

ANDREA CARLA FISSORE

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DO ALELO MUTANTE DELTA32 DO
GENE CCR5 EM UMA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) ATENDIDOS
NO HC/UNICAMP.**

Campinas

2000

ANDREA CARLA FISSORE

***ESTUDO DA FREQUÊNCIA DO ALELO MUTANTE DELTA32 DO
GENE CCR5 EM UMA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) ATENDIDOS
NO HC/UNICAMP.***

*Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de Mestre em Clínica Médica, área de
concentração Ciências Básicas.*

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

***Professor Adjunto da Disciplina de Doenças Transmissíveis do Departamento de Clínica
Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP***

Campinas

2000



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

F549e Fissore, Andrea Carla
 Estudo da frequência do alelo mutante delta 32 do gene CCR5 em
 uma população de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência
 humana (HIV) atendidos no HC/Unicamp / Andrea Carla Fissore.
 Campinas, SP : [s.n.], 2000.

 Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

 1. AIDS (Doença). 2. HIV (Vírus). I. Marcelo de Carvalho
 Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
 Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação Mestrado

Orientador(a): Prof.Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Membros:

1. Marcelo de Carvalho Ramos
 2. Sandra Cecilia Botelho Costa
 3. [Assinatura]
 4. _____
 5. _____
-

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data:

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Alfeu Fissore e

Marleide Corrêa Fissore,

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos, pela orientação e interesse dedicados a esse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de AIDS pela amizade e colaboração, em especial à bióloga Sílvia Maria W. Garcia.

Ao Dr. Carlos Magno C.B. Fortaleza pelo incentivo e ajuda prestada nas primeiras etapas desse trabalho.

À biomédica Ana Lúcia R. Calusni e à farmacêutica Gláucia Roscani, pela inestimável ajuda e apoio prestados nas várias etapas da pesquisa.

Ao meu primo Marlon Correia Pina, pelo auxílio no trabalho de editoração.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização desse trabalho.

FINANCIAMENTO

Esse trabalho se tornou possível graças ao suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 97/10400-1)

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Importância da doença.....	2
1.1.1. Alguns fatores históricos.....	2
1.1.2. Epidemiologia.....	3
1.2. Agente etiológico e patogenia.....	8
1.2.1. Como foi descoberto.....	8
1.2.2. Como se classifica o HIV.....	9
1.2.3. Mecanismos de produção da doença.....	11
1.2.4. Como o HIV invade o organismo humano.....	12
1.2.5. Como evolui a doença.....	23
1.3. Tratamento.....	24
1.3.1. O uso de antiretrovirais.....	24
1.3.2. Perspectivas.....	27
2. OBJETIVO.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. População de estudo.....	33
3.1.1. Critérios de seleção.....	33
3.2. Métodos laboratoriais.....	33

3.2.1. Caracterização genômica.....	33
3.2.2. Determinação da carga viral.....	34
3.2.3. Determinação de subpopulações linfocitárias.....	35
3.2.4. ELISA.....	36
3.2.5. Western Blot.....	37
3.3. Classificação clínica.....	38
4. RESULTADOS.....	39
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	50
7. SUMMARY.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. ANEXOS.....	66

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Distribuição dos indivíduos estudados, segundo o sexo e idade.....	43
Tabela 2: Distribuição dos indivíduos estudados, segundo classificação clínica.....	43
Tabela 3: Distribuição dos indivíduos estudados segundo a classificação clínica e o genótipo ccr5(%).....	44
Tabela 4: Distribuição dos indivíduos estudados segundo o genótipo CCR5 e a carga viral.....	44
Tabela 5: Distribuição dos indivíduos estudados segundo a população de células CD4+ e o genótipo ccr5.....	45
Tabela 6: Distribuição dos casos de AIDS e óbitos conhecidos por ano de diagnóstico.....	73
Tabela 7: Distribuição proporcional dos casos de AIDS, segundo sexo e idade.....	74
Tabela 8: Notificações de casos de AIDS recebidas no período de junho a agosto de 1999, segundo local de residência.....	75
Tabela 9: Distribuição das incidências (taxa por 100.000 habitantes), segundo municípios com maiores números de casos de AIDS e período de diagnóstico.....	76
Tabela 10: Proteínas do HIV e suas funções.....	77
Tabela 11: Co-receptores dos linfócitos CD4+ para infecção pelo HIV-1.....	78
Tabela 12: Efeito total das mutações CCR na progressão da doença do HIV...	78
Tabela 13: Produtos vacinais testados em fase I/II em voluntários não infectados pelo HIV.....	79

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Fragmentos amplificados.....	41
Figura 2: Restrição com EcoRI dos produtos do PCR.....	42
Figura 3: Distribuição do HIV/AIDS no mundo.....	80
Figura 4: Mapas genômicos dos vírus da Imunodeficiência humana 1 e 2.....	81
Figura 5: Representação esquemática de uma partícula viral do vírus da Imunodeficiência humana.....	81
Figura 6: Representação esquemática do processo de infecção, multiplicação e sobrevivência pelo HIV.....	82
Figura 7: Evolução das quantidades de células CD4 e de partículas virais em relação ao tempo decorrido desde a infecção, pelo HIV em humanos.....	82
Figura 8: Ligação da gp 120 com o receptor CD4, presente em linfócitos.....	83
Figura 9: Visão artística dos principais locais em que componentes do HIV podem se ligar na superfície de células-alvo.....	83
Figura 10: Fusão da partícula viral com a célula alvo, após a sua ligação com o CD4 e CCR5.....	84
Figura 11: CCR5 normal.....	84
Figura 12: CCR5 mutante.....	85

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1: Manifestações clínicas que caracterizam imunodeficiência moderada a grave, em pacientes com diagnóstico de infecção pelo HIV comprovado laboratorialmente.....	67
Quadro 2: Apresentação, posologia e interação com alimentos dos medicamentos antiretrovirais.....	68
Quadro 3: Esquema de combinações recomendadas para tratamento anti-retroviral.....	70
Quadro 4: Recomendações para o início da terapia-retroviral em indivíduos sintomáticos.....	71
Quadro 5: Desenvolvimento de produtos candidatos a vacinas.....	72

Figure 1: A schematic diagram of the experimental setup. The diagram shows a cross-section of a system with a central region of interest (ROI) and surrounding regions. The ROI is defined by a dashed line. The surrounding regions are labeled with various parameters and variables. The diagram is oriented vertically, with the top of the system at the top of the page.

RESUMO

Objetivo: Determinar a frequência do alelo recessivo ccr-5 em população de indivíduos infectados pelo HIV-1.

Material e Métodos: Foram estudados 187 pacientes, que freqüentam os ambulatórios da Disciplina de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Foram selecionados pacientes de ambos os sexos com testes positivos para o anti-HIV1 por ELISA e Western-Blot, em qualquer fase clínica da doença. Para amplificação foram utilizados os seguintes primers: 5'-CCTGGCTGTCGTCCATGCTG-3' e 5'-CTGATCTAGAGCCATGTGCACAACTCT-3'. Após a desnaturação a 94°C por 5min, seguiram-se 34 ciclos de: 94°C por 1min; 57°C por 1min; 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 7min. A seguir, foi realizada a digestão enzimática com 1µg de cada amostra, incubadas por 60min à 37°C com 10U de EcoRI. Foram também determinadas a carga viral pela técnica do NASBA e determinação de subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo (Ortho Diagn.).

Resultados e Conclusões: Do total de 187 indivíduos analisados, 15 apresentaram padrões de restrição do produto de PCR compatíveis com heterozigose para a deleção delta 32 (frequência=8,02%). Essa frequência é semelhante à encontrada em populações caucasianas européias. Com respeito à carga viral e quantidade de células CD4 e CD8, os dados foram prejudicados pela administração de medicação antiretroviral na maioria desses indivíduos. Todos os pacientes que apresentavam a mutação e que puderam ser classificados clinicamente possuíam estadiamento B2 ou maior.

[illegible]

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA DA DOENÇA:

1.1.1. Alguns fatos históricos

A AIDS, como é conhecida a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida foi reconhecida pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA) em 1979 (BONTEMPO, s.d.). Os primeiros casos da doença ocorreram em Los Angeles (Califórnia), envolvendo cinco jovens homossexuais ativos do sexo masculino, que chegaram a três diferentes hospitais locais, apresentando uma infecção rara: a pneumonia provocada por *Pneumocystis carinii*.

Esses casos foram registrados em 1981, por GOTTLIEB *et al*, do Departamento de Medicina da Universidade da Califórnia-Los Angeles (UCLA), através do Serviço de Epidemiologia do “Center for Disease Control” (CDC, Atlanta, Geórgia, USA) (LACAZ *et al*, 1990). Esses pacientes também apresentavam infecções concomitantes por Citomegalovírus e Cândida. Dois anos mais tarde, em 1983, trinta e cinco estados dos Estados Unidos da América (USA) já haviam notificado casos de AIDS. De acordo com LACAZ *et al* (1990), até julho de 1983, 1641 casos de AIDS já haviam sido registrados em Nova Iorque e São Francisco, com 644 óbitos atribuídos a essa síndrome.

No início desta, que se tornou uma pandemia, a maior parte das vítimas eram homossexuais de Nova Iorque e Califórnia. Logo, foram detectados casos em heterossexuais e usuários de drogas endovenosas. Passa, a seguir, a acometer também pacientes transfundidos com sangue ou derivados, como os hemofílicos (BONTEMPO, sd).

Verifica-se, assim, que as primeiras observações da AIDS falavam de uma nova síndrome de natureza infecciosa observada em guetos de homossexuais de São Francisco e, posteriormente, Nova Iorque, além de usuários de drogas e que viviam em promiscuidade (LACAZ *et al*, 1990).

Por isso, segundo PARKER *et al* (1994), antes da sigla AIDS, foi proposta a sigla GRID (Gay Related Immuno Deficiency), ou seja, imunodeficiência associada à homossexuais, tão forte era o vínculo entre a homossexualidade e a doença.

Segundo LACAZ *et al* (1990), essa nova síndrome ocorria sob a forma de uma pneumonia intersticial grave, provocada pelo *Pneumocystis carinii*, às vezes associada ao sarcoma de Kaposi, candidíase orofaríngea e infecção por citomegalovírus (CMV). Assim, conceituava-se a AIDS antes de se conhecer sua etiologia.

A denominação AIDS (“Acquired Immune Deficiency Syndrome”) parece ter sido proposta pela primeira vez por Donald Armstrong, chefe do serviço de doenças infecciosas do New York Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (LACAZ *et al*, 1990).

Outros países também comunicaram a ocorrência de casos semelhantes, tendo sido relatados ao CDC, 81 casos em dezesseis países no ano de 1983 (BONTEMPO, s.d.).

Era o início da epidemia mundial e, já em 1993, MANN *et al* no livro “A AIDS no mundo”, previa que a AIDS constituir-se-ia numa epidemia dinâmica e em evolução e que os principais efeitos estariam ainda por vir.

1.1.2 Epidemiologia

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) já relatava 14 milhões de casos de pacientes infectados pelo HIV e 2,5 milhões já com AIDS.

Dados da UNAIDS de 1999 assinalavam que mais de 33 milhões de pessoas em todo o mundo já estavam vivendo com o HIV, com ou sem AIDS.(figura 3)

Desde o início da pandemia já houve mais de 11 milhões de mortes atribuídas a ela. Devido à grande maioria das pessoas com HIV viverem em países em desenvolvimento, onde o acesso aos antiretrovirais é quase inexistente, os níveis de mortalidade não apresentarão qualquer declínio (CARAËL, SCHWARTLÄNDER, ZEWDIE, 1998).

De todas as regiões do mundo, a África subsaariana tem sido a mais atingida pelo HIV, tanto em números absolutos, quanto em coeficientes (CARAËL *et al*,1998). Nessa região, quase todos os indivíduos acometidos são heterossexuais. Surpreendente, foi a rápida expansão do HIV-1 e HIV-2 na Índia, onde há dez anos atrás, a infecção era raramente encontrada (LEVY, 1998).

Atualmente, cerca da metade dos casos de AIDS reportados nos EUA são de transmissão por homens homo ou bissexuais, seguidos dos usuários de drogas intra-venosas (26%) e contato heterossexual (12%) (LEVY, 1998).

Segundo PIOT & MERSON, 1995, a transmissão por transfusão de sangue contaminado ainda é relevante em alguns países subdesenvolvidos, principalmente na África subsaariana.

A propagação dentre os usuários de drogas injetáveis tem sido muito relevante em regiões da Ásia, América Latina e Caribe (MANN *et al*, 1993).

A transmissão materno-fetal durante a gravidez, parto ou amamentação é mais comum na África do que nos países da América do Norte e Europa (30-40% contra 15-20%, respectivamente), fazendo com que mais de 1 milhão de crianças africanas fossem infectadas desta forma. A imunodeficiência avançada, característica também dessas áreas contribui para esse fato (PIOT & MERSON, 1995).

Desde o início da pandemia, o Brasil ocupou um dos primeiros lugares na lista de países com maior número de casos de AIDS relatados à Organização Mundial de Saúde (PARKER *et al*, 1994). Em junho de 1985, o Brasil ocupava o terceiro lugar do mundo, com 340 casos (BONTEMPO,s.d.).

Em 1993, com 39.500 casos confirmados, a epidemia de AIDS se tornava um dos maiores problemas de saúde pública do país (PARKER *et al*, 1994). Segundo esse mesmo autor, até julho de 1993, 60% dos casos diagnosticados eram associados a alguma forma de contato sexual, 28,35% foram associados ao contato homossexual e 14,54% a bissexuais.

Em 1999, mais de 170 mil casos já haviam sido registrados pelo Ministério da Saúde e mais de 87 mil mortes atribuídas à síndrome. (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999a) (tabela 6)

Os primeiros casos de AIDS, ocasionados pelo uso de drogas injetáveis, apareceram em 1985, quando correspondiam a 3,1% do total (PARKER *et al*, 1994). Segundo MANN *et al* (1993), a participação desse grupo correspondia a 40% do total de casos no Rio de Janeiro, 54% em São Paulo e 57% em Santos. Ainda, segundo MANN *et al* (1993), a proporção de infecções pelo HIV, associadas à transmissão por usuários de drogas injetáveis aumentou mais de 10 vezes desde o início da década de 80 para a década de 90.

De acordo com PARKER *et al* (1994), em fins de 1987 houve a primeira pesquisa social sobre AIDS no país e o perfil epidemiológico predominante era homossexual/bissexual masculino.

No Brasil, como no resto do mundo, houve um importante deslocamento no perfil da doença no sentido de incluir, cada vez mais, a mulher de 15 a 40 anos e a criança de zero a cinco anos no rol de casos notificados. A proporção de casos entre homens e mulheres tem se estreitado, de 1:18 casos em 1985 para 1:5 casos em 1992 (PARKER *et al*, 1994).

Segundo o Ministério da Saúde, em 1999 já havia mais de 130 mil homens infectados e mais de 40 mil mulheres infectadas, observando que essa proporção se estreitou para aproximadamente 3:1 casos. (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999b) (tabela 7)

Em 1994, 46,5% dos casos registrados de infecção por HIV estavam concentrados nos municípios de São Paulo e Rio de Janeiro (PARKER *et al*, 1994). De acordo com esse autor, no estado de São Paulo, a maior incidência dos casos ocorre na faixa etária de 20 a 50 anos, na população econômica e sexualmente ativa e a via sexual continua sendo a principal via de transmissão, com 55,1% do total de casos notificados.

Em 1999, a incidência de casos no Rio de Janeiro e São Paulo aumentou ainda mais, representando mais que 50% do total de casos de AIDS notificados no Brasil. (BRASIL Ministério da Saúde, 1999 a). (tabela 8)

Dentre os hemofílicos e politransfundidos, houve uma diminuição de casos de infecção, consequência do maior controle do sangue destinado à transfusão no estado de São Paulo. Porém, a transmissão sanguínea tem crescido rapidamente, devido, principalmente, aos usuários de drogas injetáveis (PARKER *et al*, 1994).

Segundo PARKER *et al*, (1994), a transmissão vertical (de mãe para filho) também aumentou, em São Paulo, atingindo 2,4% dos casos notificados.

Em algumas cidades do interior do Estado de São Paulo, a principal via de transmissão é o uso de drogas endovenosas, diferente do resto do país onde há o predomínio da via sexual. As cidades com maior número de casos por essa via de transmissão são: São José do Rio Preto (54,5%), Ribeirão Preto (48,9%), Santos (43,8%), São Vicente (45,8%), Campinas (37,6%) e Santo André (33%). (PARKER *et al*, 1994).

De acordo com PARKER *et al*, em 1994, a cidade de Santos tinha a maior incidência de casos de infecção pelo HIV e AIDS de que se tinha notícia no país. Foi identificada pelos jornais e televisão, como a “capital da AIDS”, onde ocorre, principalmente, na zona de prostituição e tráfico de drogas próximas ao porto. Setenta e três por cento dos casos ocorrem na faixa etária entre 20 e 40 anos e há um predomínio da transmissão por drogas endovenosas.

Santos oferece um exemplo claro do aumento de casos de AIDS entre mulheres, que caracteriza a América Latina, com uma proporção entre homens e mulheres infectados de aproximadamente 3,5:1 (PARKER *et al*, 1994).

Em 1999, o Ministério da Saúde registrava a cidade de Itajaí em Santa Catarina como a maior incidência nacional, 926,4 casos por 100 mil habitantes e no estado de São Paulo a cidade de São José do Rio Preto é a que apresenta maior incidência de casos, 676,9 casos por 100 mil habitantes. (BRASIL Ministério da Saúde, 1999 a). (tabela 9)

A transmissão do HIV se faz através de forma sexual, sanguínea ou perinatal (MONTAGNIER, 1995). Sendo uma doença de transmissão sexual, a conduta do indivíduo é um determinante relevante na propagação do vírus (PIOT & MERSON, 1995). Essa forma de transmissão pode ser dar através de contato vaginal, anal ou oral. Nos países ocidentais, a

epidemia se disseminou, como mencionado, através de relações homossexuais, em que a prática de coito anal é freqüente. O dilaceramento das membranas mucosas do reto e do pênis coloca o sêmen, contendo o vírus, em contato com a corrente circulatória, onde encontrará células para se multiplicar (CAMARGO, 1994).

