



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE SAÚDE (FS)

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *vif* e *vpr* EM DOIS DIFERENTES
ESTÁGIOS DE INFECÇÃO PELO HIV-1**

MIKAEL ARAÚJO GUIMARÃES LEMOS

ORIENTADOR: ENRIQUE ROBERTO ARGANARAZ

Brasília, 09 de agosto de 2011.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – FS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MIKAEL ARAÚJO GUIMARÃES LEMOS

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *vif* e *vpr* EM DOIS DIFERENTES
ESTÁGIOS DE INFECÇÃO PELO HIV-1**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade de Brasília, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre**

ORIENTADOR: ENRIQUE ROBERTO ARGAÑARAZ

Brasília

2011

MIKAEL ARAÚJO GUIMARÃES LEMOS

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *vif* e *vpr* EM DOIS DIFERENTES
ESTÁGIOS DE INFECÇÃO PELO HIV-1**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade de Brasília, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre**

Aprovado em 09 de Agosto de 2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz (Presidente) - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco – Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Tatsuya Nagata – Universidade de Brasília

Dedico este trabalho

**Aos meus pais, Hélia e Altamir, pelo apoio incondicional,
compreensão e carinho, sempre me mostrando
o caminho para enfrentar os desafios**

Aos meus irmãos, Daniela e Junior, pelo apoio e compreensão

A todos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz pela oportunidade de realizar esse trabalho e por me proporcionar uma experiência extremamente valerosa no exterior. Além dos seus conselhos, ensinamentos e dedicação.

Ao Prof. Dr. Vicente Planelles da Universidade de Utah, que abriu sua casa durante o período em que estive em Salt Lake City, e seu laboratório para que eu realizasse parte desse projeto de pesquisa. Por todo o crescimento pessoal e conhecimento que obtive durante o período de convivência com ele.

À minha namorada Maria Beatriz (Biazinha), por todo seu apoio incondicional, dedicação, carinho e paciência. Por estar ao meu lado desde antes desta jornada começar. Por entender minha ausência em alguns momentos. Dedico a ela também esse trabalho.

Aos meus pais, Altamir e Hélia, que respeitaram minhas decisões e que me apoiam sempre. Por todo o seu amor, carinho e cuidado.

Aos meus irmãos, Daniela e Junior, pelo carinho e compreensão.

Ao meu pequeno sobrinho, Gabriel, por sua alegria e doçura.

Ao meu cunhado Iran, por sua amizade.

À Maria Emília (Mia), por toda sua ajuda, dedicação, sem contar o enorme carinho. Por seus inestimáveis conselhos e correções e por seu apoio em todos os momentos.

À Tainá Raiol por toda a ajuda, e auxílio nas correções, além dos ótimos conselhos e sugestões.

Ao João Luiz Pacini, por sua amizade, tranquilidade e compreensão.

Ao João Francisco (Kiko) e Maria Luiza (Lulu), por toda a ajuda e compreensão e por dividirem sua casa comigo.

À Maria Inez, por toda a sua ajuda com a parte de estatística desse trabalho, e por sua paciência, competência e ótimos conselhos.

À toda família Walter, em especial a Dona Lourdes e a família Costa, pelo apoio.

À toda a minha família, em especial aos meus avós Raimundo e Elza, sempre amorosos e presentes em minha vida e à minha madrinha, Eudeiza, por todo o seu apoio. Dedico a eles também esse trabalho.

À todos meus amigos do curso de biologia (2º/2004), por sua amizade e apoio.

Ao meu amigo e grande companheiro Tiago (Tiagão) e ao meu grande amigo Alexandre (Lelê) por sua amizade, apoio e bons conselhos.

Aos amigos que fiz no laboratório de Virologia Molecular, Ieler, Mariana Roll, Martina, Luana, Naiara e Débora. Obrigado por todo o apoio.

Aos integrantes do laboratório do Prof. Dr. Vicente Planelles, na Universidade de Utah, em especial ao brasileiros, que me acolheram muito bem.

Ao meu grande amigo e companheiro dentro e fora do laboratório, Vinícius.

Aos integrantes da Banca examinadora Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, Prof. Dr. Tatsuya Nagata e Prof. Dr. Fábio Pittella, por aceitarem o convite e por toda a compreensão, educação e cortesia.

À todos as secretárias(os) do programa de pós graduação em ciências da Saúde, em

especial, Edigrês, Francisca, Thais e Karla por toda a sua ajuda e paciência.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Prof. Dr. Franciso de Assis Rocha Neves.

