo, E. M., L. Morfeldt-Manson, F. Chiodi, B. Lind, G. von A., J. Albert, E. Olausson, and B. Asjo.** 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* **62**:4414–4419.
- 64. Florian Hladik, Huanliang Liu, Emily Speelmon, Devon Livingston-Rosanoff, Sean Wilson, Polachai Sakchalathorn, Yon Hwangbo, Benjamin Greene, Tuofu Zhu, and M. Juliana McElrath.** 2005. Combined Effect of CCR5-Δ32 Heterozygosity and the CCR5 Promoter Polymorphism –2459 A/G on CCR5 Expression and Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. *J. Virol.* 79: 11677 - 11684
- 65. Forsman, A., and R. A. Weiss.** 2008. Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol.* **16**:555-560.

- 66. Fouchier, R.A., Meyaard, L., Brouwer, M., Hovenkamp, E., Schuitemaker, H.** 1996. Broader tropism and higher cytopathicity for CD4+ T cells of a syncytium-inducing compared to a non-syncytium-inducing HIV-1 isolate as a mechanism for accelerated CD4+ T cell decline in vivo. *Virology* 219 (1), 87–95.
- 67. Foxall RB, CS Cortesao, AS Albuquerque, RS Soares, RM Victorino, AE Sousa.** 2008. Gag-specific CD4+ Tcell frequency is inversely correlated with proviral load and directly correlated with immune activation in infection with human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) but not HIV-1. *J Virol.* 82:9795-9799.
- 68. Foxall RB, RS Soares, AS Albuquerque, CS Cortesao, RM Victorino, AE Sousa.** 2008. Increased frequency of CD25(dim)CD4(+) T \square cells in HIV \square 2 infection, a naturally occurring attenuated form of HIV-1. *Clin Immunol.*
- 69. Freed, E. O.** 2002. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 6:13-33.
- 70. Gabuzda D, He J, Ohagen A, Vallat A-V.** 1998. Chemokine receptors in HIV-1 infection of the central nervous system. *Seminars in Immunology.* 10(3):203-213.
- 71. Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, B. White, P. Foster, and P. D. Markham.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
- 72. Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, M. C. Rodenburg, S. F. Michael, L.B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* 397:436-441.
- 73. Gartner S., Markovits P., Markovitz D.M., Kaplan M.H., Gallo R.C. and Popovic M.** 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*, 233, 215.

- 74. Gautier D, S Beq, CS Cortesao, AE Sousa, R Cheyner.** 2007. Efficient thymopoiesis contributes to the maintenance of peripheral CD4 T cells during chronic human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol.* 81:12685-12688.
- 75. Gendelman HE, LM Baca, H Husayni, JA Turpin, D Skillman, DC Kalter, JM Orenstein, DL Hoover, MS Meltzer.** 1990. Macrophage-HIV interaction: viral isolation and target cell tropism. *AIDS.* 4:221-228.
- 76. Geretti, A. M.** 2006. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:1-7.
- 77. Gomes P, NC Taveira, JM Pereira, F Antunes, MO Ferreira, MH Lourenço.** 1999. Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *J Clin Microbiol.* 37:453-456.
- 78. Goya, I., Gutiérrez, J., Varona, R., Kremer, L., Zaballos, A., and Márquez, G.** 1998. Identification of CCR8 as the specific receptor for the human beta-chemokine I-309: cloning and molecular characterization of murine CCR8 as the receptor for TCA-3. *J Immunol* 160, 1975-81.
- 79. Groot F.** 2006. Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. In *Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission.* PhD Thesis. p. 9-31.
- 80. Guillon, C., van der Ende, M.E., Boers, P.H., Gruters, R.A., Schutten, M., Osterhaus, A.D.** 1998. Coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 2 primary isolates and biological clones is broad and does not correlate with their syncytium-inducing capacities. *J. Virol.* 72 (7), 6260–6263.
- 81. Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287: 607-614.