A transmissão heterossexual se dá em menor número do que entre homossexuais (CAMARGO, 1994). Entretanto, sendo as condutas sexuais muito heterogêneas entre as populações, os quadros são diversos. Por exemplo, em algumas sociedades o “status” social é associado a um elevado número de parceiras, como é o caso da África, onde os homens possuem variado número de mulheres e, desde o início da pandemia, a transmissão de HIV entre eles tem sido, predominantemente, heterossexual.

O principal modo de propagação do vírus, desde o início da epidemia, tem sido as atividades homo e bissexual, mas o uso de drogas injetáveis e as relações heterossexuais têm se tornado as principais vias de transmissão em muitos países, desde o final dos anos 80 (PIOT & MERSON, 1995).

A transmissão por sangue contaminado não é um problema nos países do primeiro mundo, mas o é para os países do terceiro mundo, onde hemofílicos e transfundidos correm o risco de se contaminar, já que a transfusão com sangue contaminado induz 90-100% de probabilidade de contrair a doença (CAMARGO, 1994)

Quanto aos consumidores de drogas injetáveis, o ato de se drogar em comunidade coloca em contato, através da seringa e agulha, o sangue dos participantes e essa forma de transmissão, tem sido uma das principais entre os homens e mulheres heterossexuais (CAMARGO, 1994). A propagação entre usuários de drogas injetáveis tem sido muito relevante em regiões da Ásia, América Latina e Caribe. (MANN *et al*, 1993).

A transmissão da mãe infectada para o filho recém-nascido (transmissão vertical) pode ocorrer durante a gravidez, o parto e o aleitamento. Sabe-se, que o vírus pode ser transmitido pela placenta e que o contato do sangue da mãe contaminada pode levar o vírus para as mucosas do recém-nascido durante o nascimento, infectando-o. Existem também casos de infecção pelo aleitamento (CAMARGO, 1994). Segundo PIOT & MERSON, 1995, a transmissão vertical é mais comum na África do que nos países da América do Norte e Europa.

Em meados da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu uma estrutura, que refletia a dinâmica da pandemia, em três grandes “padrões epidemiológicos”: o padrão I, associado aos países mais desenvolvidos, típico dos EUA e Europa ocidental, seria caracterizado por uma grande incidência de casos de AIDS entre homossexuais masculinos, baixa incidência entre mulheres e variável incidência entre usuários de drogas injetáveis; o padrão II descrevia, essencialmente, a situação da África, onde a taxa de homens e mulheres infectados era semelhante e tendo como a principal via de transmissão a heterossexual; o padrão III referia-se aos países com nenhuma ou baixa notificação de casos (atribuível ao contato com as regiões dos padrões I ou II) (PARKER *et al*, 1994).

Entretanto, segundo MANN *et al* (1993), logo as graves limitações desta classificação global ficaram aparentes, pois a classificação em padrões tornou-se uma realidade estática, enquanto a pandemia continuava a evoluir rapidamente. Em 1990, esse esquema caiu em desuso.

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO E PATOGENIA:

1.2.1. Como foi descoberto

A primeira indicação de que a AIDS poderia ser causada por um retrovírus (RNA) surgiu em 1983, quando BARRÉ-SINOUSSE *et al*, trabalhando com o virologista Luc Montagnier do Instituto Pasteur de Paris, demonstraram, em linfonodos de pacientes com AIDS, a presença de um retrovírus com efeito citopático, o qual denominaram vírus associado à linfadenopatia (LAV) (LACAZ *et al*, 1990).

Num trabalho concomitante, publicado por Roberto Gallo e colaboradores do Instituto Nacional do Câncer (NIH. Bethesda, EUA), um vírus idêntico foi isolado e denominado de Human T Lymphotropic Virus III (HTLV-III) (LACAZ *et al*, 1990).

Em 1980, GALLO *et al* haviam isolado o HTLV-I (vírus linfotrófico T humano do tipo I), que induz um câncer raro e maligno (leucemia adulta das células T) e, em 1981, isolaram o HTLV-II, que apresentava características biológicas e epidemiológicas semelhantes ao tipo I (CAMARGO, 1994).

Não foram encontradas diferenças fundamentais entre o LAV e o HTLV-III, havendo suspeitas de que ambos correspondessem a amostras do mesmo vírus, e que durante o isolamento tivesse havido um intercâmbio de amostras entre as instituições (CAMARGO, 1994).

LEVY e colaboradores também reportaram a identificação de uma retrovirose com o nome AIDS associated retroviruses (ARV). Essas viroses foram reconhecidas em pacientes com AIDS, de diferentes grupos de risco (LEVY, 1998).

Num curto espaço de tempo, os três protótipos das viroses (LAV, HTLV-III e ARV) foram reconhecidos como membros do mesmo grupo dos retrovírus e suas propriedades reconhecidas como as dos membros dos lentivírus. Porém, a virose da AIDS possuía muitas propriedades distintas do HTLV. Suas proteínas eram distintas e seu genoma apresentava apenas uma remota similaridade com os dos HTLV. Por esse motivo, em 1986, um subcomitê de especialistas em retrovírus humanos (International Committee on Taxonomy of Viruses) recomendou, que o vírus da AIDS recebesse o nome de Human Immunodeficiency Virus (HIV) (LEVY, 1998).

1.2.2. Como se classifica o HIV

O HIV é um retrovírus (RNA), que pertence à subfamília dos lentivírus. Eles são assim denominados pela lentidão com que são manifestados os efeitos da sua infecção no hospedeiro (CAMARGO, 1994).

Duas formas de HIV são descritas, sendo que o HIV-1 é mais freqüentemente encontrado que o HIV-2. Existem grandes diferenças de regulação do vírus ao nível genético. O genoma do HIV-2 é apenas 40-50% similar ao do HIV-1 e a manifestação da doença provocada pelo HIV-2 aparece mais lentamente que a do HIV-1 (STANLEY & FAUCI, 1995).(figura 4)

Além daquela provocada pelo HIV, existem outras retrovíroses humanas: o HTLV tipo I e o do tipo II, que causam um tipo de câncer raro (leucemia adulta das células T), além da paraparesia flácida tropical (CAMARGO, 1994).

As partículas virais do HIV possuem a forma de pequenas esferas. Segundo MONTAGNIER (1995), cada partícula viral possui cerca de 80 saliências arredondadas, que contêm várias moléculas da glicoproteína gp120, associadas às proteínas menores transmembrana, designadas gp41.

Os componentes internos do vírus constituem o nucleocapsídeo com 2 moléculas idênticas de RNA e proteínas, entre as quais a transcriptase reversa e proteínas internas de embalagem, das quais as principais são as p24 (ou p25), p18, p7 e p9 (MONTAGNIER, 1995).(figura 5)

O tamanho do genoma do HIV é de aproximadamente 9,8kb e codifica duas proteínas estruturais (Gag e Env), três enzimas (polimerase, integrase e protease) e seis genes acessórios, que ajudam na regulação da replicação viral (tat, vif, vpr, vpx), nef e rev). (tabela 10)

As proteínas internas são codificadas pelo gene Gag, que as sintetiza na forma de uma longa fita, que depois é recortada pela protease. (MONTAGNIER,1995)

As origens do HIV-1 e HIV-2 são desconhecidas. (LEVY, 1998). Algumas hipóteses foram levantadas e, segundo LACAZ *et al* (1990), uma hipótese é a de que a transmissão tenha se realizado através de reservatórios animais (como os símios) para o homem. De acordo com LEVY (1998), várias investigações favorecem a conclusão de que o HIV vem dos primatas, porém acredita que seja mais provável que o HIV já estava presente em pequenos habitats em partes da África (principalmente África Central) por séculos e que com mudanças sociais e econômicas recentes, ele começou a se espalhar e evoluir entre várias populações humanas. Ainda, segundo LEVY (1998), uma hipótese sugere que o HIV-1 e HIV-2 são derivados de um vírus progenitor que entrou em espécies de mamíferos há centenas de anos atrás.

1.2.3. Mecanismos de produção da doença

Na AIDS, ocorre um colapso das defesas imunológicas do hospedeiro, com o aparecimento de infecções oportunistas e até tumores (linfomas, Sarcoma de Kaposi e outras neoplasias) (LACAZ *et al*, 1990).

Segundo LEVY (1998), a patologia básica na AIDS é a perda dos linfócitos CD4+ e uma variedade de outras desordens na função imune.

A transmissão do vírus causador da síndrome (HIV1 ou HIV2) ocorre de pessoas portadoras, doentes ou sãs, para pessoas susceptíveis, por transferência de líquidos orgânicos, principalmente sangue e espermatozoides. O vírus entra nas células de defesa do organismo, determinando uma redução da sua capacidade de funcionamento e o doente fica, desta forma, sujeito a numerosas infecções e tumores malignos.

De acordo com CAMARGO (1994), a relação do sistema imune com o HIV é dupla e antagônica, pois esse sistema, que tem como função defender o homem de infecções, após a infecção pelo HIV, ele passa a servir de local para a multiplicação viral.

O HIV-1 infecta os linfócitos T, monócitos/macrófagos, células dendríticas e, no sistema nervoso, microglia, sendo que todas essas células expressam a glicoproteína CD4 (CHOE *et al*, 1996).

Na fase primária da infecção (fase assintomática) há uma elevada taxa de replicação viral que é refletida em poucos dias numa elevada carga viral (mais de 5000 partículas infecciosas/ml ou 10^7 moléculas de RNA viral/ml de plasma). Geralmente, em apenas algumas semanas, a viremia é reduzida substancialmente por uma provável resposta imune. Tanto no linfonodo, como no sangue, apenas uma pequena taxa de células infectadas produzem o vírus. Após 10 ou 14 dias, mais de 200 bilhões de células CD4+ poderão estar infectadas. Ocorre então, uma resposta imune com atividade antiviral das células CD8+. O número de células CD4+ decresce durante essa fase e 3-4 meses depois, usualmente volta ao normal. Durante o período assintomático, um pequeno decréscimo dessas células é observado (aproximadamente 60 células/ μ l/ano) e a replicação viral no organismo continua em baixos níveis, particularmente nos linfonodos. Quando a contagem de células CD4+ já é menor que 300/ μ l, inicia-se a fase sintomática, ou seja, a doença propriamente dita (LEVY, 1998).(figuras 6 e 7)

1.2.4. Como o HIV invade o organismo humano

Um passo crítico na infecção pelo HIV é a ligação da glicoproteína do envelope viral gp120 com o domínio amino-terminal da molécula CD4.(figura 8) Deste modo, a proteína CD4 age como receptor primário do HIV, portanto, as células que a expressam são os alvos primários da infecção. As células preferencialmente visadas pelo HIV são os linfócitos T4 e os macrófagos.

Segundo MONTAGNIER (1995), num linfócito há cerca de 50 mil receptores CD4 a que podem se fixar partículas virais ou capas vazias.

Depois que o vírus se prende à célula, as moléculas de gp120, associadas à proteínas menores transmembranas gp41, permitem a fusão da capa do vírus com a membrana celular e a passagem dos constituintes internos do vírus para o interior da célula.

Por muitos anos soube-se que o HIV-1 requer um co-receptor, em adição ao CD4 para infectar eficientemente as células alvo.(figura 9)

O receptor β quimoquina (CCR5) foi, recentemente, descoberto como sendo o maior co-receptor das células CD4 para cepas com tropismo para macrófagos (m-trópicas), desempenhando importante papel nos estágios precoces da transmissão sexual pelo HIV-1. (figura 10) A fusina (CXCR-4) foi descrita como sendo o co-receptor para as cepas com tropismo para os linfócitos T (t-trópicas).

Segundo MICHAEL *et al* (1998), as viroses capazes de infectar culturas de células T (T trópicas) induzem a formação de sincício (SI) e utilizam como co-receptor o CXCR4, enquanto as viroses com tropismo por macrófagos (m-trópicas) não induzem a formação de sincício (NSI) em linhagens de células T.

As quimoquinas pertencem a uma grande família de proteínas de baixo peso molecular, estruturalmente relacionadas, que desempenham papel na quimiotaxia, migração e ativação dos leucócitos, sendo assim proteínas regulatórias da inflamação.

De acordo com ROTTMAN *et al* (1997), existem duas famílias de quimoquinas conhecidas, cada qual designada pela presença ou ausência de um aminoácido separando o par cisteína da estrutura primária do peptídeo. Essas famílias são as CXC quimoquinas, que agem, primariamente, nos neutrófilos e incluem as IL-8 e GRO- α quimoquinas e a família CC-CK, que são as quimoquinas que agem, primariamente, nas células mononucleares e eosinófilos, como a proteína monócito quimioatrativa (MCP-1), RANTES e a eotaxina.

Os receptores de quimoquinas fazem parte da superfamília de receptores heterotriméricos GPCR, ligados à proteína G pareada, contendo 7 domínios transmembrana e 4 domínios extracelulares, sendo 1 domínio amino terminal e 3 alças (“loops”). (figura 11)

Os genes que codificam os receptores estão freqüentemente ligados e apresentam significativa homologia na seqüência de nucleotídeos.

Ainda que compartilhem 75% de homologia na seqüência de aminoácidos, CCR2b e CCR5 se ligam a diferentes tipos de ligantes como o MCP-1 e MCP-3 para o CCR2b; e RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β para o CCR5 (ROTTMAN *et al*, 1997).

A quimoquina CXC derivada de células do estroma fator 1 (SDF-1) é o único ligante natural conhecido do CXCR4. (MICHAEL *et al*, 1998)

Recentemente, demonstrou-se que os ligantes do CCR5, a saber: RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β são potenciais inibidores da infecção por HIV-1 *in vitro*, (ROTTMAN *et al*, 1997).

Segundo HOFFMAN & DOMS (1998), a descoberta dos ligantes naturais de quimoquinas como inibidores da infecção por viroses m-trópicas em PBMC *in vitro*, precedeu a descoberta do próprio CCR5 como co-receptor para o HIV-1.

COCCHI *et al* (1995) demonstraram, que as quimoquinas podem mediar efeitos antivirais e identificaram RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β como os maiores fatores supressivos de HIV produzidos por células T CD8+. Acredita-se que os linfócitos CD8 tenham função na contenção da infecção pelo HIV, particularmente na fase de latência clínica e nos “long-term nonprogressors”, tanto por mecanismos citolíticos, quanto por liberação de fatores supressivos de HIV.

Ainda, segundo COCCHI *et al* (1995), a atividade dos fatores supressivos liberados pelo CD8⁺ é resultado de efeitos combinados de RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β e o controle do HIV pelas quimoquinas pode ocorrer tanto diretamente, através da inerente atividade anti-lentiviral, ou indiretamente, através da habilidade de quimioatração de células T e monócitos, nas proximidades do foco de infecção.

De acordo com HOFFMAN & DOMS (1998), vários testes têm sido realizados e formas modificadas de RANTES têm demonstrado ser inibidores da infecção viral- CCR-5 dependente, mais potentes que o próprio RANTES. Dois derivados amino-terminais foram reportados como sendo antagonistas ao CCR5, porém, não induzem a quimiotaxia.

O primeiro domínio de ligação do receptor para todas as quimoquinas é uma pequena sequência próxima à região amino-terminal NH₂. Interações neste sítio ativam o receptor e o receptor antagonista é obtido pelo “truncamento” ou substituição dentro desta sequência. (BAGGIOLINI, 1997)

Foi ainda demonstrado que a região amino-terminal do CCR5 é o maior sítio de interação com o gp120, particularmente o resíduo negativamente alterado de ácido aspártico nas posições 2 e 11 e o resíduo de ácido glutâmico na posição 18. Uma segunda região importante para a entrada inclui as alças extracelulares. (DIMITROV, 1997)

Segundo HOFFMAN & DOMS (1998), a formação de um complexo trimolecular, que inclui o envelope viral, o CD4 e um receptor de quimoquina é, supostamente, o passo crítico no processo de fusão da membrana. Estudos prévios mostraram, que a alça V3 do receptor de quimoquina é o determinante primário do tropismo do HIV-1, sendo que uma simples mudança em algum aminoácido dessa região pode alterar o co-receptor a ser utilizado.

De acordo com DITTMAR *et al* (1997), anticorpos específicos neutralizantes para a alça V3 de isolados primários de HIV-1 inibem a interação do gp120 com o co-receptor CCR5.

O CCR5 também chamado de CKR5 ou CC é designado pelo símbolo gênico CMKBR5 e seu gene estrutural foi mapeado no cromossomo humano 3p21 (DEAN *et al*, 1996).

Estudos nesse co-receptor têm indicado que resíduos em todos os 4 domínios extracelulares contribuem para a função de co-receptor, com o domínio amino terminal e os alças extracelulares constituindo, até certo ponto, domínios distintos. As viroses com duplo tropismo parecem ser mais sensíveis do que as viroses m-trópicas às mudanças estruturais do CCR5, particularmente na região amino terminal (HOFFMAN & DOMS, 1998) e são, ainda, segundo DIMITROV (1997), mais sensíveis à inibição por RANTES nas linhagens CCR5⁺CD4⁺, enquanto que as linhagens m-trópicas necessitam de altas concentrações de RANTES para inibição. Isso significa, que quando o HIV se adapta para usar o CXCR4 tão bem quanto o CCR5, a interação com o CCR5 fica comprometida, tornando-se frágil e mais sensível às alterações na sequência do CCR5, tanto quanto pela inibição por quimoquinas.