À Cristina (Cris) da Farmacologia Molecular, aos professores integrantes do laboratório de Farmacologia Molecular, por toda a ajuda e apoio na execução deste projeto de pesquisa.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado!

Resumo

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV - *Human immunodeficiency Virus*) caracteriza-se por uma imunossupressão progressiva e aumento da infectividade e replicação viral. Apesar dos exatos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do HIV não terem sido completamente elucidados, diversos fatores genéticos do hospedeiro e do vírus foram descritos. Dentre os fatores virais, encontram-se alterações em domínios protéicos de regiões biologicamente ativas de várias proteínas virais. As proteínas acessórias Vif e Vpr participam de diversos mecanismos patogênicos. Dentro deste contexto este projeto teve como principal objetivo caracterizar o *pool* de seqüências dos genes *vif* e *vpr* presentes em amostras de DNA genômico de células de sangue periférico de oito pacientes, sendo três deles em dois estágios da infecção (inicial e tardio). Foram obtidas 115 seqüências, sendo 57 do gene *vif* e 58 do gene *vpr*. As alterações presentes nos diferentes domínios foram correlacionadas com as principais funções biológicas, com a progressão à doença (modelo de regressão linear simples) e com as estruturas terciárias das proteínas. Finalmente foram realizadas análises filogenéticas de ambos os genes. Dentre as principais mudanças detectadas para os alelos de *vif* e *vpr*, podemos destacar: Em Vpr, L5P, S10P, R73G, R85P, R87K, V57A, G75K, G75R, nos alelos presentes no estágio inicial e S94G, F72L, W54 por *stop codon*, presentes nos dois estágios de infecção. No caso de Vif as principais mudanças detectadas foram: W38L, W21 por *stop codon*, W38 por *stop codon*, nos alelos do estágio inicial e D101G e D101N em ambos os momentos. A análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos de *vpr* e *vif* e os diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1, revelou que o *score* influencia a contagem de células CD4+. É possível notar uma tendência no gráfico de regressão, onde quanto maior é o *score*, menor é o número de células CD4+. Há portanto uma forte correlação ($r = -0,826$ [Vpr] e $r = -0,840$ [Vif]) entre as mudanças nas proteínas acessórias Vpr (score 1) e Vif (score 2) e a diminuição das células CD4+. As árvores filogenéticas geradas com base nas seqüências dos alelos de *vif* e *vpr* indicam uma tendência de agrupamento entre os alelos dos mesmos pacientes nos estágios iniciais e finais. Não houve significativa mudança estrutural nas seqüências analisadas, quando comparadas com a estrutura terciária do consenso do subtipo B.

Palavras Chaves: HIV-1, AIDS, Vpr, Vif.

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) is characterized by a progressive immunosuppression and infectivity and viral replication increase. Although the exact molecular mechanisms involved in HIV pathogenesis have not been totally elucidated, several genetic factors of both host and virus have been described. Among some viral factors, there are alterations in protein domains of biologically active regions of several viral proteins. The accessory proteins Vif and Vpr participate of many pathogenic mechanisms. Taking these ideas into consideration, this Project aimed at characterizing the pool of sequences of vif and vpr genes present in genomic DNA samples of peripheral blood from eight patients, three of them from two different infection stages (early and late). Total of 115 sequences, 57 from vif gene and 58 from vpr gene were obtained. The alterations present at the different domains were correlated to the main biological functions, within the disease progression context (simple linear regression model), and with the protein's tertiary structure. Finally, filogenetic analysis were made for both genes. Among all detected mutations in vif and vpr aleles, we may highlight: in Vpr: L5P, S10P, R73G, R85P, R87K, V57A, G75K, G75R, at the aleles present in the initial state and S94G, F72L, W54 for a stop codon, present at both infection stages. In the Vif paradigm, the main detected changes were: W38L, W21 for a stop codon, in the early stage aleles and D101G e D101N in both moments. The correlation analysis of changes in vif and vpr aleles and the different clinical stages of HIV-1 infection showed that the influence score affect the CD4+ cells count. It is clearly possible to note a tendency in the regression graphic, being noticeable that when the score increases, CD4+ cells number decreases. Furthermore, there is a strong correlation between the changes in the accessory proteins Vpr (score 1) and Vif (score 2) and the diminish in the CD4+ cells count ($r = -0,826$ [Vpr] and $r = -0,840$ [Vif]). The filogenetic trees generated with regard to the sequence of the vif and vpr aleles indicate that there is a tendency in the gathering of the aleles of the same patients in the early and late stages. There has not been noticed significant changes in the structure of the analysed sequences, when compared to the 3D consensus structure of the subtype B.