- 82. Haque, N. S., Fallon, J. T., Pan, J. J., Taubman, M. B., and Harpel, P. C.** 2004. Chemokine receptor-8 (CCR8) mediates human vascular smooth muscle cell chemotaxis and metalloproteinase-2 secretion. *Blood* 103, 1296-304.
- 83. Harrold SM, G Wang, DK McMahon, SA Riddler, JW Mellors, JT Becker, R Caldararo, TA Reinhart, CL Achim, CA Wiley.** 2002. Recovery of replication-competent HIV type 1-infected circulating monocytes from individuals receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18:427-434.
- 84. Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson.** 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339:389-392.
- 85. Horuk, R., Hesselgesser, J., Zhou, Y., Faulds, D., Halks-Miller, M., Harvey, S., Taub, D., Samson, M., Parmentier, M., Rucker, J., Doranz, B. J., and Doms, R. W.** 1998. The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J Biol Chem* 273, 386-91.
- 86. Isaacman-Beck, J., Hermann, E., Yi, Y., Ratcliffe, S., Mulenga, J., Allen, S., Hunter, E., Derdeyn, C., Collman, R.** 2009. Heterosexual transmission of HIV-1 Subtype C: macrophage tropism, alternative coreceptor use, and the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J. Virol.* 83 (16), 8208–8220.
- 87. Jablonski, J. A., E. Buratti, C. Stuani, and M. Caputi.** 2008. The secondary structure of the human immunodeficiency virus type 1 transcript modulates viral splicing and infectivity. *J. Virol.* **82**:8038-8050.
- 88. Jekle, A., Keppler, O.T., De Clercq, E., Schols, D., Weinstein, M., Goldsmith, M.A.** 2003. In vivo evolution of human immunodeficiency virus type 1 toward increased pathogenicity through CXCR4-mediated killing of uninfected CD4 T cells. *J. Virol.* 77 (10), 5846–5854.

- 89. Jino, A., Shimizu, N., Soda, Y., Haraguchi, Y., Kitamura, T., and Hoshino, H.** 1998. Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T cells as a new coreceptor for HIV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 497-502.
- 90. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).** 2011. UNAIDS Report on the Global AIDS epidemic, 2010 (http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf, acessado a 29 de Abril 2011).
- 91. Joly, M., and J. M. Pinto.** 2005. CXCR4 and CCR5 regulation and expression patterns on T- and monocyte-macrophage cell lineages: implications for susceptibility to infection by HIV-1. *Math. Biosci.* **195**:92–126.
- 92. Kanki PJ, KU Travers, MB S, CC Hsieh, RG Marlink, NA Gueye, T Siby, I Thior, M Hernandez-Avila, JL Sankale, et al.** 1994. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet.* 343:943-946.
- 93. Kedzierska K, R Azzam, P Ellery, J Mak, A Jaworowski, SM Crowe.** 2003. Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol.* 26:247-263.
- 94. Keele, B. F., F. V. Heuvelink, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Y. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters, and B. H. Hahn.** 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.
- 95. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* 312, 767.