ROTTMAN *et al* (1997), demonstraram que o CCR5 é expresso por pequenas subpopulações de linfócitos e monócitos/macrófagos, primariamente e, secundariamente, nos órgãos linfóides e tecidos não inflamados e, ainda, nos neurônios, “astrócitos”, microglia, epitélio, endotélio, musculatura vascular lisa e fibroblastos. Demonstraram também, que sítios de inflamação crônica têm aumentado o número de potenciais células alvo para infecção por HIV-1.

Apesar de múltiplas exposições ao HIV-1, alguns indivíduos se mantêm não infectados. Tal resistência foi, recentemente, associada a uma deleção de 32 pares de bases no gene do receptor de quimoquinas CCR5.

Tal deleção causa um “frame-shift” no aminoácido 185, o que provoca uma terminação prematura da transcrição. A proteína codificada por esse alelo mutante (delta32) não possui os últimos 3 segmentos transmembranas do receptor e não é detectada no citoplasma ou superfície celular. A região afetada corresponde à segunda alça extracelular do receptor.(figura 12)

Essa proteína “truncada” não é funcional, tanto como receptor de quimoquinas, quanto como co-receptor para o HIV-1.

SAMSON *et al* (1996), demonstraram que o alelo mutante *ccr5*-delta32 está presente em elevada frequência na população caucasiana (frequência alélica=0,092), mas é ausente nas populações negra da África central e oriental e entre os japoneses.

Confirmando esse estudo HUANG *et al* (1996), demonstraram uma frequência do alelo delta32 de 0,0808 na população predominantemente caucasiana, sendo 13,3% heterozigotos e 1,4% homozigotos e não encontraram evidências do delta32 nos descendentes de negros e asiáticos. Confirmaram também, que os indivíduos homozigotos para o delta32 são fortemente protegidos da aquisição sexual da infecção pelo HIV-1.

Segundo HOFFMAN & DOMS (1998), o elevado grau de resistência à infecção pelo HIV-1 exibida pelos indivíduos homozigotos delta32 confirma a importância do CCR5 para a transmissão viral, e é consistente com estudos prévios, que indicavam que os isolados virais obtidos após a soroconversão, quase sempre são m-trópicos.

Quanto ao heterozigoto para o alelo delta32, vários estudos mostraram que indivíduos com um só alelo mutante possuem apenas uma limitada proteção contra a infecção pelo HIV-1 e uma progressão mais lenta da doença.

A duração da latência clínica é amplamente variável, e a progressão para a AIDS ocorre dentro do período médio de 8 a 10 anos, porém, alguns indivíduos infectados permanecem saudáveis e sem alterações imunológicas por mais de uma década. Essa lenta, ou em alguns casos, não progressão para a doença foi associada em vários estudos ao heterozigoto para o alelo delta-32 e esses indivíduos são chamados de “long-term survivors”.

De acordo com HOFFMAN & DOMS (1998), a demora na progressão da doença exibida pelos heterozigotos pode ser devida aos baixos níveis de CCR5 na superfície celular, aumento da secreção de β -quimoquinas, ou ambos. E ainda, que é importante descobrir porque as viroses nestes indivíduos não se desenvolvem mais rapidamente para usar receptores alternativos, como o CXCR4.

MICHAEL *et al* (1997b) postularam, que o defeito do gene CCR5 reduz o risco de infecção nos soronegativos e prolonga a sobrevivência sem AIDS nos soropositivos com vírus NSI, mas não com vírus SI. Demonstraram, que a co-associação do genótipo heterozigoto deltaCCR5, com o fenótipo viral NSI é associada com a não progressão para doença pelo HIV-1. Contrariamente, o defeito do genótipo CCR5 em indivíduos com o vírus SI não é significativo.

Esses estudos recentes comprovam que o risco de se tornar infectado não depende só do vírus, como também da imunidade e fatores genéticos do hospedeiro, que também influenciam no padrão de progressão da doença.

KATZENSTEIN *et al* (1997) mostraram que nos primeiros sete anos da infecção há uma diferença estatística significativa em relação à progressão da SIDA, porém, depois de 11 ou mais anos não há diferença que possa ser detectada entre os heterozigotos para o delta 32 em relação aos homozigotos normais. Postularam com esse estudo que devido à presença de um alelo delta 32, há uma redução no número de co-receptores CCR5, o que leva a uma redução da infecção pelo HIV-1. Isso ficou comprovado com o baixo nível de carga viral medido no soro dos indivíduos heterozigotos. Postularam, ainda, que esse efeito de proteção pode ser perdido com o tempo, pois o vírus pode ser capaz de usar outros co-receptores além do CCR5 para se fundir e entrar nas células.

STEWART *et al* (1997), encontraram uma frequência aumentada do heterozigoto delta32 nos indivíduos LTNP (“long-term non-progressors”) e uma contagem de células CD8, significativamente, elevada nesses indivíduos em relação aos indivíduos sem a mutação (1218 contra $972 \times 10^6 /l$). Porém, não encontraram correlação significativa entre a heterozigoze e a contagem de CD4, carga viral, antígeno p24 e β_2 microglobulina no grupo LTNP. Sugerem que a produção dos ligantes (RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) em combinação com a redução da expressão/função do CCR5 nos heterozigotos pode favorecer a redução da progressão da infecção, enquanto predominarem as linhagens m-trópicas.

É sabido que nos estágios iniciais da infecção o HIV-1 se utiliza do CCR5 como co-receptor, porém, durante o curso da doença o que se observa é a prevalência das linhagens que se utilizam do CXCR4 (fusina). KATZENSTEIN *et al* (1997), postularam

que é possível que ocorra uma pressão seletiva favorecendo as linhagens T-trópicas, mais forte nos pacientes heterozigotos em relação aos homozigotos selvagens (normais) e que uma mudança mais rápida dos vírus M-trópicos para T-trópicos nos pacientes heterozigotos, pode neutralizar parcialmente o efeito benéfico da baixa replicação viral nos estágios precoces da infecção.

Confirmando a hipótese de que o HIV-1 se utiliza de outros co-receptores além do CCR5, CONNOR *et al* (1997), encontraram que, em pacientes com a doença progredida, o vírus expande seus co-receptores incluindo CCR3, CCR2 e a fusina e que o surgimento de variantes utilizando a fusina como co-receptor está associado ao “interruptor” do fenótipo NSI para SI, perda de sensibilidade às quimoquinas e decréscimo na contagem de CD4⁺.

De fato, foi demonstrado em um pequeno número de isolados virais de pacientes, que as bases moleculares para mudança no tropismo viral foi a alteração no uso dos co-receptores CCR5 para o CXCR4 e que essa mudança correlaciona-se com a progressão da doença (HOFFMAN & DOMS, 1998).

Isso sugere que o HIV-1 evolui durante o curso da infecção para usar uma variedade de co-receptores e que esta adaptação está associada à progressão para a doença propriamente dita (AIDS).

DITTMAR *et al* (1997), mostraram que a pressão seletiva no HIV-1 para o escape imune da neutralização pode resultar no ganho do uso de co-receptores. Contrariamente, a seleção para usar esses novos co-receptores pode resultar no escape dos anticorpos neutralizantes, já que o vírus coloniza vários tipos celulares, *in vivo*, durante a progressão para AIDS.

Recentemente, vários outros variantes alélicos de receptores de quimoquinas, que afetam a patogênese do HIV-1 têm sido descritos. (tabela 11)

QUILLEN *et al* (1998), encontraram uma mutação de ponto (T→A) na posição 303 do gene CCR5, que introduz um codon-stop prematuro, produzindo uma proteína truncada sem qualquer expressão como co-receptor funcional. O alelo M303 é um variante muito raro (frequência alélica <1%) (MCDERMOTT *et al*, 1998). Porém, segundo

QUILLET *et al* (1998), a combinação de 2 alterações distintas (CCR5delta32/m303) confere um fenótipo resistente à infecção ao HIV-1 *in vitro*, que é indistinta da homozigoze delta32. Concluem, que a homozigoze M303 e sua associação com o alelo deletado delta32 podem somar para os casos inexplicados de resistência ao HIV-1 em indivíduos com um aparente genótipo selvagem CCR5 ou um traço heterozigoto delta32.

Recentemente, 3 sítios genéticos distintos, com pequena distância no cromossomo 3p21 (CCR2, CCR5P, CCR5), mais o SDF1 no cromossomo 10q11 foram identificados, codificando alelos comuns, que independentemente, delimitam ou aumentam a razão da progressão para AIDS entre os HIV-1 infectados.(MARTIN *et al*, 1998b). Um alelo variante do co-receptor CCR2 para o HIV-1 (CCR2-64I ou 46295G/A - frequência alélica de, aproximadamente, 10%) é associado com a diminuição na progressão para AIDS em heterozigotos. O CCR2-64I está ligado à uma mudança de base no promotor do CCR5, porém, ainda não se sabe a sua importância funcional (MCDERMOTT *et al*, 1998).

O polimorfismo do receptor de quimoquina CCR2b é uma mutação de ponto conservativa, resultando em uma substituição de uma valina por uma isoleucina na região do primeiro domínio transmembrana. Diferente do efeito diferencial do fenótipo viral no delta-32 para progressão da doença, nenhuma associação estatística significativa do fenótipo viral foi observada para o CCR2b-64I. Em um outro estudo, o CCR2b-64I foi associado a uma diminuição na progressão da doença, mas não reduz o risco de infecção. Porém, MICHAEL, LOUIE, ROHRBAUGH, *et al* (1997), concluíram em seu estudo que o polimorfismo CCR2b-64I não se associa com a diminuição na progressão para a doença.

Enfatizando a função do CCR5 como maior co-receptor para o HIV-1, HENDEL *et al* (1998) encontraram uma prevalência elevada dos alelos mutantes entre os soropositivos assintomáticos por mais de 8 anos ("slow-progressors") para o CCR5 ($p<0,0001$), mas não para o CCR2 ($p=0,09$) ou para o SDF1 ($p=0,12$). Encontraram uma prevalência do alelo mutante CCR2 significativamente aumentada entre os homozigotos "slow-progressors" para o tipo selvagem CCR5, quando comparados com os soropositivos com contagem de CD₄ $<300/\text{mm}^3$ ("fast-progressors"). Concluíram que o efeito do CCR2-64I não é adicional ao efeito do CCR5-delta 32, porque não foi observado nos indivíduos heterozigotos delta32. Nenhum efeito significativo foi encontrado para o heterozigoto mutante SDF1 entre os

indivíduos “slowprogressors”. Porém, um efeito no controle da progressão da doença foi encontrado para os homozigotos SDF1-3'A/3'A nos indivíduos CCR5 +/+. Os efeitos do CCR2 e SDF1 foram observados apenas entre os homozigotos tipo selvagem CCR5, sugerindo que seus efeitos sejam mascarados pela função predominante do alelo CCR5 delta32. Como para o CCR5, seus efeitos também acontecem nos primeiros anos de infecção (HENDEL *et al*, 1998).

Um outro alelo, variante da quimoquina SDF-1 (ligante do CXCR4) afeta a progressão para AIDS em indivíduos homozigotos. A alteração neste alelo é uma simples mudança de base na região não traduzida 3' do RNAm SDF-1 (SDF1-3'A). Um possível mecanismo de ação pode envolver um aumento na produção de SDF-1, guiando para um bloqueio do CXCR4. (MCDERMOTT *et al*, 1998)

A região do promotor CCR5 foi caracterizada e a transcrição é regulada por dois domínios, com o mais forte localizado na região que inclui o intron1, o exon2 e parte do exon3. Quatro alelos variantes comuns foram detectados por HPLC, CCR5P1-P4 e 6 alelos raros, CCR5P5-P10, por SSCP. O sequenciamento da região promotora do CCR5 de indivíduos homozigotos para os variantes P1-P4 e heterozigotos para os variantes raros, revelou 10 posições polimórficas de nucleotídeos (MARTIN *et al*, 1998b).

O CCR5P1 representa o primeiro variante alélico, que acelera a progressão para AIDS, e a frequência do genótipo CCR5P1/P1 é de 12,7% em caucasianos e 6,7% em afro-americanos. (MARTIN *et al*, 1998b)

Análises compostas genético-epidemiológica dos genótipos que carregam CCR5P1, CCR5delta32, CCR2-64I e SDF1-3'A, confirmaram a influência regulatória distinta de cada gene na progressão para AIDS (MARTIN *et al*, 1998b).

Como os dois alelos protetores são dominantes e, invariavelmente, carregados no haplótipo alternativo CCR5P1, (64I.P1.+) e (+.P1.delta 32), um aumento na frequência na proteção do heterozigoto nos slow/nonprogressors sugere que os alelos protetores dominantes tem efeito mais forte do que o alelo cis-associado do promotor CCR5P1, ao menos nos heterozigotos. O cancelamento da aceleração para AIDS do P1/P1 pelo genótipo

protetor CCR5/CCR2 implica que os 2 efeitos são brutalmente equivalentes em promover ou impedir a patogênese da AIDS, respectivamente. Quando o homozigoto CCR5P1/P1 ocorre em indivíduos que são heterozigotos para proteção (2-64I/5-delta32), seus efeitos são balanceados, particularmente nos anos tardios após a soroconversão (7-20 anos), porque os efeitos não são significativamente diferentes em pacientes que sobrevivem à AIDS por longos períodos. (MARTIN *et al*, 1998b)

KOSTRIKIS *et al* (1998), descreveram uma variante na posição 927 do intron2 do gene CCR5 (CCR5P-927), que está ligado em desequilíbrio (“linkage disequilibrium”) com o variante protetor CCR2-64I. Verificaram que todos com o haplótipo (64I.P1.+) continham o tipo CCR5P-927T, confirmando a forte associação de ligação em desequilíbrio dos 2 sítios.(variante 927 - T substituindo C). Esses dados afirmam a associação do CCR2-64I e CCR5-927, porém não sustentam, nem refutam a idéia que o CCR5-927T explique adequadamente a proteção do CCR2-64I (MARTIN *et al*, 1998b).

MCDERMOTT *et al* (1998), descreveram um polimorfismo A/G, comum no par de base 59029 no promotor do CCR5, que afeta a razão da progressão para AIDS em homossexuais infectados. Num grupo de soroconvertidos deficientes tanto para o CCR5-delta 32 quanto para o CCR2-64I, os indivíduos 59029-G/G progrediram para AIDS, numa média de 3-8 anos, mais devagar que os indivíduos 59029-A/A ($p=0,004$). Em discordância, 59029-G/A não se relaciona com índices contraditórios de infecção. Diferente do delta32-CCR5, que só é encontrado em brancos, tanto o 59029-G quanto o 59029-A são encontrados em altas frequências em todos grupos raciais testados. E os dados mostraram, que o efeito de proteção do 59029-G relativo ao 59029-A é independente de qualquer proteção conferida por CCR5-delta32 e CCR2-64I.(tabela 12)

Segundo DIMITROV (1997) os peptídeos da região N terminal do CXCR4 em altas concentrações, podem inibir a infecção. Um derivado peptídico com 9 resíduos (ALX) inibe a infecção pelo HIV-1 em relativa baixa concentração, pela interação com as alças extracelulares 1 e 2 do CXCR4. Essa região é a mesma com atividade de co-receptor para o HIV-1. Ainda que esta molécula (ALX) não iniba a entrada mediada pelo CCR5, isto é importante para provar que os co-receptores podem ser alvos de pequenas moléculas

inibitórias da infecção pelo HIV-1 e que, nos estágios tardios da doença, quando predomina o uso do CXCR4, pode ser usado como inibidor, em adição às outras drogas.

MARTIN *et al* (1998a), reportaram que uma mudança silenciosa C→T na isoleucina 261 é o único polimorfismo encontrado no CXCR4, além de ser raro (frequência alélica=0,0075). O gene CXCR4 contém 2 exons, interrompidos por um intron de 2132 bp entre os codons 5 e 6 da sequência codificadora. Postularam, que o CXCR4 é mais crítico à fisiologia normal do que o CCR5, pois este possui uma distribuição de expressão mais limitada (2 dos 3 ligantes do CCR5 interagem com outros receptores de quimoquinas, enquanto uma relação única existe entre o CXCR4 e o SDF1). Essa interação mais rígida entre estrutura/função pode predizer um aumento de toxicidade clínica para terapia com drogas, guiado pelo CXCR4 em oposição ao CCR5.

Segundo DIMITROV (1997), o número de co-receptores usados pelo HIV e/ou SIV agora são dez: CCR5, CXCR4, CCR3, CCR2b, STRL33, GPR15, GPR1, V28, CCR8, US28.

Uma interessante possibilidade é que alguns co-fatores para entrada do HIV-1 podem não ser proteínas, mas glicolipídeos. Um glicolipídeo neutro, possivelmente, com 3 grupos de açúcar na cabeça polar, pode servir como um co-fator alternativo e/ou adicional na fusão do HIV-1-CD4 dependente. Isso dá uma nova dimensão na habilidade do HIV-1 em usar uma variedade de moléculas como co-receptores.

Confirmando essa possibilidade, HOFFMAN & DOMS (1998) colocam que uma descoberta interessante foi a de que algumas viroses podem utilizar os receptores de quimoquinas na ausência do CD₄. Algumas linhagens de HIV-1, HIV-2 e do vírus da imunodeficiência felina (FIV), adaptadas em laboratório têm demonstrado utilizar o CXCR4 num mecanismo independente da via CD₄.

Desta forma, de acordo com DIMITROV (1997), torna-se visível que na evolução do HIV, os co-receptores podem ter inicialmente servido como receptores, e o uso do CD₄ é uma adaptação mais recente, como sugerido por R. Weiss.

Todos esses estudos vêm confirmar a natureza multifatorial e complexa da patogênese da infecção pelo HIV-1.

1.2.5. Como evolui a doença

Após a entrada do vírus e perda de sua capa, que permanece no exterior, a transcriptase reversa transcreve o RNA viral em uma fita dupla de DNA. Nesse momento o DNA viral (provírus) migra para o núcleo celular para se inserir nos genes da célula hospedeira.