Key words: HIV-1, AIDS, Vpr, Vif.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Número estimado de indivíduos portadores de HIV no ano de 2009.....	2
Figura 1.2. Curso da infecção pelo HIV-1.....	6
Figura 1.3. Estrutura da partícula do HIV-1.....	8
Figura 1.4. Estrutura genômica do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).....	8
Figura 1.5. Ciclo de replicação do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).....	14
Figura 1.6. Estrutura de Vpr.....	19
Figura 1.7. Estrutura de Vpr determinada por ressonância magnética.....	20
Figura 1.8. Complexo ubiquitina ligase recrutado por Vpr.....	26
Figura 1.9. Vias de sinalização relacionadas a Vpr.....	31
Figura 1.9.1. Primeiros passos da infecção pelo HIV-1 na célula alvo.....	32
Figura 1.9.2. Complexo de degradação proteassomal de A3G e A3F.....	34
Figura 1.9.3. Ligação entre Vif e APOBEC3.....	36
Figura 3.1. Estratégia de amplificação de alelos de vpr e vif.....	45
Figura 4.1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo das amostras amplificadas.....	54

Figura 4.2. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vpr de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B do HIV-1.....61

Figura 4.3. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vpr de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B do HIV-1.....62

Figura 4.4. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vif de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B do HIV-1.....63/64

Figura 4.5. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vif de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B do HIV-1.....65/66

Figura 4.6. Alinhamento das sequências consenso dos alelos de vpr presentes no estágio inicial da infecção, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.....67

Figura 4.7. Alinhamento das sequências consenso dos alelos de vpr presentes no estágio tardio da infecção, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.....68

Figura 4.8. Alinhamento das sequências consenso dos alelos de vif presentes no estágio inicial da infecção, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.....69

Figura 4.9. Alinhamento das sequências consenso dos alelos de vif presentes no estágio tardio da infecção, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.....70

Figura 4.9.1. Árvore filogenética dos alelos de Vpr presentes em dois estágios de infecção inicial (E) e tardio (L)78

Figura 4.9.2. Árvore filogenética dos alelos de Vif presentes em dois estágios de

infecção inicial (E) e tardio (L).....79

Figura 4.9.3. Correlação entre os *scores* das sequências dos diferentes estágios da proteína Vpr e a contagem de células CD4⁺ dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9.....81

Figura 4.9.4. Correlação entre os *escores* das sequências dos diferentes estágios da proteína Vpr e a contagem de carga viral (CV) dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9.....82

Figura 4.9.5. Correlação entre os *scores* das sequências dos diferentes estágios da proteína Vif e a contagem de células CD4⁺ dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9.....82

Figura 4.9.6. Correlação entre os *escores* das sequências dos diferentes estágios da proteína Vif e a contagem de carga viral (CV) dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9.....83

Figura 4.9.7. Comparação entre os modelos computacionais das estruturas terciárias da proteína Vpr.....85

Figura 4.9.8. Comparação entre os modelos computacionais das estruturas terciárias da proteína Vpr.....86

Figura 4.9.9. Comparação entre os modelos computacionais das estruturas terciárias da proteína Vif.....87

Figura 4.9.9.1. Gráficos de Ramachandran (*Ramachandran Plot*) e as porcentagens dos resíduos aminoácidos de 1M8L e 3DCG em cada região.....88

Figura 4.9.9.2. Gráficos de Ramachandran (*Ramachandran Plot*) e as porcentagens dos resíduos aminoácidos de E8.1R e L8.9R em cada região.....89

Figura 4.9.9.3. Gráficos de Ramachandran (*Ramachandran Plot*) e as porcentagens dos resíduos aminoácidos de E8.1F e consenso B Vpr em cada região.....90

Figura 7.1. Alinhamento das sequências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vpr no estágio inicial da infecção, para cada paciente, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.....132

Figura 7.2. Alinhamento das sequências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vpr no estágio tardio da infecção, para cada paciente, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.....133

Figura 7.3. Alinhamento das sequências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vif no estágio inicial da infecção, com a sequência consenso do subtipo B do HIV1.....134

Figura 7.4. Alinhamento das sequências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vpr no estágio tardio da infecção, com a sequência consenso do subtipo B do HIV-1.....135

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Relação dos genes do HIV-1 e algumas de suas funções.....	13
Tabela 3.1. Dados laboratoriais de amostras de 10 pacientes em dois estágios da infecção pelo HIV-1.....	42
Tabela 4.1. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vpr no estágio inicial.....	56
Tabela 4.2. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vpr no estágio tardio.....	57
Tabela 4.3. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vif no estágio inicial.....	58/59
Tabela 4.4. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vif no estágio tardio.....	60