- 96. Kolchinsky P, Kiprilov E, and Sodroski J.** 2001. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent human immunodeficiency virus variants. *J Virol* **75**: 2041–2050.
- 97. Kolchinsky, P., Mirzabekov, M. Farzan, E. Kiprilov, M. cayabyab, L.J. Mooney, H. Choe, and J. Sodroski.** 1999. Adaptation of a CCR5-using, primary human immunodeficiency virus type 1 isolate for CD4-independent replication. *J. Virol.* **73**:8120-8126.
- 98. Kosakovsky, S. L., and D. M. Smith.** 2009. Are all subtypes created equal? The effectiveness of antiretroviral therapy against non-subtype B HIV-1. *Clin. Infect. Dis.* **48**:1306-1309.
- 99. Kozac, S.L., E.J. Platt, N. madani, F.E. Ferro, Jr., K. Peden, and D. Kabat.** 1997. CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient an laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **71**:873-882.
- 100. Kuhmann, S.E., E.J. platt, S.L. Kozak, and D. Kabat.** 2000. Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **74**:7005-7015.
- 101. Lambotte O, Y Taoufik, MG de Goer, C Wallon, C Goujard, JF Delfraissy.** 2000. Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **23**:114-119.
- 102. Lee, B., J. Ratajczak, R.W. Doms, A.M. Gewirtz, and Z. Ratajczak.** 1999. Coreceptor/chemokine receptor expression on human. Hematopoietc cells: biological implications for human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood.* **93**:1145-1156.
- 103. Lee, B., M. Sharron, L.J. Montaner, D. Weissman, and R.W. Doms.** 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocytes-derived macrophages. *Proc. Nat. acad. Sci. U.S.A.* **96**:5215-5220.

- 104. Lee, C., Q.H. liu, B. Tomkowicz, Y. Yi, B.D. Freedman, and R.G. Collman.** 2003. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4- mediated gp120 elicited signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* 74:676-682.
- 105. Lee, S., Tiffany, H. L., King, L., Murphy, P. M., Golding, H., and Zaitseva, M. B.** 2000. CCR8 on human thymocytes functions as a human immunodeficiency virus type 1 coreceptor. *J Virol* 74, 6946-52.
- 106. Levi, J. A., A. D Hoffman., S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-842.
- 107. Limborska SA, Balanovsky OP, Balanovskaya EV, Slominsky PA, Schadrina MI, Livshits LA, Kravchenko SA, Pampuha VM, Khusnutdinova EK, Spitsyn VA.** 2002. Analysis of CCR5D 32 Geographic Distribution and Its Correlation with Some Climatic and Geographic Factors. *Hum Hered* 53:49–54.
- 108. Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A. and Landau, N.R.** 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 86: 367-377.
- 109. Liu, H.Y., Soda, Y., Shimizu, N., Haraguchi, Y., Jinno, A., Takeuchi, Y., Hoshino, H.** 2000. CD4-Dependent and CD4-independent utilization of coreceptors by human immunodeficiency viruses type 2 and simian immunodeficiency viruses. *Virology* 278 (1), 276–288.
- 110. MacNeil A, AD Sarr, JL Sankale, ST Meloni, S Mboup, P Kanki.** 2007. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol.* 81:5325-5330.

- 111. MacNeil A, JL Sankale, ST Meloni, AD Sarr, S Mboup, P Kanki.** 2006. Genomic sites of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) integration: similarities to HIV-1 in vitro and possible differences in vivo. *J Virol.* 80:7316-7321.
- 112. MacNeil A, JL Sankale, ST Meloni, AD Sarr, S Mboup, P Kanki.** 2007. Long-term inpatient viral evolution during HIV-2 infection. *J Infect Dis.* 195:726-733.
- 113. Margolis, L.B., Glushakova, S., Grivel, J.C., and Murphy, P.M.** 1998. Blockade of CC chemokine receptor 5 (CCR5)-tropic human immunodeficiency virus-1 replication in human lymphoid tissue by CC chemokines. *J. Clin. Invest* 101, 1876-1880.
- 114. Markovitz DM.** 1993. Infection with the human immunodeficiency virus type 2. *Ann Intern Med.* 118:211-218.
- 115. Marlink R.** 1996. Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. *AIDS.* 10:689-699.
- 116. McKnight, A., Dittmar, M.T., Moniz-Periera, J., Ariyoshi, K., Reeves, J.D., Hibbitts, S., Whitby, D., Aarons, E., Proudfoot, A.E., Whittle, H., Clapham, P.R.** 1998. A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J. Virol.* 72 (5), 4065–4071.
- 117. McKnight, A., Griffiths, D. J., Dittmar, M., Clapham, P. & Thomas, E.** 2001. Characterization of a late entry event in the replication cycle of human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 75, 6914–6922.
- 118. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA.** 2004. The CCR5 and CXCR4 Coreceptors - Central to Understanding the Transmission and Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 20(1):111-126.