Segundo MONTAGNIER (1995), para que o HIV possa integrar seu provírus nos cromossomos dos linfócitos T4 é preciso que estes estejam ativados. Assim, se o linfócito estiver ativado, por um antígeno específico, a integração do provírus pode ocorrer e sua expressão em RNA e proteínas virais é possível. Uma vez inserido nos genes da célula hospedeira, o provírus pode entrar numa fase de latência.

Segundo CAMARGO (1994), a característica do HIV de se manter em estado de latência por longos períodos favorece o seu escape do sistema imunológico do hospedeiro.

Eventualmente, esses provírus podem se desprender dos outros genes e passar a comandar os mecanismos celulares e, uma vez completa a partícula viral, esta emerge do citoplasma da célula para o exterior, através de um processo de gemulação lenta, sem destruir a célula hospedeira, ou através de um processo mais rápido, levando à lise da célula (CAMARGO, 1994).

De acordo com MONTAGNIER (1995), se o linfócito estiver numa fase de ativação favorável, o vírus não leva mais de algumas horas para realizar todo esse processo. Segundo dados de PERELSON *et al* (1996), a média estimada da produção do HIV-1 total é de $10,3 \times 10^9$ virions por dia.

Depois de instalado no organismo humano, o vírus da AIDS passa por várias etapas. Na primeira fase, o vírus se replica rapidamente. Após algumas semanas, desaparecem os sintomas e diminui o número de partículas virais nos fluídos sanguíneos. Os vírus vão se alojar no interior das células T, macrófagos, células do sistema nervoso, intestino e medula óssea. Após um período de tempo variável, ocorre enfartamento dos gânglios linfáticos, provocado pelo estímulo constante do antígeno viral, seguido de uma diminuição do número de linfócitos T4 na corrente circulatória. (CAMARGO, 1994)

Os macrófagos são capazes de fagocitar, processar e apresentar antígenos para os linfócitos T e B. Quando não ativados são chamados de monócitos. Segundo MONTAGNIER (1995), os monócitos são os primeiros a migrar ao local da infecção para enfrentar o intruso. Transformam-se em grandes células aderentes, os macrófagos, capazes de realizar fagocitose. Por absorção e, depois, digestão, os macrófagos tentam destruir as células infectadas. O problema no caso do HIV, é que este consegue se replicar igualmente dentro dos macrófagos e, quanto mais estes se multiplicam para digeri-lo, mais ele se desenvolve.

De acordo com STANLEY & FAUCI (1995), a gemulação a partir de um macrófago pode ocorrer tanto na membrana celular, quanto intracelularmente dentro de organelas. Esse brotamento intracelular do vírus pode permitir ao macrófago infectado que escape do reconhecimento pelo sistema imune. Ainda, ao contrário do que ocorre com os linfócitos T4, a infecção dos macrófagos pode ocorrer eficientemente em populações não proliferativas. Esses aspectos da infecção dos macrófagos sugerem que essas células podem servir como importante reserva para o HIV. Realmente, dados de WEI *et al* (1995) mostram que os tecidos linforeticulares servem de reserva primária e lugar para replicação do HIV-1.

1.3. TRATAMENTO

1.3.1 O uso de antiretrovirais

O objetivo principal da terapia anti-retroviral é retardar a progressão da imunodeficiência, aumentando o tempo e a qualidade de vida do indivíduo infectado (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999c).

Inicialmente, as terapias antivirais contaram com o uso do AZT e outros inibidores simples de transcriptase reversa (RT). Nos últimos 3-5 anos, vários análogos nucleosídeos, que competem com a transcriptase reversa (RT) viral foram introduzidos no tratamento. Como o AZT, muitos precisam ser ativados por fosforilação intracelular (LEVY, 1998).

Devido aos efeitos antivirais das monoterapias com inibidores de RT serem limitadas, o uso de duas ou três drogas foram iniciadas. Em geral, a adição de um análogo nucleosídeo aumenta a eficácia do tratamento. (LEVY, 1998)

Os inibidores de protease deram um maior auxílio no manejo da infecção pelo HIV. Essencialmente, a adição dos inibidores de proteases às drogas, com diferentes efeitos antivirais, comandou resultados promissores no controle persistente da replicação do HIV e restauração do curso clínico assintomático. (LEVY, 1998)

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999c), o início da terapia está indicado para todo paciente com manifestações clínicas associadas ao HIV, independentemente da contagem de linfócitos T-CD4+ e da carga viral. (Quadro 1).

O maior efeito nos níveis de cópias virais veio com o uso da terapia com 3 drogas associadas, no qual duas delas anti RT e uma inibidora da protease.

Atualmente, existe uma série de inibidores de proteases e de RT avaliados. (Quadro 2)

Um grande problema para a terapia antiviral é a resistência às drogas, o que tem sido visto em muitos tratamentos. A resistência cruzada aos inibidores de protease é muito observada (LEVY, 1998).

Algumas vezes, as terapias antivirais podem comprometer a função do sistema imune. Alguns estudos sugerem, que a terapia com AZT reduz a proliferação celular e pode ser tóxica para o sistema imune. O AZT e o 3TC interferem na proliferação das células T. Entretanto, em várias situações, há uma melhoria da imunidade mediada por células e uma redução da ativação imune. (LEVY, 1998)

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999c), a decisão quanto ao esquema a ser utilizado na terapia inicial deve ser feita de forma individualizada, baseando-se nos parâmetros clínicos, laboratoriais e farmacológicos das drogas anti-retrovirais disponíveis. A terapia inicial deve ser composta por, pelo menos, 2 inibidores da transcriptase reversa - análogos de nucleosídeo, podendo-se associar um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo ou um inibidor da protease viral em situações específicas. A monoterapia é considerada um tratamento inadequado, e não deve ser utilizada. O uso isolado da zidovudina é aceitável apenas para mulheres grávidas, como quimioprofilaxia da transmissão mãe-filho, quando não houver outra indicação de terapia anti-retroviral.(Quadros 3 e 4)

Vários estudos têm sido realizados para encontrar modalidades terapêuticas que ataquem o vírus ou as células infectadas por ele. Desde que se soube que algumas citocinas afetam a progressão da doença e a infecção do HIV, algumas manipulações desses produtos celulares têm sido consideradas. Alguns estudos sugerem, que o IL-2 em combinação com o α interferon (IFN- α) pode, transitoriamente, aumentar o número de células T CD4+ e reduzir a replicação viral in vivo (LEVY, 1998).

As terapias baseadas no sistema imune encorajam o uso de citocinas, que podem restaurar a imunidade mediada por células ou guiar o decréscimo dos efeitos tóxicos dos produtos celulares, como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (LEVY, 1998).

Imagina-se como uma situação ótima de controle da infecção, a administração de drogas antivirais juntamente com a terapia com citocinas, como feito em alguns protocolos anticâncer (LEVY, 1998).

A imunoterapia passiva e caminhos antivirais baseados em anticorpos são outra alternativa no tratamento da infecção pelo HIV, mas ainda não mostraram nenhum efeito benéfico consistente (LEVY, 1998).

1.3.2. Perspectivas

No desenvolvimento de vacinas, várias características da infecção pelo HIV e transmissão devem ser consideradas. Os maiores desafios no desenvolvimento de vacinas incluem a heterogeneidade viral, a necessidade de imunidade local da mucosa, as potenciais respostas auto-imunes e a transmissão viral por células infectadas (LEVY, 1998).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999d), a vacina ideal deverá estimular respostas imunológicas capazes de bloquear a infecção por via sexual, intravenosa e a transmissão materno-fetal, e ainda deverá ser capaz não só de produzir anticorpos capazes de neutralizar partículas virais livres mas também respostas imunológicas celulares, capazes de destruir células infectadas, e ainda é provável que sejam necessárias diversas vacinas (ou verdadeiros “coquetéis”) para lidar com os vários subtipos do HIV prevalentes nos diversos países afetados pela epidemia.

Um outro grande problema é a busca do modelo animal apropriado. Estudos com SIV e a utilização do macaco como modelo experimental tem sido úteis no estudo de vacinas com lentivírus.

Dois modelos de primatas têm sido os mais amplamente utilizados: a) Em macacos *Rhesus*, os protocolos vacinais têm sido feitos utilizando-se o SIV (vírus da imunodeficiência símia), porém com exceção daqueles que empregam vírus atenuado por deleção gênica, os resultados têm sido pouco estimulantes em relação à imunidade e subsequente proteção; b) Em chimpanzés, os estudos se mostram mais promissores, tendo-se observado alguma proteção em alguns protocolos vacinais. (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999d)

Como exemplos de suposta proteção contra a infecção por HIV ou SIV temos: chimpanzés imunizados com gp120 recombinante e infectados com isolados primários ou laboratoriais de HIV-1. macacos protegidos contra HIV-2 ou SIV através de variados caminhos de vacinas. macacos vacinados com SIV vivo atenuado (deletado-nef). macacos expostos à baixa dose de inoculação retal de SIV. macacos e babuínos infectados com SIV ou HIV-2 atenuados protegidos de superinfecção por linhagens patogênicas e indivíduos soronegativos com exposições múltiplas ao HIV (LEVY, 1998).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999d), os produtos candidatos a vacinas estão sendo desenvolvidos e avaliados com três finalidades: a) vacinas preventivas: para impedir a infecção pelo HIV (imunidade esterilizante) ou prevenir a evolução para AIDS (imunidade parcial); b) vacinas terapêuticas ou imunoterapia ativa: para impedir ou retardar a progressão da doença, diminuir a carga viral em pessoas infectadas pelo HIV e reduzir a transmissão da infecção pelo HIV de pessoas infectadas para seus contatos; c) vacinas perinatais: para impedir a progressão da doença em gestantes infectadas e a transmissão da infecção viral à criança.

Essencialmente, 9 tipos de vacinas para prevenção da infecção tem sido exploradas: vírus mortos (naturais ou construídos), variantes vivos atenuados (naturais ou construídos), vacinas de subunidades (glicoproteínas de envelope gp 120, gp160 e gp41), proteínas gag- oligomerização (naturais ou construídas), proteínas virais em vetores vivos (p.ex.: vírus vaccinia, poliovírus, vírus herpes simplex, adenovírus, baculovírus, partícula Ty e variadas bactérias), núcleos virais com envelopes protéicos (pseudovirions e partículas parecidas com vírus-VLPs), peptídeos sequenciais derivados do HIV (p.ex.: epitopos V3, epitopos CTL/Th), anti idiotipos de anticorpos neutralizantes, transferência de DNA gênico e, por último, proteínas derivadas de plantas (LEVY, 1998).

Por causa da natureza intracelular do HIV, a resposta imune mediada por células aparece sendo o mecanismo mais importante para o controle e prevenção da infecção. Assim, os efeitos benéficos das vacinas, podem ser aumentados através da co-administração de citocinas, que podem influenciar a resposta imune. (LEVY, 1998)

Em relação às vacinas terapêuticas, resultados preliminares de testes iniciais utilizando como produto vacinal o vírus inativado e deletado da glicoproteína viral gp120 (REMUNE) em pessoas infectadas pelo HIV mostraram ampliação da resposta imunitária ao vírus com estabilização e até aumento do número de linfócitos CD4+ nos recipientes da vacina.(BRASIL. Ministério da Saúde, 1999d)

Todas as vacinas necessitam de co-adjuvantes apropriados, que possam aumentar, seletivamente, a imunidade mediada por células ou humoral. A vacina ideal é aquela que, sem toxicidade, seja capaz de induzir a neutralização sem aumentar os

anticorpos e que possa produzir respostas imunes salientes nos sítios de mucosas, tanto quanto no sangue (LEVY, 1998).

Por esse motivo, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999d), antes que um produto candidato à vacina anti-HIV seja avaliado em seres humanos, são realizados testes em pequenos animais e, posteriormente, em primatas não-humanos. Se os produtos se mostrarem seguros e capazes de estimular o sistema imunológico, podem então entrar na fase humana de ensaios clínicos. No quadro 5 pode-se observar um resumo do desenvolvimento de ensaios clínicos com produtos candidatos a vacinas.

Apesar de todas as dificuldades, há um otimismo na comunidade científica em relação à possibilidade de se desenvolver uma ou mais vacinas com eficácia variada contra o HIV.

A tabela 13 lista os tipos de vacinas experimentais anti-HIV que foram ou estão sendo testadas.

Os presentes testes com vacinas realizados em várias partes do mundo devem oferecer informações importantes ao longo dos próximos anos (LEVY, 1998).

2. OBJETIVO

Determinar a frequência do alelo mutante delta32 do gene *ccr5* em uma população de indivíduos portadores de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

10

11

12

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO:

A população de estudo foi constituída dos indivíduos que freqüentam os ambulatórios de HIV-AIDS da Disciplina de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

3.1.1. Critérios de seleção:

Foram selecionados indivíduos de ambos os sexos e que possuíam o diagnóstico de infecção pelo HIV através do ELISA e confirmados por "Western Blot". Não foi considerada a fase da doença para fins de inclusão no grupo.

3.2. MÉTODOS LABORATORIAIS:

3.2.1. Caracterização genômica:

A. Coleta do sangue:

A coleta de sangue foi realizada no ambulatório de coleta do HC-UNICAMP. O sangue (5ml) foi recolhido em frasco de vidro à vácuo contendo EDTA, como anticoagulante.

B. Extração do DNA:

O DNA foi extraído utilizando-se o DNA E-Z Isolation Kit (Lifecodes Corporation). Em resumo, uma alíquota de 0,25-0,50ml de sangue total foi submetida a um tampão de lise celular e, em seguida, a um tampão de lise protéica. À seguir, a amostra foi tratada com uma mistura de proteinase K/SDS/tampão de lise celular, para remoção das proteínas e nucleases livres. Então, foi adicionada à amostra os sais condicionantes (incluindo o LiCl), seguido do tratamento com etanol 100% e 70%, para precipitação e hidratação do DNA, respectivamente. A amostra foi ressuspensa com água (milli-Q).

Conteúdo dos reagentes: tampão de lise celular- contém sucrose, cloreto de magnésio e TritonX-100 em tampão Tris; tampão de lise protéica- contém EDTA sódio e cloreto de sódio em tampão Tris; proteinase K- contém proteinase K em tampão Tris e o conditioning salt- contém cloreto de lítio.

C. Amplificação e digestão enzimática:

Amplificação – A região correspondente ao CCR-5 foi amplificada utilizando os iniciadores (“primers”), descritos por SAMSON *et al* (1996).

5’–CCTGGCTGTCGTC CATGCTG–3’e

5’–CTGATCTAGAGCCATGTGCACAACTCT– 3’

A mistura para a reação do PCR foi a seguinte: 1,5µg DNA; 2mM MgCl₂; 0,25mM DNTP mix; 50 ng de cada primer; 2U taq.

As condições do ciclo do PCR foram as seguintes: 94°C por 5min (1 ciclo); 94°C por 1min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min (34 ciclos); 72°C por 7 min (1 ciclo).

Os produtos do PCR foram detectados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE. A visualização foi realizada com impregnação por brometo de etídio sob luz ultra-violeta (UV).

Digestão enzimática - Após a reação de PCR, 10µl de cada amostra foi incubada por 60 min à 37°C, com 10U de EcoRI.

Os produtos da digestão enzimática foram detectados em gel de agarose 2,0% em tampão TBE e a visualização foi realizada com impregnação por brometo de etídio sob luz UV. Os resultados foram comparados com os descritos por SAMSON *et al* (1996).

3.2.2. Determinação da carga viral:

A quantificação da carga viral foi realizada utilizando o sistema Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA).

O NASBA é um teste de amplificação isotérmica de ácido nucléico para determinação quantitativa de RNA de HIV-1 em plasma ou soro humanos (BRASIL- Ministério da Saúde, 1998).

O teste foi realizado em 4 etapas:

1. liberação do ácido nucléico- para cada amostra de 1ml de soro ou plasma, foi adicionado 9 ml de tampão de lise, contendo tiocianato de guanidina e detergente Triton x 100. (O ácido nucléico é liberado);

2. isolamento do ácido nucléico- ao tampão de lise foram adicionadas partículas de sílica e 3 controladores, que são amostras de RNA sintético, com concentrações alta, média e baixa (Qa, Qb, Qc). Essas amostras de RNA são controles internos e diferem do HIV-1 apenas por uma pequena seqüência. Essas partículas foram lavadas várias vezes (o ácido nucléico está ligado às partículas de dióxido de sílica) e em seguida, eluídas.

3. amplificação- a amplificação das amostras ocorrem ao mesmo tempo, que a dos 3 calibradores. A cada amostra foi adicionado uma solução de primer (primer liofilizado+diluyente). Depois de incubar a 65°C, as amostras foram incubadas à 41°C. Foi então, adicionada uma solução de enzimas (enzima liofilizada+diluyente) e incubada novamente, à 41°C.

4. detecção-alíquotas de cada amostra amplificada foram adicionadas a 4 tubos. Cada tubo continha uma sonda específica, marcada com rutênio para um dos RNAs (WT- wild type, Qa, Qb ou Qc). A solução de hibridização de todos os tubos possuía uma sonda genérica ligada a esferas magnéticas através do complexo estreptoavidina-biotina. A detecção foi então realizada no Sistema NASBA QR. A detecção baseia-se no princípio de eletroquimioluminescência do Sistema. O computador traça uma curva padrão, utilizando os 3 calibradores e, à partir dessa curva, é calculada a concentração do RNA (WT) e o resultado é fornecido em cópias/ml.

3.2.3. Determinação de subpopulações linfocitárias:

Para a determinação das subpopulações linfocitárias foi realizada a citometria de fluxo com o equipamento ORTHO-CYTORONABSOLUTE com painel de monitoração de três cores.

O ORTHO CYTORONABSOLUTE consiste de:

1. unidade principal: sistema fluídico (que faz o transporte das células em suspensão, até aonde está o laser); sistema óptico (que detecta a luz refletida, refratada, difratada e emitida pelas células em vários ângulos); sistema elétrico (que converte os sinais ópticos em elétricos, que são digitalizados para serem analisados pelo computador);
2. sistema processador automático das amostras (“autobiosampler”)
3. sistema de computação.

Foram, para cada amostra, rotulados 3 tubos de ensaio plásticos e pipetados 100µl de sangue total em cada tubo e adicionado 10µl de cada reagente (ortho[™] trio control (FITC/PE/CyP) Monoclonal antibodies (murine), Ortho[®] trio (CD4/CD8/CD3) Ortho[®] trio (CD16/CD19/CD3) no tubo apropriado. Foram então, incubados por 30min, em temperatura ambiente e protegidos da luz. Em seguida foi adicionado, em cada tubo 2ml de solução de lise (ortho mune[™] lysing reagent) e incubados por 15 min, em temperatura ambiente, protegidos da luz.

Para o controle de qualidade foram realizados os seguintes procedimentos: um tubo plástico foi rotulado e pipetado 1ml de ortho count calibration kit 1, um tubo plástico foi rotulado e pipetado 1ml de ortho count calibration kit 2, um tubo plástico foi rotulado e pipetado 1ml de ortho count calibration kit 3, um tubo plástico foi rotulado e pingou-se 1 gota de QC Windows com 1ml de PBS, um tubo plástico foi rotulado e pingou-se 1 gota de “Certified Blank” com 1ml de PBS.

Foram, então, realizados os procedimentos necessários para a leitura das amostras e do controle de qualidade no sistema “Cytoron” e no microcomputador. (De acordo com o protocolo fornecido pelo representante do equipamento.)

3.2.4. ELISA

O ELISA foi realizado utilizando-se o método COBAS CORE Anti-HIV1/2 DAGS, que é um imunoenensaio enzimático de antígeno em duplo sanduíche, planejado para a detecção dos anticorpos IgG e IgM para HIV1 e HIV2 no plasma ou soro humanos. Todos os passos do ensaio foram realizados automaticamente, no sistema COBAS CORE. Em

resumo, 200µl de soro de cada amostra foram pipetados em microtubos, colocados nas estantes devidamente numeradas, que foram introduzidas no aparelho para a realização do teste. No primeiro passo, as amostras e os controles foram incubados com antígenos recombinantes imobilizados em fase sólida (pérola de polietileno). Os antígenos recombinantes consistem de proteínas imobilizadas. O material que não se liga é removido pela lavagem das pérolas. Na segunda incubação, que é realizada com proteínas do envelope e núcleo do HIV1, marcadas com peroxidase, detecta-se os anticorpos humanos específicos ligados aos antígenos da fase sólida. Após a lavagem das pérolas, as enzimas ligadas são medidas por uma reação colorimétrica, usando o tetrametil benzidina (TMB) e o peróxido de hidrogênio, como substrato. A absorbância, medida pelo fotômetro, é proporcional à quantidade de anticorpos anti HIV1 presentes na amostra. O resultado foi então avaliado, baseado num valor de corte calculado à partir de amostras controles, que foram testadas em paralelo.

3.2.5. Western Blot

Para o teste de “Western Blot” foi utilizado o conjunto HIV-Blot da Genelabs Diagnostics, que é um ensaio imunoenzimático qualitativo para a detecção “in vitro” de anticorpos ao HIV1 e para amostras de soro ou plasma humanos, que se encontram repetidamente reativas, utilizando-se o ELISA. As tiras de nitrocelulose são incorporadas com proteínas antigênicas de HIV1 inativado parcialmente purificados, utilizando-se ligação eletroforética, mais um peptídeo sintético do HIV2 na mesma tira. Tiras individuais de nitrocelulose são incubadas com o soro diluído e com os controles (não reativo, reativo fraco e reativo forte). Anticorpos específicos ao HIV1 e HIV2, se estiverem presentes na amostra, vão se ligar às proteínas do HIV1 e ao peptídeo do hiv2 nas tiras. Em cada canaleta da bandeja fornecida para o teste, foi colocada uma tira para cada amostra de soro e uma para cada controle. Foi então, adicionado 2 ml de tampão de lavagem diluído em cada canaleta e incubado por cinco minutos em temperatura ambiente, sob uma plataforma de agitação. Em seguida, o tampão foi aspirado e adicionado 2ml de tampão de incubação em cada canaleta com 20 ml da amostra e 20 ml de cada controle e incubados por uma hora em temperatura ambiente, sob agitação. A amostras foram então aspiradas e as tiras foram lavadas três vezes

com 2 ml de tampão de lavagem diluído, deixando de molho por cinco minutos sob agitação. À seguir, foi adicionado 2 ml de solução de conjugado de trabalho em cada canaleta e incubado por 15 minutos, sob agitação. O substrato foi aspirado e a reação foi interrompida com água destilada. Os resultados foram analisados segundo recomendação do fabricante.

3.3. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

A classificação clínica adotada foi a descrita por ^{*}Castro e cols., 1993, apresentada resumidamente no quadro abaixo:

CD4 + (/mm ³)	Categorias clínicas		
	Agudo assintomático	Sintomático (nem A nem C)	AIDS
> 500	A1	B1	C1
200 – 499	A2	B2	C2
< 200	A3	B3	C3

^{*} CASTRO, K.G. *et al.* *apud* LEVY, J.A.- **HIV and the Pathogenesis of AIDS**. 2ed. Washington, ASM PRESS, 1998. 588p

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.RESULTADOS

Na **Figura 1**, apresentamos o resultado da amplificação com os iniciadores mencionados de alguns dos DNAs extraídos, representativos de pacientes da população estudada. Nota-se que a técnica produziu um fragmento de 735pb, conforme descrito por Samson *et al* (1996), correspondente ao gene CCR5. Em todos os demais casos, amplificações idênticas foram obtidas.

Após a restrição com a enzima Eco R1, os casos normais (sem mutações) foram caracterizados pela presença de duas bandas de 403pb e 332pb. Uma terceira banda de 371bp é observada quando há um alelo mutante. A **Figura 2** representa as restrições dos casos observados, que mostram, no caso de existirem duas bandas, os homozigotos normais e no caso de existirem três bandas os heterozigotos com um alelo mutante.

Dos 187 casos estudados, 130 eram do sexo masculino e 57 do sexo feminino. A maioria dos pacientes estudados (87%) situa-se na faixa etária de 20 a 49 anos (**Tabela 1**).

De acordo com a **Tabela 2**, 121 indivíduos puderam ser agrupados conforme a classificação clínica adotada. A maior parte deles (69%) já estava em estado adiantado da doença, ou seja, já havia progredido para estado de imunodeficiência declarada.

Conforme pode ser observado na **Tabela 3**, tivemos 15 casos da mutação delta 32 de 187 pacientes em que a amplificação e restrição foi realizada. Dos indivíduos em que haviam dados que permitissem a classificação clínica, observamos a mutação em 7 deles. A exemplo de toda a população estudada, tanto no grupo portador de heterozigose, quanto nos homozigotos normais, a frequência daqueles com classificação clínica avançada foi semelhante. As comparações foram prejudicadas pelo pequeno número de indivíduos com mutação observados.

De 139 pacientes que puderam ter determinadas as suas cargas virais, 14 apresentaram a mutação pesquisada. A distribuição, segundo a quantidade de partículas virais foi semelhante nos dois grupos (**Tabela 4**).

A quantificação de células CD4+ pôde ser feita em 159 pessoas, sendo que dessas 13 apresentavam a mutação delta 32. A distribuição em ambos os grupos foi também semelhante, conforme se pode observar na **Tabela 5**.

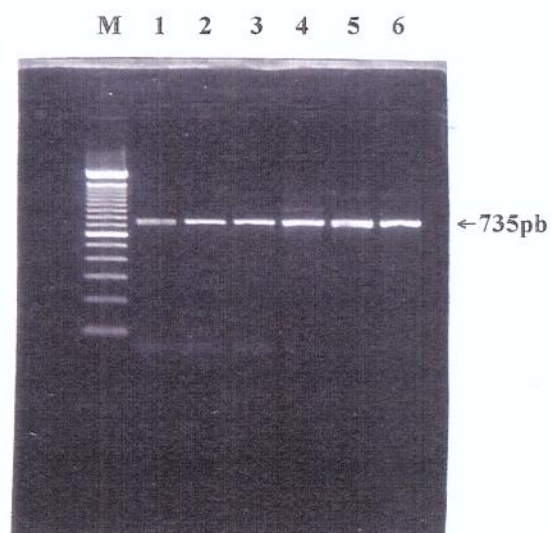


Figura 1: Fragmentos Amplificados:

M – Marcador (100pb Ladder);

1,2,3,4,5,6- Amostras de pacientes

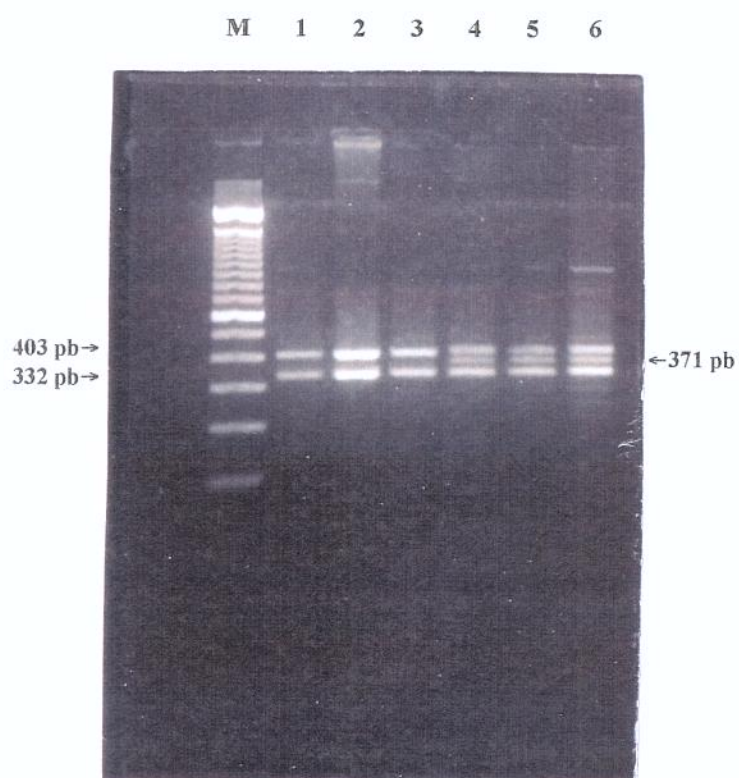


Figura 2: Restrição com EcoRI dos produtos do PCR:

M- Marcador (100pb Ladder);

1,2,3- Pacientes homozigotos normais para a mutação delta 32 do ccr5;

4,5,6- Pacientes heterozigotos para a mutação delta 32 do ccr5

Tabela 1: Distribuição dos indivíduos estudados, segundo o sexo e idade

IDADE	SEXO		Total
	M	F	
0-1	0	0	0
1-9	3	5	8
10-19	1	1	2
20-29	17	15	32
30-39	67	15	82
40-49	37	12	49
50+	5	9	15
Total	130	57	187

Tabela 2: Distribuição dos indivíduos estudados, segundo a classificação clínica

CÉLULAS CD4+	CATEGORIA CLÍNICA			Total
	A	B	C	
I	8	3	9	20
II	1	9	28	38
III	0	7	56	63
Total	9	19	93	121

Tabela 3: Distribuição dos indivíduos estudados segundo a classificação clínica e o genótipo ccr5 (%)

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA	GENÓTIPO			Total
	ccr5/ccr5	CCR5/ccr5	CCR5/CCR5	
A1	0	0	2	2
A2	0	0	1	1
A3	0	0	0	0
B1	0	0	4	4
B2	0	2	9	11
B3	0	1	9	10
C1	0	0	9	9
C2	0	2	23	25
C3	0	2	52	54
Desconhecida	0	8	63	71
Total	0	15 (8.02)	172	187

Tabela 4: Distribuição dos indivíduos estudados segundo o genótipo CCR5 e a carga viral

CARGA VIRAL (cópias/ml)	GENÓTIPO			Total
	ccr5/ccr5	CCR5/ccr5	CCR5/CCR5	
até 5.000	0	7	54	61
5.000-10.000	0	1	6	7
>10.000	0	6	65	71
Total	0	14	125	139

Tabela 5: Distribuição dos indivíduos estudados segundo a população de células CD4+ e o genótipo ccr5

CÉLULAS CD4+	GENÓTIPO			Total
	ccr5/ccr5	CCR5/ccr5	CCR5/CCR5	
até 200	0	3	65	68
200-499	0	7	54	61
>500	0	3	27	30
Total	0	13	146	159

... ..

... ..

... ..

... ..

5. DISCUSSÃO

A caracterização do CCR-5 como co-receptor para a infecção pelo HIV-1 impulsionou uma grande corrida no meio científico a fim de melhor entender a fisiopatogenia da AIDS.

Logo a seguir dessa descoberta já se soube várias particularidades desse receptor de quimoquinas, desde a sua estrutura até a codificação genômica, seus ligantes naturais (que mediam efeitos antivirais) e como se apresenta a genética molecular de algumas populações selecionadas.

De grande interesse, também, foi a identificação das alterações estruturais nesse receptor, decorrentes de mutações presentes em alelos, capazes até de conferir resistência à infecção pelo HIV-1. A mutação caracterizada como CCR-5 delta 32, já estudada em vários grupos populacionais é um desses exemplos.

Esse alelo mutante está presente em elevada frequência na população caucasiana (frequência alélica=0,092), mas é ausente nas populações negras da África central e oriental e entre os japoneses (SAMSOM *et al*, 1996). Confirmando esse estudo HUANG *et al* (1996), demonstraram uma frequência do alelo delta32 de 0,0808 na população predominantemente caucasiana, sendo 13,3% heterozigotos e 1,4% homozigotos e não encontraram evidências do delta32 nos descendentes de negros e asiáticos. Confirmaram também, que os indivíduos homozigotos para o delta32 são fortemente protegidos da aquisição sexual da infecção pelo HIV-1.

Em populações em que se observa miscigenação acentuada, como no caso da brasileira, o único estudo registrado em literatura, mostra que a mutação delta 32 está presente em 7% dos indivíduos analisados.

Neste trabalho, analisamos uma população de 187 pacientes infectados pelo HIV, independente da classificação clínica na época do estudo. Desses, cerca de 1/3 era do sexo feminino e 2/3 do sexo masculino, representando bem os índices nacionais relatados acerca dessa variável. Notamos, entretanto, que essa diferença entre os sexos desaparece quando se examina grupos etários mais jovens. No grupo de até 29 anos há tantos indivíduos do sexo masculino quanto do sexo feminino. Esse fato representa bem a tendência atual de

se ter igual participação de ambos os sexos na AIDS, dadas as formas de transmissão já descritas. Com respeito à classificação clínica tivemos a maioria deles agrupados como C3 (53 casos). Na classificação I que considera como normal o número de células CD4 (importantes para determinar o estado imunitário do paciente), independente do estado clínico ou doença apresentada, tivemos 20 pacientes.

Pudemos observar que desses 187 pacientes estudados, 15 possuíam um alelo mutante para o CCR-5, caracterizados, portanto, como heterozigotos para a mutação delta 32. Não observamos homozigotos nessa população. A maioria dos indivíduos estudados pertencia à classificação clínica C3, portanto em estado avançado da infecção pelo HIV.

Essa falha no CCR-5 abriu novas perspectivas para estudos nas bases genéticas da resistência ao HIV-1, bem como nas alternativas de tratamento da doença.

Porém, logo foi descoberto que o HIV-1 se utiliza de outros co-receptores, e que esta adaptação se associa com a progressão para a doença propriamente dita.

MICHAEL, NELSON, KEWALRAMANI, *et al* (1998) demonstraram em um paciente homozigoto para o delta32, o uso exclusivo e persistente do co-receptor CXCR-4, alertando para o cuidado que deve ser tomado para modalidades terapêuticas, que possam vir a usar o bloqueio do CCR-5.

Foi demonstrado, ainda, por MICHAEL, CHANG, LOUIE, *et al* (1997b) que a co-associação do heterozigoto delta32 com o fenótipo viral não formador de sincício é associada com a não progressão para doença, porém em indivíduos com o vírus formador de sincício, essa correlação não é significativa.

Recentemente, diversos outros variantes alélicos, que afetam a patogênese do HIV-1 têm sido descritos. O CCR5-m303, o CCR2-64I, o SDF1-3'A (ligante do CXCR4) e alguns variantes alélicos do promotor do CCR5.

A frequência do achado de mutações em populações diversas tem mostrado que ela guarda relação com a raça analisada. Por exemplo, em caucasianos demonstrou-se que os heterozigotos estão presentes com frequência elevada.

No presente estudo, conseguiu-se determinar a frequência do CCR5 delta32 na população participante, porém torna-se difícil inferir se os indivíduos heterozigotos apresentam uma redução na progressão para a doença devido ao seu genótipo, pois a grande maioria faz o uso dos antiretrovirais, desde a descoberta da doença.

Conclui-se, que as pesquisas realizadas, baseadas nos co-receptores só vêm a confirmar o aspecto multifatorial da transmissão do HIV-1 e mostrar que muito tem que ser estudado e levado em conta para se definir terapias alternativas para combater o HIV-1 baseados na genética molecular.

1. Introdução

2. Fundamentação Teórica

3. Metodologia

6. CONCLUSÕES

1. A mutação delta 32 do gene CCR5 foi observada em 8,02% dos 187 pacientes infectados pelo HIV analisados.
2. Não foram encontrados indivíduos homozigotos para essa mutação, sendo todas caracterizadas como ccr5/CCR5, portando heterozigotos.
3. Os indivíduos caracterizados como heterozigotos (ccr5/CCR5) distribuíram-se de modo semelhante aos normais, segundo a forma clínica da infecção pelo HIV, baseado na classificação adotada.