- 119. Montagnier, L., J. C. Chermann, F. Barré-Sinoussi, D. Klatzmann, S. Wain-Hobson, M. Alizon, F. Clavel, F. Brun-Vezinet, E. Vilmer, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and J. C. Gluckman.** 1984. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp.* 15:319-331.
- 120. Morner, A., Bjorndal, A., Albert, J., Kewalramani, V.N., Littman, D.R., Inoue, R., Thorstensson, R., Fenyo, E.M., Bjorling, E.** 1999. Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage. *J. Virol.* 73 (3), 2343–2349.
- 121. Most J, L Spötl, M Saracetti, W Vogetseder, MP Dierich, R Zangerle.** 1994. Differences in heterosexual transmission of HIV-1 and HIV-2. *Lancet.* 344:1572-1573.
- 122. Mougel, M., L. Houzet, and J. L. Darlix.** 2009. When is it time for reverse transcription to start and go? *Retrovirology* 6:24.
- 123. Naif HM, S Li, M Alali, A Sloane, L Wu, M Kelly, G Lynch, A Lloyd, AL Cunningham.** 1998. CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 72:830-836.
- 124. Nelson, PJ, Krensky, AM.** 1998. Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol.* 10:265-270.
- 125. Neil, S., Martin, F., Ikeda, Y. & Collins, M.** 2001. Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. *J Virol* 75, 5448–5456.
- 126. Neil, S. J. D., Aasa-Chapman, M. M. I., Clapham, P. R., Nibbs, R. J., McKnight, A. and Weiss, R. A.** 2005. The promiscuous CC chemokine receptor D6 is a functional coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 on astrocytes. *J Virol* 79, 9618–9624.

127. **Nisole, S. N., and A. Saib.** 2004. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1:9.
128. **Norkin, L.C.** 1995. Virus receptors: implications for pathogenesis and the design of antiviral agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 293-315.
129. **Nottet HS, L de Graaf, NM de Vos, LJ Bakker, JA van Strijp, MR Visser, J Verhoef.** 1993. Phagocytic function of monocyte-derived macrophages is not affected by human immunodeficiency vírus type 1 infection. *J Infect Dis.* 168:84-91.
130. **Pádua E.** 2004. Epidemiologia da infecção por VIH-2. In *Manual sobre SIDA*. F. Antunes, ed. Permanyer Portugal, Lisboa, p. 69-71.
131. **Pantophlet, R. and D. R. Burton.** 2006. GP120: target for neutralizing HIV antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 24:739-769.
132. **Pastore C., Ramos A., and Mosier D.E.** (2004) Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *Journal of Virology* 78:7565–7574.
133. **Peeters, M., C. Honoré, T. Huet, L. Bedjabaga, S. Ossari, P. Bussi, R. W. Cooper, and E. Delaporte.** 1989. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3:625-630.
134. **Peeters, M., A. Gueye, S. Mboup, F. Bibollet-Ruche, E. Ekaza, C. Mulanga, R. Ouedrago, R. Gandji, P. Mpele, G. DibangaII, B. Koumare, M. Saidou, E. Esu-Williams, J. P. Lombart, W. Badombena, N Luo, M. V. Haesevelde, and E. Delaporte.** 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 11:493-498.
135. **Peeters, M.** 2000. Recombinant HIV sequences: Their role in the global epidemic, p. 39-54. In **C. Kuiken, B. Foley, B. Hahn, P. Marx, F. Mccutchan, J. W. Mellors, S. Wolinsky and B. Korber** (ed.), *HIV Sequence Compendium 2000*, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.

- 136. Peterlin, B. M., and D. Trono.** 2003. Hide, shield and strike back: how HIVinfected cells avoid immune eradication. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:97-107.
- 137. Pohlmann, S., Krumbiegel, M., Kirchhoff, F.** 1999. Coreceptor usage of BOB/GPR15 and Bonzo/STRL33 by primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 5), 1241–1251.
- 138. Pollard, V. W.** 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:491-532.
- 139. Polzer, S., M. T. Dittmar, H. Schmitz, and M. Schreiber.** 2002. The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* **304**:70-80.
- 140. Popovic M, M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo.** 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497-500.
- 141. Popper SJ, AD Sarr, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, ME Essex, PJ Kanki.** 2000. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production *in vivo*. *J Virol.* **74**:1554-1557.
- 142. Reeves, J.D., A. McKnight, S. Potemba, G. Simmons, P.W. Gray, C.A. Power, T. Wells, R.A. Weiss, and S.J. Talbot.** 1997. CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry. *Virology.* **231**:130-134.
- 143. Reeves J, Hibbitts S, Simmons G, McKnight A, Azevedo-Pereira J, Moniz-Pereira J, et al.** 1999. Primary Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Isolates Infect CD4-Negative Cells via CCR5 and CXCR4: Comparison with HIV-1 and Simian Immunodeficiency Virus and Relevance to Cell Tropism In Vivo. *Journal of Virology.* **73**(9):7795-7804.

- 144. Requejo, H. I.** 2006. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev. Saúde Pública* 40:331-345.
- 145. Robertson, D. L., B. H. Hahn, and P. M. Sharp.** 1995. Recombination in AIDS viruses. *J. Mol. Evol.* 40:249-259.
- 146. Robertson, D. L., J. P. Anderson, J. A. Bradac, J. K. Carr, B. Foley, R. K. Funkhouser, F. Gao, B. H. Hahn, M. L. Kalish, C. Kuiken, G. H. Learn, T. Leitner, F. Mccutchan, S. Osmanov, M. Peeters, D. Pienniazek, M. Salminem, P. M. Sharp S. Wolisky, and B. Korber.** 1999. HIV-1 nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. Los Alamos National Laboratory (disponível em <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/1999/6/nomenclature.pdf>).
- 147. Rodriguez SK, AD Sarr, A MacNeil, S Thakore-Meloni, A Gueye-Ndiaye, I Traore, MC Dia, S Mboup, PJ Kanki.** 2007. Comparison of heterologous neutralizing antibody responses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- and HIV-2-infected Senegalese patients: distinct patterns of breadth and magnitude distinguish HIV-1 and HIV-2 infections. *J Virol.* 81:5331-5338.
- 148. Roos, R. S., Loetscher, M., Legler, D. F., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B.** 1997. Identification of CCR8, the receptor for the human CC chemokine I-309. *J Biol Chem* 272, 17251-4.
- 149. Ross, E. K., A. J. Buckler-White, A. B. Rabson, G. Englund, and M. A. Martin.** 1991. Contribution of NF- κ B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *J. Virol.* **65**:4350-4358.
- 150. Rossi D., and Zlotnik A.** 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**:217–242.

- 151. Rucker, J., Edinger, A. L., Sharron, M., Samson, M., Lee, B., Berson, J. F., Yi, Y., Margulies, B., Collman, R. G., Doranz, B. J., Parmentier, M., and Doms, R. W.** 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 71, 8999-9007.
- 152. Samson, M., Stordeur, P., Labbe, O., Soularue, P., Vassart, G., and Parmentier, M.** 1996. Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel human gene, ChemR1, expressed in T lymphocytes and polymorphonuclear cells and encoding a putative chemokine receptor. *Eur J Immunol* 26, 3021-8.
- 153. Samson, M., Soularue, P., Vassart, G. and Parmentier, M.** 1996. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CCR1 to CC-CCR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p.24 regions of chromosome 3. *Genomics*, 36: 522-526.
- 154. Schwartz, D. H., R. Viscidi, O. Laeyendecker, H. Song, S. C. Ray, and N. Michael.** 1996. Predominance of defective proviral sequences in an HIV + long-term non-progressor. *Immunol. Lett.* 51:3-6.
- 155. Schmitz, C., Marchant, D., Neil, S. J. D., Aubin, K., Reuter, S., Dittmar, M. T. & McKnight, A.** 2004. Lv2, a novel postentry restriction, is mediated by both capsid and envelope. *J Virol* 78, 2006–2016.
- 156. Schuitemaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, d. R. E., S. van R. P., J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema, & M. Tersmette.** 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 66:1354–1360.
- 157. Schüpbach, J. M., R. Popovic, V. Gilden, M. A. Gonda, M. G. Sarngadharan, and R. C. Gallo.** 1984. Serological analysis of a subgroup of human Tlymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* 224:503-505.