7. SUMMARY

Previous studies have shown a relationship between a 32-base-pair deletion within the β -chemokine receptor 5 (ccr5) gene and the acquisition and progression of the Acquired Human Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Several populations have been tested concerning this deletion, and it was found that Caucasians have a higher probability of bearing this defect, whereas in black and japanese populations it is virtually absent. In Brazil, no studies have been done to estimate this frequency in HIV infected populations, so far. In an urban brazilian population 93% of individuals tested showed normal CCR-5 allele and 7% were heterozygous CCR5/ Δ ccr5. In this study 187 HIV-infected persons were tested to determine the prevalence of this mutation. Genomic DNA samples were amplified using primers producing a 735bp fragment, which was submmited to cleavage with EcoR1. Normal homozygous alleles showed two fragments of 332 and 403 bp, and in heterozygous alleles an additional 371bp fragment was found. No homozygous individuals were found in this population, and the frequency of heterozygous CCR5/ Δ ccr5 was found to be 8,02%.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***8. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- BAGGIOLINI, M.- Chemokines: Structures and biological activities. In: **4th Conference on retroviruses and opportunistic infections**- Washington, 1997
- BARKER, E.; MACKEWICZ, C.E.; REYES-TERÁN, G.; SATO, A.; STRANFORD, S.A.; FUJIMURA, S.H.; CHRISTOPHERSON, C.; CHANG, S.Y.; LEVY, J.A.- Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. **Blood**, **92(9)**: 3105-3114, 1998.
- BERGER, E.- HIV entry e tropism: when 1 receptor is not enough. In: **4th Conference on retroviruses and opportunistic infections** – Washington, 1997
- BLEUL, C.C.; FARZAN, M.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; CLARK-LEWIS, I.; SODROSKI, J.; SPRINGER, T.A.- The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. **Nature**, **382**: 829-835, August 1996. [Letter]
- BONTEMPO, M.- História, distribuição e epidemiologia. In: _____-**Aids, esclarecimento global e uma abordagem alternativa**. S.P., Ed.hemus, s.d. p.27-31.
- BRASIL.Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de saúde. Coordenação nacional de DST e AIDS.-**Boletim epidemiológico de AIDS. Ano XII n3 Semana epidemiológica**. Brasília, MS, 1999(a). [On line]
http://www.aids.gov.br/udtv/boletim-jun-ago_99/tabelas-notificação.htm
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de saúde. Coordenação nacional de DST e AIDS.-**Boletim epidemiológico- AIDS**. Brasília, MS, 1999(b). [On line]
<http://www.aids.gov.br/udtv/boletim-set-nov99/tabelas.htm>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de saúde. Coordenação nacional de DST e AIDS.-**Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV – 1999**. Brasília, MS, 1999(c). [On line]
http://www.aids.gov.br/assistencia/antiretroviral/consenso99_jul99.htm

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de saúde. Coordenação nacional de DST e AIDS.-**Plano Nacional de Vacinas anti-HIV: pesquisa, desenvolvimento e avaliação** Brasília, MS,1999(d). 39p. [On line] <http://www.aids.gov.br/manuais.htm>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS.- **Carga Viral**. Brasília, M.S., 1998. 93p.
- BUCHBINDER, S.P.; KATZ, M.H.; HESSOL, N.A.; O'MALLEY, P.M.; HOLMBERG, S.D.- Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids*, **8**:1123-1128, August 1994.
- CAO, Y.; QIN, L.; ZHANG, L.; SAFRIT, J.; HO, D.D.- Virologic and Immunologic characterization of long-term survivors of human deficiency virus type I infection. *The New England Journal of Medicine*, **332**(4):201-208, January 1995.
- CARAËL, M.; SCHWARTLÄNDER, B.; ZEWDIE, D.- Preface. *Aids*, **12**(Suppl.1): S1-S2, 1998.
- CAMARGO, A.M.F. -**A AIDS e a Sociedade Contemporânea- estudos e histórias de vida**. S.P., Ed.Letras e Letras, 1994. 384p.
- CHOE, H; FARZAN, M; SUN, Y.; SULLIVAN, N.; ROLLINS, B.; PONATH, P.D.; WU, L.; MACKAY, C.R.; LaROSA, G.; NEWMAN, W.; GERARD, N.; GERARD, C.; SODROSKI, J.- The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, **85**:1135-1143, June 1996.
- COCCHI, F.; DeVICO, A.L.; GARZINO-DEMO, A.; ARYA, S.K.; GALLO, R.C.; LUSSO, P.- Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, **270**: 1811-1815, December 1995.

- COHEN O.J.; VACCAREZZA, M.; LAM, G.K.; BAIRD, B.F.; WILDT, K.; MURPHY, P.M.; ZIMMERMAN, P.A.; NUTMAN, T.B.; FOX, C.H.; HOOVER, S.; ADELSBERGER, J.; BASELER, M.; ARTHOS, J.; DAVEY, R.T.; DEWAR, R.L.; METCALF, J.; SCHWARTZENTRUBER, D.J.; ORENSTEIN, J.M.; BUCHBINDER, S.; SAAH, A.J.; DETELS, R.; PHAIR, C.; RINALDO, C.; MARGOLICK, J.B.; PANTALEO, G.; FAUCI, A.S.- Heterozygosity for a defective gene for CC chemokine receptor 5 is not the sole determinant for the immunologic and virologic phenotype of HIV-infected long-term nonprogressors. **The Journal of Clinical Investigation**, 100(6):1581-1589, September 1997.
- CONNOR, R.; SHERIDAN, K.; CERADINI, D.; LANDAU, N.- Change in HIV-1 co-receptor use correlates with disease progression in infected individuals. 4th **Conference on retroviruses and opportunistic infections**- Washington, 1997
- DEAN, M.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; HUTTLEY, G.A; SMITH, M.W.; ALLIKMETS, R.; GOEDERT, J.J.; BUCHBINDER, S.P.; VITTINGHOFF, E.; GOMPERTS, E.; DONFIELD, S.; VLAHOV, D.; KASLOW, R.; SAAH, A.; RINALDO, C.; DETELS, R.; O'BRIEN, S.J.- Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. **Science**, 273:1856-1862, September 1996.
- DENG, H.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTMAZ, D.; BURKHART, M.; DI MARZIO, P.; MARMON, S.; SUTTON, R.E.; HILL, C.M.; DAVIS, C.B.; PEIPER, S.C.; SCHALL, T.J.; LITTMAN, D.R.; LANDAU, N.R.- Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, 381:661-666, June 1996.
- DIMITROV, D.S.- How do viruses enter cells?: The HIV coreceptors teach us a lesson of complexity. **Cell**, 91(12):721-730, 1997. [Meeting Review]
- DITTMAR, M.T.; MCKNIGHT, A.; SIMMONS, G.; CLAPHAM, P.R.; WEISS, R.A.; SIMMONDS, P.- HIV-1 tropism and co-receptor use. **Nature**, 385(6):495-496, February 1997. [Scientific Correspondence]

- DOMS, R.W.- Domains of chemokine receptors required for HIV entry. **4th Conference on Retroviruses and opportunistic infections** – Washington, 1997
- FAUCI, A.S.- Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. **Nature**, **384**: 529-534, December 1996. [Review Article]
- GARRED, P.- Chemokine-receptors polymorphisms: clarity or confusion for HIV-1 prognosis?. **The Lancet**, **351**:2-3, January 1998. [Commentary]
- GARRED, P.; EUGEN-OLSEN, J.; IVERSEN, A.K.N.; BENFIELD, T.L.; SVEJGAARD, A.; HOFMANN, B.- Dual effect of CCR5 Δ 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. **The Lancet**, **349**:1884, June 1997. [Letter]
- HENDEL, H.; HÉNON, N.; LEBUANEC, H.; LACHGAR, A.; PONCELET, H.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; WINKLER, C.A.; SMITH, M.W.; KENEFIC, L.; O'BRIEN, S.; LU, W.; ANDRIEU, J.M.; ZAGURY, D.; SCHÄCHTER, F.; RAPPAPORT, J.; ZAGURY, J.F.- Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **19**(4):381-386, December 1998.
- HESSELGESSER, J.; LIANG, M.; HOXIE, J.; GREENBERG, M.; BRASS, L.F.; ORSINI, M.J.; TAUB, D.; HORUK, R.- Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. **The Journal of Immunology**, **160**:877-883, 1998.
- HO, D.D.; NEUMANN, A.U.; PERELSON, A.S.; CHEN, W.; LEONARD, J.M.; MARKOWITZ, M.- Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, **373**:123-126, January 1995.
- HOFFMAN, T.L. & DOMS, R.W.- Chemokines and coreceptors in HIV/SIV- host interactions. **AIDS**, **12**(suppl.A): S17-S26, 1998.

- HUANG, V.; PAXTON, W.A.; WOLINSKY, S.M.; NEUMANN, A.U.; ZHANG, L.; HE, T.; KANG, S.; CERADINI, D.; JIN, Z.; YAZDANBAKHSH, K.; KUNSTMAN, K.; ERICKSON, D.; DRAGON, E.; LANDAU, N.R.; PHAIR, J.; HO, D.D.; KOUP, R.A.- The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. **Nature Medicine**, 2:1240-1243, November 1996.
- KAHN, J.O. & WALKER, B.D.- Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **The New England Journal of Medicine**, 339(1):33-39, July 1998. [Review Article]
- KATZENSTEIN, T.L.; OLSEN, J.E.; HOFMANN, B.O.; BENFIELD, T.; PEDERSEN, C.; IVERSEN, A.K.N.; SORENSEN, A.M.; GARRED, P.; KOPPELHUS, U.; SVEJGAARD, A.; GERSTOFT, J.- HIV-1 Infected individuals with the CCR5 Δ 32/CCR5 genotype have lower HIV RNA levels and higher CD₄ cells counts in the early years of the infection than patients with the wild type. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, 16(1):10-14, 1997.
- KOSTRIKIS, L.G.; HUANG, Y.; MOORE, J.P.; WOLINSKY, S.M.; ZHANG, L.; GUO, Y.; DEUTSCH, L.; PHAIR, J.; NEUMANN, A.V.; HO, D.D.- A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. **Nature Medicine**, 4(3):350-353, March 1998.
- LACAZ, C.S.; MARTINS, J.E.C.; MARTINS, E.L.; DUARTE, A.J.S.; GRANATO, C.; STRAUSS, E.; MEDEIROS, E.A.S.; PORTO, E.; PASTERNAK, J.; GENTER, G.; MENDONÇA, J.S.; JAMRA, L.F.; BRÍGIDO, L.F.M.; OYAFUSO, L.K.M.; CORRÊA, M.O.A.; JAMRA, M.; SOTTO, M.N.; PALADINO, N.; LACRETA, O.; LOPES, A.G.; CHIEFFI, P.P.; CARVALHO, R.P.S.; MAHFUZ, R.; FRANÇA, R.L.; SAMPAIO, S.A.P.; PETRI, V.; DELMONTE, V.L.C.- **Aids/Sida**. 2ed. S.P., Sarvier, 1990. 302p.
- LEVY, J.A.- **HIV and the Pathogenesis of AIDS**. 2ed. Washington, ASM PRESS, 1998. 588p.

- LIU, R.; PAXTON, S.C.; CHOE, S.; CERADINI, D.; MARTIN, S.R.; HORUK, R.; MACDONALD, M.E.; STUHLMANN, H.; KOUP, R.A.; LANDAU, N.R.- Homozygous defect in HIV coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, **86**:367-377, August 1996.
- MANN, J.; TARANTOLA, D.J.M.; NETTER, T.W.; PARKER, R.; GALVÃO, J.; PEDROSA, J.S.- *A AIDS no mundo*. R.J., Abia e IMS/UERJ., 1993. 321p. (Coleção História Social da AIDS n1)
- MARTIN, M.P.; CARRINGTON, M.; DEAN, M.; O'BRIEN, S.J.; SHEPPARD, H.W.; WEGNER, S.A.; MICHAEL, N.L.- CXCR4 Polymorphisms and HIV-1 pathogenesis. *Journal of Acquired Immune Syndromes and Human Retrovirology*, **19**:430, 1998a. [Letter]
- MARTIN, M.P.; DEAN, M.; SMITH, M.W.; WINKLER, C.; GERRARD, B.; MICHAEL, N.L.; LEE, B.; DOMS, R.W.; MARGOLICK, J.; BUCHBINDER, S.; GOEDERT, J.J.; O'BRIEN, T.R.; HILGARTNER, M.W.; VLAHOV, D.; O'BRIEN, S.J.; CARRINGTON, M.- Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science*, **282**(4):1907-1911, December 1998b.
- MARTINSON, J.J.; CHAPMAN, N.H.; REES, D.C.; LIU, Y.T.; CLEGG, J.B.- Global distribution of CCR5 gene 32-basepair deletion. *Natural Genetics*, **16**:100-103, May 1997.
- MCDERMOTT, D.H.; ZIMMERMAN, P.A.; GUIGNARD, F.; KLEEGERGER, C.A.; LEITMAN, S.F.; MURPHY, P.- CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *The Lancet*, **352**(12):866-870, September 1998.
- MELLORS, J.; RINALDO Jr, C.R.; GUPTA, P.; WHITE, R.M.; TODD, J.A. KINGSLEY, L.A.- Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, **272**:1167-1170, May 1996.

- MEYER, L.; MAGIEROWSKA, M.; HUBERT, J.B.; ROUZIOUX, C.; DEVEAU, C.; SANSON, F.; DEBRE, P.; DELFRAISSY, J.F.; THEODOROU, I.- Early protective effect of CCR-5 $\Delta 32$ heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. **AIDS**, **11**:F73-F78, September 1997.
- MICHAEL, N.L.; NELSON, J.A.E.; KEWALRAMANI, V.N.; CHANG, G.; O'BRIEN, S.J.; MASCOLA, J.R.; VOLSKY, B.; LOUDER, M.; WHITE II, G.C.; LITTMAN, D.R.; SWANSTROM, R.; O'BRIEN, T.R.- Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by Human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 Δ 32. **Journal of Virology**, **72**(7):6040-6047, July 1998.
- MICHAEL, N.L.; LOUIE, L.G.; ROHRBAUGH, A.L.; SCHULTZ, K.A.; DAYHOFF, D.E.; WANG, C.E.; SHEPPARD, H.W.- The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. **Nature Medicine**, **3**(10):1160-1162, October 1997a.
- MICHAEL, N.L.; CHANG, G.; LOUIE, L.G.; MASCOLA, J.R.; DONDERO, D.; BIRX, D.L.; SHEPPARD, H.W.- The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. **Nature Medicine**, **3**(3):338-340, March 1997b.
- MICHAEL, N.L.; CHANG, G.; DONDERO, D.; BIRX, D.L.; SHEPPARD, H.W.; WRAIR, HENRY, M.- CCR-5 gene defects and viral phenotype are associated with nonprogressive HIV-1 disease. **4th Conference on retroviruses and opportunistic infections – Washington**, 1997c.
- MONTAGNIER, L.- **Vírus e Homens- Aids: seus mecanismos e tratamentos**. R.J., Jorge Zahar, 1995. 239p.
- MORIUCHI, H.; MORIUCHI, M.; ARTHOS, J.; HOXIE, J.; FAUCI, A.S.- Resistance to infection of promonocytic U937 subclones with T cell-tropic HIV-1 occurs at the level of fusion/entry. **4th Conference on retroviruses and opportunistic infections – Washington**, 1997.

- O'BRIEN, W.A.; HARTIGAN, P.M.; MARTIN, D.; ESINHART, J.; HILL, A.; BENOIT, S.; RUBIN, M.; SIMBERKOFF, M.S.; HAMILTON, J.D.- Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to Aids. **The New England Journal of Medicine**, 334:426-431, Feb. 1996.
- OSTROWSKI, M.A.; JUSTEMENT, J.J.; CATANZARO, A.; HALLAHAN, C.A.; EHLER, L.A.; MIZELL, S.B.; KUMAR, P.N.; MICAN, J.A.; CHUN, T.W.; FAUCI, A.S.- Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1 infected and uninfected individuals. **The Journal of Immunology**, 161:3195-3201, 1998.
- PANTALEO, G.; MENZO, S.; VACCAREZZA, M.; GRAZIOSI, C.; COHEN, O.J.; DEMAREST, J.F.; MONTEFIORI, D.; ORENSTEIN, J.M.; FOX, C.; SCHRAGER, L.K.; MARGOLICK, J.B.; BUCHBINDER, S.; GIORGI, J.V.; FAUCI, A.S.- Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. **The New England Journal of Medicine**, 332(4):209-216, January 1995.
- PASSOS, G.A.S.Jr. & PÍCANÇO, V.P.- Frequency of the Δ ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population. **Immunology Letters**, 61:205-207, 1998.
- PARKER, R.; BASTOS, C.; GALVÃO, J.; PEDROSA, J.S.- A Aids no Brasil. R.J., Abia/IMS/UERJ e Relume-Dumará, 1994. 360p. (Coleção História social da Aids n2).
- PAXTON, W.A.; MARTIN, S.R.; TSE, D.; O'BRIEN, T.R.; SKURNICK, J.; VANDEVANTER, N.L.; PADIAN, N.; BRAUN, J.F.; KOTLER, D.P.; WOLINSKY, S.M.; KOUP, R.A.- Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. **Nature Medicine**, 2:412-417, April 1996.
- PERELSON, A.S.; NEUMANN, A.U.; MARKOWITZ, M.; LEONARD, J.M.; HO, D.D.- HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. **Science**, 271:1582-1585, March 1996.