- 158. Schwartz, D. H., R. Viscidi, O. Laeyendecker, H. Song, S. C. Ray, and N. Michael.** 1996. Predominance of defective proviral sequences in an HIV + long-term non-progressor. *Immunol. Lett.* **51**:3-6.
- 159. Sharp, P., M., D. L. Robertson, and B. H. Hahn.** 1995. Cross-species transmission and recombination of AIDS viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **349**:41-47.
- 160. Shen R, Richter H, Clements R, Novak L, Huff K, Bimczok D, et al.** 2009. Macrophages in Vaginal but Not Intestinal Mucosa Are Monocyte-Like and Permissive to Human Immunodeficiency Virus type 1 Infection. *Journal of Virology.* 2009 Apr; **83**(7):3258-3267.
- 161. Shi, Y., E. Brandin, E. Vincic, M. Jansson, A. Blaxhult, K. Gyllensten, L. moberg, C. Brostrom, E.M. Fenyo, and J. Albert.** 2005. Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *J. Gen. Virol.* **86**:3385-3396.
- 162. Shimizu, N., Tanaka, A., Oue, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Apichartpiyakul, C., Uchiumi, H., Nojima, Y., Hoshino, H.** 2009. Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of HIV. *AIDS* **27** (7), 761–769.
- 163. Sierra, S., B. Kupfer, and R. Kaiser.** 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* **34**:233-244.
- 164. Simon F, S Matheron, C Tamalet, I Loussert-Ajaka, S Bartczak, JM Pepin, C Dhiver, E Gamba, C Elbim, JA Gastaut, et al.** 1993. Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS.* **7**:1411-1417.
- 165. Singh, A., Besson, G., Mobasher, A., Collman, R.G.** 1999. Patterns of chemokine receptor fusion cofactor utilization by human immunodeficiency virus type 1 variants from the lungs and blood. *J. Virol.* **73** (8), 6680–6690.

- 166. Skrabal K, Low AJ, Dong W *et al.* 2007.** Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol.* 45: 279-284.
- 167. Smith PD, Meng G, Salazar-Gonzalez JF, Shaw GM. 2003.** Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *Journal of Leukocyte Biology.* 74:642-649.
- 168. Smith P, Meng G, Sellers M, Rogers T, Shaw G. 2000.** Biological parameters of HIV-1 infection in primary intestinal lymphocytes and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 68(3):360-365.
- 169. Soares R, R Foxall, A Albuquerque, C Cortesao, M Garcia, RM Victorino, AE Sousa. 2006.** Increased frequency of circulating CCR5+ CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *J Virol.* 80:12425-12429.
- 170. Sol, N., Ferchal, F., Braun, J., Pleskoff, O., Treboute, C., Ansart, I., Alizon, M. 1997.** Usage of the coreceptors CCR-5, CCR-3, and CXCR-4 by primary and cell line-adapted human immunodeficiency virus type 2. *J. Virol.* 71 (11), 8237–8244.
- 171. Sonza S, HP Mutimer, R Oelrichs, D Jardine, K Harvey, A Dunne, DF Purcell, C Birch, SM Crowe. 2001.** Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 15:17-22.
- 172. Sonza, S., Maerz, A., Deacon, N., Meanger, J., Mills, J., Crowe, S. 1996.** Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol* 70, 3863–3869.
- 173. Sousa AE, J Carneiro, M Meier-Schellersheim, Z Grossman, RM Victorino. 2002.** CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol.* 169:3400-3406.