- PICCHIO, G.; SABBE, R.; GULIZIA, R.; JUDKOVSKI, V.; GLYNN, J.; MOSIER, D.E.-
The role of deletions in the CCR5 gene in HIV infections in vivo and in vitro. 4th
Conference on retroviruses and opportunistic infections – Washington, 1997.
- PIOT, P. & MERSON, M.H.- Global perspectives on HIV infection and AIDS. In:
MANDELL, G.L.; BENNET, J.E.; DOLIN, R.- **Principles and practice of infection
diseases**. 4ed. New York, USA, Churchill Livingstone, 1995. p.1164-1174
- QUILLET, C.; OBERLIN, E.; BRAUN, J.; ROUSSET, D.; GONZALES-CANALI, G.;
MÉTAIS, P.; MONTAGNIER, L.; VIRELIZIER, J.L.; ARENZANA-SEISDEDOS,
F.; BERETTA, A.- HIV-1 resistance phenotype conferred by combination of two
separate inherited mutations of CCR5 gene. **The Lancet**, **351(3)**:14-18, January 1998.
- ROTTMAN, J.B.; GANLEY, K.P.; WILLIAMS, K.; WU, L.; MACKAY, C.R.; RINGLER,
D.J.- Cellular localization of the chemokine receptor CCR5 -correlation to cellular
targets of HIV-1 infection. **American Journal of Pathology**, **151(5)**:1341-1351,
November 1997.
- ROWE, P.M.- CCR-5 deletion heterozygotes progress slower to Aids. **The Lancet**,
348:947, October 1996. [News]
- SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B.J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER,
C.M.; SARAGOSTI, S.; LAPOUMÉROULIE, C.; COGNAUX, J.; FORCEILLE, C.;
MUYLDERMANS, G.; VERHOFSTEDÉ, C.; BURTONBOY, G.; GEORGES, M.;
IMAI, T.; RANA, S.; YI, Y.; SMYTH, R.J.; COLLMAN, R.G.; DOMS, R.W.;
VASSART, G.; PARMENTIER, M.- Resistance to HIV-1 infection in caucasian
individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**,
382:722-725, August 1996.
- SMITH, M.W.; DEAN, M.; CARRINGTON, M.; HUTTLEY, G.A.; O'BRIEN, S.J.- CCR5-
Δ32 gene deletion in HIV-1 infected patients. **The Lancet**, **350(6)**:741, September
1997. [Letter]

- STANLEY, S.K. & FAUCI, A.S.- Immunology of AIDS and HIV infection. In: MANDELL, G.L.; BENNET, J.E.; DOLIN, R.- **Principles and practice of infectious diseases**. 4ed. New York, USA, Churchill Livingstone, 1995. p. 1203-1216.
- STEPHENS, J.C.; REICH, D.E.; GOLDSTEIN, D.B.; SHIN, H.D.; SMITH, M.W.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; HUTTLEY, G.A.; ALLIKMETS, R.; SCHRIML, L.; GERRARD, B.; MALASKY, M.; RAMOS, M.D.; MORLOT, S.; TZETIS, M.; ODDOUX, C.; GIOVINE, F.S.; NASIOULAS, G.; CHANDLER, D.; ASEEV, M.; HANSON, M.; KALAYDJIEVA, L.; GLAVAC, D.; GASPARINI, P.; KANAVAKIS, E.; CLAUSTRES, M.; KAMBOURIS, M.; OSTRER, H.; DUFF, G.; BARANOV, V.; SIBUL, H.; METSPALU, A.; GOLDMAN, D.; MARTIN, N.; DUFFY, D.; SCHMIDTKE, J.; ESTIVILL, X.; O'BRIEN, S.J.; DEAN, M.- Dating the origin of the CCR5-Δ32 Aids-resistance allele by the coalescence of haplotypes. **American Journal of Human Genetics**, 62:1507-1515, May 1998.
- STEWART, G.J.; ASHTON, L.J.; BITI, R.A.; FFRENCH, R.A.; BENNETTS, B.H.; NEWCOMBE, N.R.; BENSON, E.M.; CARR, A.; COOPER, D.A.; KALDOR, J.M.- Increased frequency of CCR-5 Δ32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. **AIDS**, 11(15):1833-1838, December 1997.
- TRKOLA, A.; DRAGIC, T.; ARTHOS, J.; BINLEY, J.M.; OLSON, W.C.; ALLAWAY, G.P.; CHENG-MAYER, C.; ROBINSONS, J.; MADDON, P.J.; MOORE, J.P.- CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. **Nature**, 384: 184-187, November 1996. [Letter]
- UNAIDS- Global HIV/AIDS epidemic update and full presentation, November, 1999. [Online]. <http://www.unaids.org/publications/graphics/index.html>
- WEI, X.; GHOSH, S.K.; TAYLOR, M.E.; JOHNSON, V.A.; EMINI, E.A.; DEUTSCH, P.; LIFSON, J.D.; BONHOEFFER, S.; NOWAK, M.A.; HAHN, B.H.; SAAG, M.S.; SHAW, G.M.- Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Nature**, 373:117-122, January 1995.

WILLEY, R.L.; THEODORE, T.S.; MARTIN, M.A. Amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 V3 loop that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelope. **Journal of Virology**, **68(7)**:4409-4419, July 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- HIV infection and AIDS. In: _____ - **AIDS- Images of the epidemic**. Geneva, WHO, 1994. p.5-8.

9. ANEXOS

Quadro 1: Manifestações clínicas que caracterizam imunodeficiência moderada a grave, em pacientes com diagnóstico de infecção pelo HIV comprovado laboratorialmente.(BRASIL, MS,1999c)

IMUNODEFICIÊNCIA MODERADA:

- Perda de peso > 10% do peso corporal
- Diarréia crônica sem etiologia definida, com duração de mais de 1 mês
- Febre prolongada sem etiologia definida (intermitente ou constante), por mais de 1 mês
- Candidíase oral
- Candidíase vaginal recorrente
- Leucoplasia pilosa oral
- Tuberculose pulmonar no último ano
- Herpes zoster
- Infecções recorrentes do trato respiratório (pneumonia, sinusite)

IMUNODEFICIÊNCIA GRAVE:

- Pneumonia por *Pneumocystis carinii*
- Toxoplasmose cerebral
- Criptosporidíase com diarreia persistente, por mais de 1 mês
- Isosporíase com diarreia persistente, por mais de 1 mês
- Doença por citomegalovírus (CMV) de um órgão que não seja o fígado, o baço ou os linfonodos
- Infecção pelo herpesvírus, com acometimento mucocutâneo por mais de 1 mês, ou visceral de qualquer duração
- Leucoencefalopatia multifocal progressiva
- Histoplasmose extrapulmonar ou disseminada
- Candidíase do esôfago, traquéia, brônquios ou pulmões
- Micobacteriose atípica disseminada
- Sepses recorrentes por salmonela (não-tifóide)
- Tuberculose extrapulmonar ou disseminada
- Linfoma primário do cérebro
- Outros linfomas não-Hodgkin de células B
- Sarcoma de Kaposi
- Criptococose extrapulmonar

Quadro 2: Apresentação, posologia e interação com alimentos dos medicamentos anti-retrovirais. (BRASIL, MS,1999c)

INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO				
Nome genérico	Sigla	Apresentação	Posologia	Interação com alimento
DIDANOSINA	ddI	Comprimido 25 e 100mg	≥ 60kg: 200mg 2x/dia ou 400mg 1x/dia < 60kg: 125mg 2x/dia ou 300mg 1x/dia	Administrar ≥ 30 minutos antes ou ≥ 2 horas após alimentação
ESTAVUDINA	d4T	Cápsula 30 e 40mg	≥ 60kg: 40mg 2x/dia < 60kg: 30mg 2x/dia	Administrar com ou sem alimentos
LAMIVUDINA	3TC	Comprimido 150mg Comprimido AZT+3TC 300mg+150mg	150mg 2x/dia	Administrar com ou sem alimentos
ZALCITABINA	ddC	Comprimido 0,75mg	0,75mg 3x/dia	Administrar, preferencialmente, com o estômago vazio.
ZIDOVUDINA	AZT ou ZDV	Cápsula 100mg Comprimido AZT+3TC 300mg+150mg	300mg 2x/dia, 200mg 3x/dia ou 100mg 5x/dia	Administrar com ou sem alimentos
INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA NÃO-ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO				
DELAVIRDINA	DLV	Comprimido 100mg	400mg 3x/dia	Administrar com ou sem alimentos
EFVIRENZ	EFZ	Cápsula 200mg	600mg 1x/dia	Administrar com ou sem alimentos

NEVIRAPINA	NVP	Comprimido 200mg	200mg 2x/dia Iniciar com 200mg/dia durante 14 dias, e para dose usual na ausência de exantema. Interrupção > 7 dias, reiniciar com 200mg/dia.	Administrar com ou sem alimentos
INIBIDORES DA PROTEASE				
INDINAVIR	IDV	Cápsula 400mg	800mg 8/8h Associado com DLV: 600mg 8/8h	Administrar ≥ 1 hora antes ou ≥ 2 horas após alimentação. Alternativamente, o IDV pode ser administrado com alimentos de baixo teor de gordura/proteína.
NELFINAVIR	NFV	Cápsula 250mg	750mg 3x/dia	Administrar com alimentos
RITONAVIR	RTV	Cápsula 100mg	600mg 2x/dia Associado com SQV: 400mg 2x/dia Iniciar com doses de 300mg, 2x/dia e; 100mg 2x/dia, a cada 3 ou 4 dias, até atingir a dose usual, no máximo, em 14 dias.	Administrar , preferencialmente, com alimento para melhorar a tolerância.
SAQUINAVIR	SQV	Cápsula 200mg (cápsula dura)	Associado com RTV: 400mg 2x/dia.	Quando associado ao RTV, não é necessário administrar com alimentos gordurosos.

Quadro 3: Esquema de combinações recomendadas para tratamento anti-retroviral.
(BRASIL, MS,1999c)

Duplo com 2 ITRN	AZT + ddI AZT + ddC ⁽¹⁾ d4T + ddI AZT + 3TC ⁽²⁾ d4T + 3TC ⁽²⁾	
Triplo com 2 ITRN + ITRNN	AZT + ddI AZT + ddC ⁽¹⁾ d4T + ddI + AZT + 3TC d4T + 3TC	EFZ NVP DLV ⁽³⁾
Triplo com 2 ITRN + IP	AZT + ddI AZT + ddC ⁽¹⁾ d4T + ddI + AZT + 3TC d4T + 3TC	IDV NFV RTV
Quádruplo com 2 ITRN + 2 IP ou 2 ITRN + ITRNN + IP	AZT + ddI AZT + ddC ⁽¹⁾ d4T + ddI + AZT + 3TC d4T + 3TC	RTV + SQV NVP + IDV NVP + NFV NVP + RTV DLV + IDV
ITRN = inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo AZT = zidovudina; ddI = didanosina, ddC = zalcitabina, d4T = estavudina, 3TC = lamivudina		
ITRNN = inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo EFZ = efavirenz; NVP = nevirapina; DLV = delavirdina		
IP = inibidor da protease IDV = indinavir; NFV = nelfinavir; RTV = ritonavir; SQV = saquinavir		
1. O ddC não deve ser usado em pacientes com CD4 < 200/mm ³ . 2. É recomendado que o 3TC seja reservado para esquemas triplices, devido ao rápido desenvolvimento de resistência a este anti-retroviral. 3. A delavirdina deverá ser reservada para aqueles casos em que o uso de nevirapina ou efavirenz tornar-se inviável, por motivo de intolerância, toxicidade ou por interações medicamentosas indesejáveis.		

Quadro 4: Recomendações para o início da terapia anti-retroviral em indivíduos sintomáticos (BRASIL, MS,1999c)

CONTAGEM DE T-CD4+ (células/mm ³)	CARGA VIRAL (cópias/ml)	RECOMENDAÇÃO	ESQUEMA TERAPÊUTICO
≥ 350	<30.000	Iniciar terapia e avaliar profilaxia para infecções oportunistas	Duplo com 2 ITRN ou triplo com 2 ITRN+ITRNN ou 2 ITRN + IP
	30.000 – 100.000		Duplo com 2 ITRN ou triplo com 2 ITRN+ITRNN ou 2 ITRN + IP
	> 100.000		Triplo com 2 ITRN + IP ou 2 ITRN +ITRNN
< 350	< 30.000	Iniciar terapia e avaliar profilaxia para infecções oportunistas	Triplo com 2 ITRN + IP ou 2 ITRN + ITRNN ou duplo com 2 ITRN
	30.000 – 100.000		Triplo com 2 ITRN + IP ou 2 ITRN +ITRNN
	> 100.000		Triplo com 2 ITRN + IP ou 2 ITRN +ITRNN

ITRN = inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN = inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo
IP = inibidor da protease

Quadro 5: Desenvolvimento de produtos candidatos a vacinas:

Fase pré-clínica: Avalia-se a segurança e imunogenicidade do produto vacinal em estudos com animais. Esta fase deve sempre anteceder os testes clínicos em seres humanos
Fase clínica: os estudos clínicos determinarão a segurança, imunogenicidade, e eventualmente, eficácia do produto em teste. Existem 3 fases obrigatórias para que uma vacina seja licenciada pelas autoridades competentes: Fase I: Estudos iniciais de segurança (Inocuidade) e Imunogenicidade em número limitado de voluntários (10 a 30 pessoas). Estes estudos envolvem geralmente adultos sadios com baixo risco para a infecção pelo HIV, por períodos que variam entre 6 meses a um ano; Fase II: continuação dos estudos de segurança e imunogenicidade; Em número maior de voluntários (em torno de 200 pessoas). Avalia-se sua capacidade de estimular determinadas respostas imunológicas que podem ser indicativas de possível proteção. Testam-se doses e esquemas diversos, diferentes adjuvantes. Esta fase pode durar de 6 meses a 2 anos; Fase III: Nesta terceira e última fase antes do possível licenciamento para comercialização, a eficácia do produto vacinal é testada em grande número de voluntários (milhares de pessoas). Quanto menor for a incidência da infecção e/ou quanto menor for a eficácia esperada do produto vacinal, maior será o número de voluntários necessário. A eficácia é medida comparando a taxa de infecção das pessoas que recebem o produto com aquelas que recebem o placebo. Estes estudos duram de 3 a 5 anos e tem alto custo.
Nível alto de eficácia na fase III não garante a efetividade no controle da epidemia, o que deve se avaliado em condições especiais em que se desenvolvem os ensaios de eficácia (fase III), quando se selecionam voluntários sadios que recebem o produto vacinal ou o placebo sob condições cuidadosamente controladas. A efetividade depende da cobertura a qual está associada ao preço dos produtos e ao nível de organização dos serviços de saúde.

Fonte: BRASIL, Ministério da Saúde, 1999d

Tabela 6 – Distribuição dos casos de AIDS e óbitos conhecidos por ano de diagnóstico.

Brasil: 1980-1999

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 1999a

Ano de Diagnóstico	Adultos/Adolescentes			Crianças < 13 anos			Total		
	Casos	Óbitos	Proporção de óbitos conhecidos	Casos	Óbitos	Proporção de óbitos conhecidos	Casos	Óbitos	Proporção de óbitos conhecidos
1980	1	1	100,0	-	-	-	1	1	100,0
1981	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1982	11	11	100,0	-	-	-	11	11	100,0
1983	34	34	100,0	1	1	100,0	35	35	100,0
1984	129	94	72,9	9	9	100,0	138	103	74,6
1985	540	439	81,3	16	15	93,8	556	454	81,7
1986	1121	867	77,3	31	21	67,7	1152	888	77,1
1987	2644	2068	78,2	97	72	74,2	2741	2140	78,1
1988	4287	3382	78,9	164	118	72,0	4451	3500	78,6
1989	5995	4556	76,0	210	155	73,8	6205	4711	75,9
1990	8425	6136	72,8	313	183	58,5	8738	6319	72,3
1991	11255	7523	66,8	353	204	57,8	11608	7727	66,6
1992	14287	8974	62,8	418	219	52,4	14705	9193	62,5
1993	16050	9957	62,0	478	250	52,3	16528	10207	61,8
1994	17331	10337	59,6	619	253	40,9	17950	10590	59,0
1995	18685	10083	54,0	714	271	38,0	19399	10354	53,4
1996	20183	8090	40,1	822	246	29,9	21005	8336	39,7
1997	20154	6499	32,2	771	193	25,0	20925	6692	32,0
1998/1999	23163	5764	24,9	762	162	21,3	23925	5926	24,8
Total	164295	84815	51,6	5778	2372	41,1	170073	87187	51,3

Tabela 7: Distribuição proporcional dos casos de AIDS, segundo o sexo e a idade. Brasil 1980 – 1999

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 1999b

Grupo etário (Anos)	Sexo				TOTAL	
	Masculino		Feminino			
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Menor de 1	1346	1,0	1210	2,7	2556	1,4
1 a 4	1173	0,9	1361	3,1	2534	1,4
5 a 9	467	0,3	354	0,8	821	0,5
10 a 12	191	0,1	66	0,1	257	0,1
13 a 14	200	0,1	48	0,1	248	0,1
15 a 19	2591	1,9	1238	2,8	3829	2,1
20 a 24	13146	9,7	5888	13,3	19034	10,6
25 a 29	27811	20,5	9411	21,3	37222	20,7
30 a 34	31423	23,2	8870	20,1	40293	22,4
35 a 39	23532	17,4	6245	14,1	29777	16,6
40 a 44	15034	11,1	4030	9,1	19064	10,6
45 a 49	8426	6,2	2324	5,3	10750	6,0
50 a 54	4527	3,3	1431	3,2	5958	3,3
55 a 59	2615	1,9	776	1,8	3391	1,9
60 e mais	2535	1,9	814	1,8	3349	1,9
Ignorado	373	0,3	85	0,2	458	0,3
Total	135.390	100,0	44.151	100,0	179.541	100,0

Tabela 8: Notificações de casos de AIDS recebidas no período de junho a agosto de 1999, segundo o local de residência (Unidade Federada e Macrorregião). Brasil. Junho a agosto de 1999. Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 1999a.