- 174. Sousa AE, AF Chaves, A Loureiro, RM Victorino.** 2001. Comparison of the frequency of interleukin (IL)-2-, interferon-gamma-, and IL-4-producing T cells in 2 diseases, human immunodeficiency virus types 1 and 2, with distinct clinical outcomes. *J Infect Dis.* 184:552-559.
- 175. Spear GT, CY Ou, HA Kessler, JL Moore, G Schochetman, AL Landay.** 1990. Analysis of lymphocytes, monocytes, and neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons for HIV DNA. *J Infect Dis.* 162:1239-1244.
- 176. Spira, S., M. A. Wainberg, H. Loomba, D. Turner, and B. G. Brenner.** 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:229-240.
- 177. Stebbing, J., B. Gazzard, and D.C.Douek.** 2004. Where does HIV live? *N. Engl. J. Med.* 350:1872-1880.
- 178. Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P. & Sodroski, J.** 2004. The cytoplasmic body component TRIM5a restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853.
- 179. Stins M.F., D. Pearce, H. Choi, C.F. Di, C.A. Pardo, and K.S. Kim.** 2004. CD4 and chemokine receptors on human brain microvascular endothelial cells, implications for human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *Endothelium.* 11:275-284.
- 180. Tabeke Y, Kusagawa S, Motomura K.** 2004. Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. *Pediatr. Int.* 46: 236-44.
- 181. Takebe, Y., R. Uenishi, and X. Li.** 2008. Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. *Adv. Pharmacol.* 56:1-25.

- 182. Taylor Jr., J.R., Kimbrell, K.C., Scoggins, R., Delaney, M., Wu, L., Camerini, D.** 2001. Expression and function of chemokine receptors on human thymocytes: implications for infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75 (18), 8752–8760.
- 183. Taylor, B. S., M. E. Sobieszczyk, F. E. McCutchan, and S. M. Hammer.** 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* 358:1590-1602.
- 184. Thomas, E.R., C. Shotton, R.A. Weiss, P.R. Clapham, and A. Mcknight.** 2003. CD4-dependent and CD4-independent HIV-2: consequences for neutralization. *AIDS.* 17:291-300.
- 185. Thomson MM, Pérez-Álvarez L, Nájera R.** 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infectious Diseases.* 2:461-471.
- 186. Tiffany, H. L., Lautens, L. L., Gao, J. L., Pease, J., Locati, M., Combadiere, C., Modi, W., Bonner, T. I., and Murphy, P. M.** 1997. Identification of CCR8: a human monocyte and thymus receptor for the CC chemokine I-309. *J Exp Med* 186, 165-70.
- 187. Tong-Starksen SE, TM Welsh, BM Peterlin.** 1990. Differences in transcriptional enhancers of HIV-1 and HIV-2. Response to T cell activation signals. *J Immunol.* 145:4348-4354.
- 188. Triques, K. and Stevenson, M.** 2004. Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. *J Virol* 78, 5523–5527.
- 189. Tsherning C, Alaeus A, Frederiksson R, et al.** 1998. Differences in chemokines coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology.* 241:181-188.

- 190. Tuttle, D.L., J.K. Harrison, c. Anders, J.W. Sleasman, and M.M. Goodenow.** 1998. Expression of CCR5 increases during monocytes differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:4962-4969.
- 191. Ulrich, P.P., Busch, M.P., El-Beik, T., Shiota, J., Vennari, J., Shriver, K. and Vyas, G. N.** 1988. Assessment of human immuno- deficiency virus expression in co cultures of peripheral blood mononuclear cells from healthy seropositive subjects. *Journal of Medical Virology.* 25, 1-10.
- 192. Uphaphiphat, P., A. Thitithanyanont, S. Paca-Uccaralertkun, M. Essex, and T. H. Lee.** 2003. Effect of amino acid substitution of the V3 and bridging sheet residues in human immunodeficiency virus type 1 subtype C gp120 on CCR5 utilization. *J. Virol.* 77:3832-3837.
- 193. Valentin, A., Albert, J., Fenyo, E. M., and Asjo, B.** 1994. Dual tropism for macrophages and lymphocytes is a common feature of primary human immunodeficiency virus type 1 and 2 isolates. *J. Virol.* 68, 6684-6689.
- 194. Valentin, A., Lu, W., Rosati, M., Schneider, R., Albert, J., Karlsson, A., and Pavlakis, G. N.** 1998. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: Implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95. 8886-8891.
- 195. Van der, M.P., A.M. Ulrich, F. Gonzalez-Scarano, and E. Lavi.** 2000. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *S. Exp. Mol. Pathol.* 69: 192-201.
- 196. Vergne, L., and M. Peeters.** 2007. The challenge of HIV sequence diversity in the envelope glycoprotein, p.17-29. In J. D. Reeves and C. A. Derdeyn (ed.), *entry inhibitors in HIV therapy*, Birkhäuser Basel, Montpellier.
- 197. Walker, C.M., and J.A. Levy.** 1989. A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology* 66: 628-630

- 198. Weiss, R.A.** 1996. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science*. 272:1885-1886.
- 199. Willey, S.J., Reeves, J.D., Hudson, R., Miyake, K., Dejucq, N., Schols, D., De Clercq, E., Bell, J., McKnight, A., Clapham, P.R.** 2003. Identification of a subset of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and simian immunodeficiency virus strains able to exploit an alternative coreceptor on untransformed human brain and lymphoid cells. *J. Virol.* 77 (11), 6138–6152.
- 200. Wyatt R., Sodroski J.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 280:1884-1888.
- 201. Xiao, L. H., Rudolph, D. L., Owen, S. M., Spira, T. J., and Lal, R. B.** 1998. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXC-chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. *AIDS*. 12,137–143.
- 202. Zhang, L., He, T., Huang, Y., Chen, Z., Guo, Y., Wu, S., Kunstman, K. J., Brown, R. C., Phair, J. P., Neumann, A. U., Ho, D. D. & Wolinsky, S. M.** 1998. Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 72, 9307-9312.
- 203. Zhang L, He T, Talal A, Wang G, Frankel S, Ho D.** 1998. In Vivo Distribution of the Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *Journal of Virology*. 72(6):5035-5045.
- 204. Zhang, Y.J., Dragic, T., Cao, Y., Kostrikis, L., Kwon, D.S., Littman, D.R., KewalRamani, V.N., Moore, J.P.** 1998. Use of coreceptors other than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of human immunodeficiency virus type 1 is rare in vitro. *J. Virol.* 72 (11), 9337–9344.
- 205. Zhang, Y.J., Moore, J.P.** 1999. Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry? *J. Virol.* 73 (4), 3443–3448.

- 206. Zhang, Y., Lou, B., Lal, R.B., Gettie, A., Marx, P.A., Moore, J.P.** 2000. Use of inhibitors to evaluate coreceptor usage by simian and simian/human immunodeficiency viruses and human immunodeficiency virus type 2 in primary cells. *J. Virol.* 74 (15), 6893–6910.
- 207. Zhu T., Wang N., Carr A., Nam D.S., Moor-Jankowski R., Cooper D.A., et al.** 1996. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* 70:3098-3107.
- 208. Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., Santoni, A., Zlotnik, A., and Napolitano, M.** 1998. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol* 161, 547-51.
- 209. Zlotnik A., Yoshie O.** 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **12**:121-127.