UF/Macrorregião	TOTAL
	1987-1999
Brasil	6718
Norte	101
Rondônia	1
Acre	2
Amazonas	63
Roraima	8
Pará	16
Amapá	8
Tocantins	3
Nordeste	661
Maranhão	10
Piauí	50
Ceará	46
Rio Grande do Norte	110
Paraíba	68
Pernambuco	113
Alagoas	43
Sergipe	51
Bahia	170
Centro-Oeste	240
Mato Grosso do Sul	72
Mato Grosso	18
Goiás	112
Distrito Federal	38
Sudeste	4172
Minas Gerais	678
Espírito Santo	103
Rio de Janeiro *	1860
São Paulo	1531
Sul	1544
Paraná	228
Santa Catarina	608
Rio Grande do Sul	708

Tabela 9: Distribuição das incidências (taxa por 100.000hab.), segundo municípios com maiores números casos de AIDS e período de diagnóstico – Brasil – 1980-1999

Fonte: BRASIL: Ministério da Saúde, 1999a

Município de Residência	Coefficiente de Incidência
ITAJAI (SC)	926,4
BALNEARIO CAMBORIU (SC)	803,4
SAO JOSE DO RIO PRETO (SP)	676,9
FLORIANOPOLIS (SC)	662,1
SANTOS (SP)	652,5
RIBEIRAO PRETO (SP)	641,9
BEBEDOURO (SP)	585,4
BARRETOS (SP)	530,4
SAO VICENTE (SP)	482,0
CATANDUVA (SP)	479,3
ARARAQUARA (SP)	452,3
PORTO ALEGRE (RS)	451,4
CACAPAVA (SP)	428,5
PRAIA GRANDE (SP)	365,7
SAO LEOPOLDO (RS)	364,1
SOROCABA (SP)	360,9

Tabela 10: Proteínas do HIV e suas funções. Adaptado de LEVY, 1998.

PROTEÍNA	TAMANHO (kDa)	FUNÇÃO
Gag	p24 (p25) p17 p6 p7	-proteína estrutural do capsídeo -proteína matricial -função no "brotamento" -proteína do nucleocapsídeo (auxilia na transcrição reversa)
Polimerase (Pol)	p66, p51	-transcriptase reversa; Rnase H (dentro do núcleo)
Protease (PR)	p10	-processamento pós-tradução das proteínas virais
Integrase (IN)	p32	-integração do cDNA viral
Envelope	gp120 gp41 (gp36)	-proteína de superfície do envelope -proteína transmembrana do envelope
Tat	p14	-transativação
Rev	p19	-regulação da expressão do mRNA viral
Nef	p27	-pleiotropismo, pode aumentar ou diminuir a replicação viral
Vif	p23	-aumenta a infecção viral e a transmissão célula-a-célula; ajuda na síntese do DNA proviral e/ou na montagem do vírus
Vpr	p15	-ajuda na replicação viral, transativação
Vpu	p16	-ajuda na liberação viral; quebra o complexo gp160-CD4
Vpx	p15	-ajuda na infecção
Tev	p26	-ativa Tat/Rev

Tabela 11: Co-receptores dos linfócitos CD4⁺ para infecção pelo HIV-1. Adaptado de LEVY, 1998.

RECEPTOR	FENÓTIPO	TROPISMO
CCR-5	NSI	Macrófagos
CXCR-4	SI	Células T
CCR-3	NSI	Macrófagos
CCR-2b	SI	Duplo-tropismo
Bonzo/STRL33	NSI	Macrófagos
BOB/GPR15	NSI	Macrófagos

Tabela 12: Efeito total das mutações CCR na progressão da doença do HIV. * Adaptado de GARRED, 1998.

AUTORES/ PAÍS	Nº DE PACIENTES ESTUDADOS	SOBREVIVÊNCIA SEM AIDS	SOBREVIVÊNCIA COM AIDS	EFEITO NOS LTNP
EFEITO DO HETEROZIGOTO CCR5delta32				
Dean et al/USA	401	Aumento total	Sem efeito	Frequência aumentada
Huang et al/USA	558	Sem efeito	Não determinado	Não determinado
Zimmerman et al/USA	171	Aumento total	Não determinado	Frequência aumentada
Michael et al/USA	406	Aumento total	Sem efeito	Frequência aumentada
Eugen-Olsen et al/ Dinamarca	96	Aumento transitório	Diminuída	Frequência aumentada
Meyer et al/ França	341	Aumento transitório	Não determinado	Não determinado
de Roda Husman et al/ Países baixos	343	Aumento total	Sem efeito	Frequência aumentada
EFEITO DO ALELO CCR2b64I				
Smith et al/USA	891	Aumento total	Não determinado	Frequência aumentada
Michael et al/USA	395	Sem efeito	Não determinado	Sem efeito

Tabela 13: Produtos vacinais testados em fase I/II em voluntários não infectados pelo HIV*
(Brasil, MS, 1999d):

Atualização:1999 Vacina experimental	Produtor	Local do ensaio clínico
Sub-unidades do envelope		
rgp 160	MicroGeneSys Immuno Ag Pasteur-Merieux-Connaught	EUA EUA França Bélgica
rgp 120	Biocine SmithKline/Beecham VaxGen/Genentech** Biocine/Chiron	EUA, Suíça Inglaterra EUA, Tailândia EUA/Tailândia
Peptídeos sintéticos		
V3-MPAS	United Biomedical Inc.	EUA, Tailândia,Brasil, Austrália, China
Conjugado V3PPD	Serum and Vaccines Institute	Suíça, Israel
HGP-30 (p17)	Viral Technologies	EUA, Inglaterra
V3, V3-p24	Pasteur-Merieux-Connaught	França
Peptídeos rV3	Centro Ingeniería Genética Biotecnología	Cuba
Rp24	Chiron	EUA
Partículas		
Ty-p24 VLP	British Biotechnology	Inglaterra
Vetores vivos/combinções (prime-boost)		
Vaccinia gp 160/rgp 160	Bristol-Myers- Squibb/MicroGeneSys	EUA
Vaccinia –env/gag/pol	Therion Biologicals	EUA
Canarypox-gp160	Pasteur-Merieux-Connaught	França, EUA
Canarypox- env/gag/pol/rgp 120	Pasteur-Merieux-Connaught/ Chiron	EUA, Uganda
Canarypox- env/gag/pol/rgp 120	Pasteur-Merieux-Connaught/ Chiron	França, EUA
“Naked” DNA		
Env/ver	Apollon	EUA

*Adaptado de Osmanov, Esparza, 1998

**Iniciado ensaio de fase III, nos EUA (1998) e Tailândia (1999).



Figura 3: Distribuição do HIV/AIDS no mundo.
Adaptado da UNAIDS, 1999.

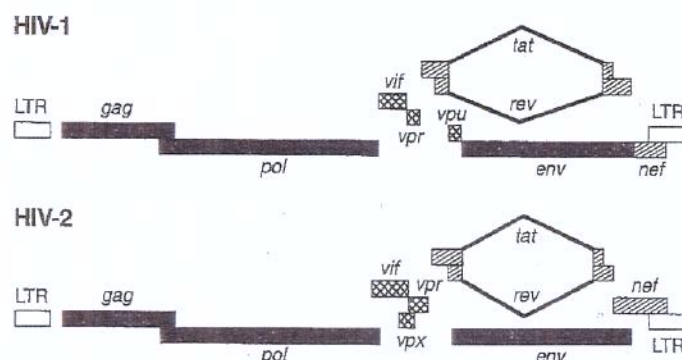


Figura 4: Mapas Genômicos dos vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2. Nota-se a presença exclusiva de Vpu no HIV1 e de Vpx no HIV2 (Adaptado de Levy, 1998).

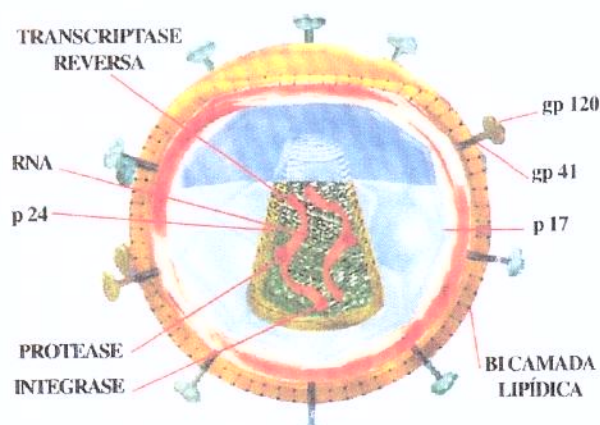


Figura 5: Representação esquemática de uma partícula viral do Vírus da Imunodeficiência Humana. Os principais componentes protéicos estão assinalados. Fonte: Brasil: Ministério da Saúde, 1998.

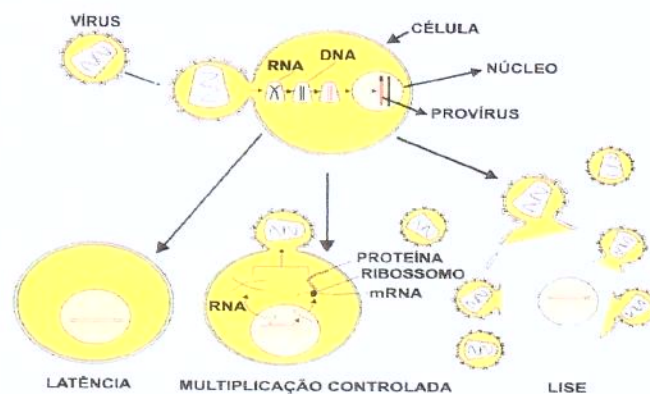


Figura 6: Representação esquemática do processo de infecção, multiplicação e sobrevivência pelo HIV. Fonte: Brasil: Ministério da Saúde, 1998.

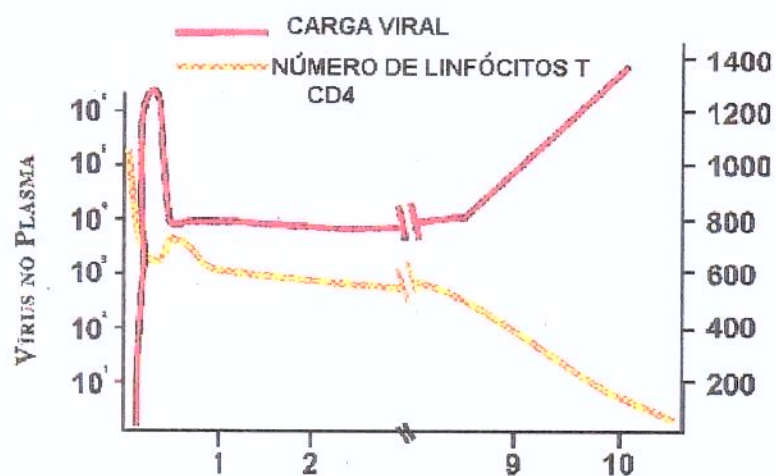


Figura 7: Evolução das quantidades de células CD4 e de partículas virais em relação ao tempo decorrido desde a infecção pelo HIV em humanos. Fonte: Brasil: Ministério da Saúde, 1998.

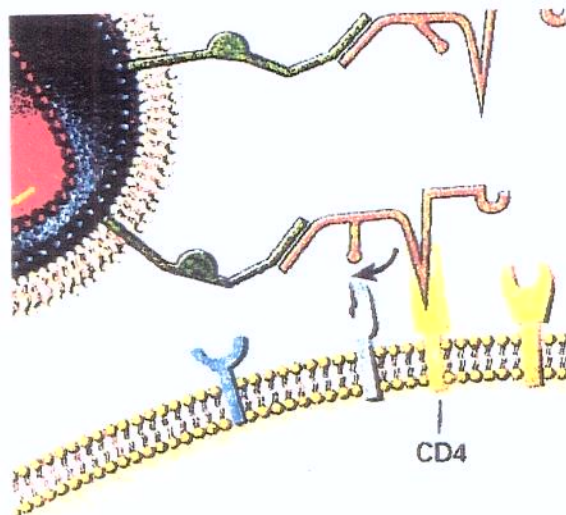


Figura 8: Ligação de gp 120 com o receptor CD4, presente em linfócitos.
Fonte: Levy, 1998.

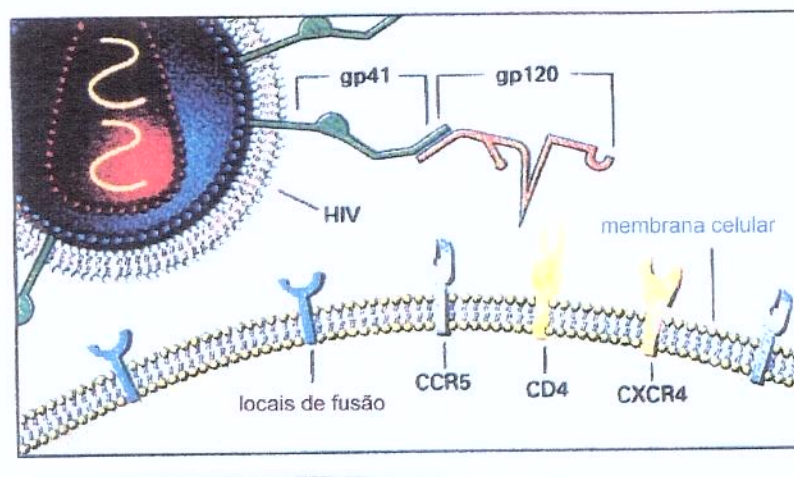


Figura 9: Visão artística dos principais locais em que componentes do HIV podem se ligar na superfície de células-alvo. Fonte: Levy, 1998.

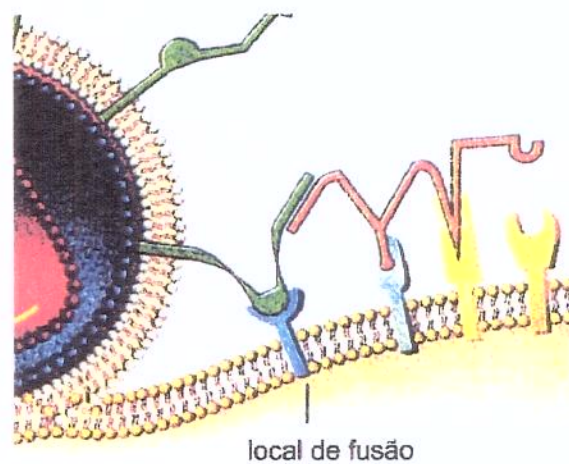


Figura 10: Fusão da partícula viral com a célula alvo, após a sua ligação com o CD4 e CCR5.
 Fonte: Levy, 1998

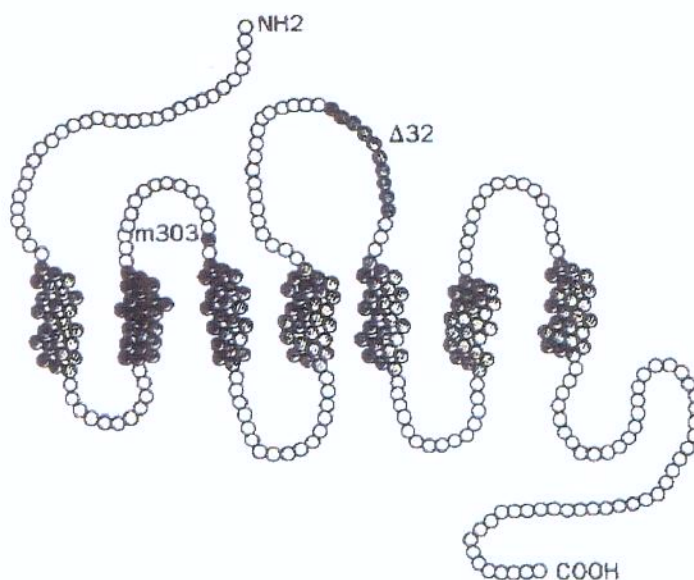


Figura 11: CCR5 normal. Observam-se as alças extracelulares (4) e os sítios transmembrana (7).
 Adaptado de Quillent et al, 1998.

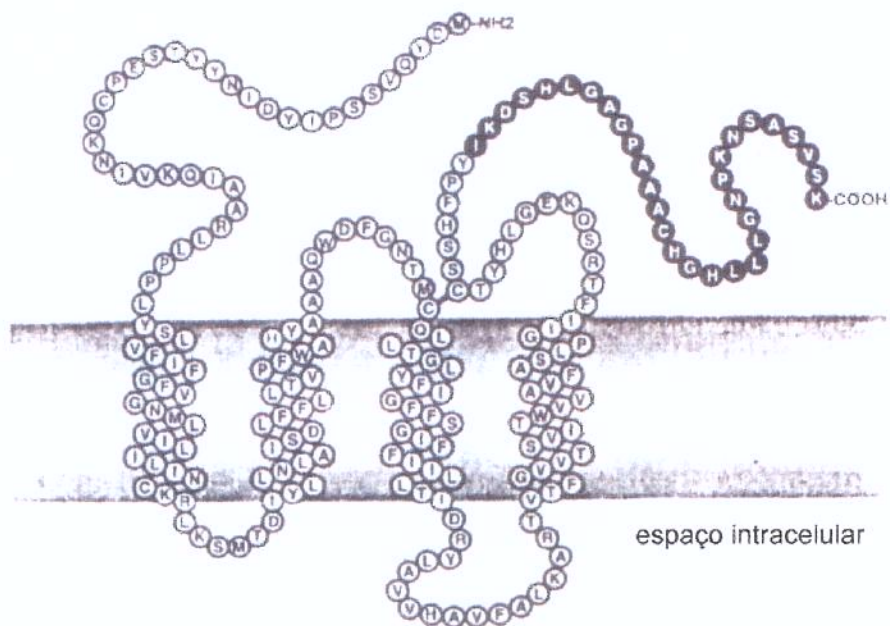


Figura 12: CCR5 mutante. Observa-se a falha estrutural nas duas últimas alças extracelulares, bem como a perda de três domínios transmembrana. Adaptado de Samson, et al, 1996.