Sumário

CAPÍTULO 1. Introdução

1.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	2
1.2. Histórico.....	3
1.3. Estágios da progressão do HIV.....	5
1.4. Epidemiologia.....	6
1.5. Classificação e Morfologia.....	6
1.6. Genoma do HIV.....	8
1.7. Ciclo de replicação do HIV.....	14
1.8. A proteína viral R (Vpr)	17
1.8.1. Estrutura de Vpr.....	18
1.8.2. Funções de Vpr.....	21
1.8.2.1. Interações de Vpr com a maquinaria de reparo de DNA.....	22
1.8.2.2. Transativação do LTR.....	23
1.8.2.3. Interação de Vpr com algumas proteínas celulares.....	24
1.8.2.4. Vpr e a manipulação do sistema Ubiquitina/Proteassoma	25
1.8.2.5. Interação de Vpr com o poro nuclear e os elementos de transporte nuclear.....	27
1.8.2.6. Apoptose e Vpr.....	28
1.8.2.7. Vpr e o receptor de glicocorticóide.....	30
1.9. A proteína Vif.....	32
1.9.1. Proteínas APOEBEC3G e APOEBEC3F.....	33
1.9.2. Processo de degradação proteassomal de A3G e A3F.....	34
1.9.3. Ligação entre Vif e APOEBEC3.....	36
1.9.4. Outras funções de Vif e interação com proteínas celulares	37

CAPÍTULO 2. Objetivos

2.1. Relevância da pesquisa.....	40
2.2. Objetivo Geral.....	40
2.3. Objetivos Específicos	40

CAPÍTULO 3. Material e Métodos

3.1. Material de Estudo	42
3.2. Extração de DNA genômico	43
3.3. Quantificação das amostras de DNA	44
3.4. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	44
3.5. Clonagem.....	46
3.6. Obtenção de DNA plasmidial e análise dos recombinantes.....	47
3.7. Sequenciamento.....	47
3.8. Análise de Bioinformática.....	47
3.9. Gráfico de Regressão.....	49

CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão

4.1. Amplificação e Sequenciamento.....	54
4.2. Caracterização e frequência das alterações nas sequências dos alelos das proteínas Vpr e Vif presentes em dois estágios da infecção	55
4.3. Análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos iniciais e tardios e as funções da proteína Vpr.....	71
4.3.1. Análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos iniciais e tardios e as funções da proteína Vif.....	74
4.4. Análise filogenética.....	76
4.5. Análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos de vpr e vif e os diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1.....	80
4.6. Análise da estrutura terciária das proteínas Vpr e Vif.....	83
4.7. Resumo da discussão.....	91

CAPÍTULO 5. Conclusões

5.1. Perspectivas.....	96
------------------------	----

6. Referências Bibliográficas.....	97
---	-----------

7. Anexo

7.1. Sequências vif - Estágio Inicial.....	115
7.2. Sequências vif - Estágio tardio.....	120
7.3. Sequências vpr - Estágio Inicial.....	124
7.4. Sequências vpr - Estágio tardio.....	128
7.5. Outros alinhamentos de Vif e Vpr.....	130
7.6. Lista de Siglas e Abreviaturas.....	135

Capítulo 1. Introdução

1.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

O vírus da imunodeficiência humana (HIV - *Human immunodeficiency Virus*) é o agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome* – AIDS) em humanos. Essa doença é caracterizada por uma imunossupressão progressiva, causada principalmente pela perda de linfócitos T auxiliares CD4+ (LTh) (Levy, 1993)(Gallo, 2002), frequentemente acompanhada por infecções oportunistas ou pela ocorrência de um tipo de câncer, o Sarcoma de Kaposi. A infecção pelo HIV é crônica e a progressão da doença é lenta (Prusiner, 2002).

No início da década de 80 foram relatados os primeiros casos e, em pouco tempo, a epidemia ganhou proporções mundiais. Devido ao grau de morbidade e ao grande número de óbitos ocasionados pelo HIV, o impacto global desta infecção na economia e nos recursos de atendimento aos portadores do vírus foram, e continuam sendo, enormes. Conforme dados do *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS, 2009) de dezembro de 2009, mais de 25 milhões de pessoas já morreram com AIDS desde seus primeiros relatos, em 1981, e atualmente, cerca de 33 milhões de pessoas vivem infectadas com o vírus em todo mundo (Figura 1.1).

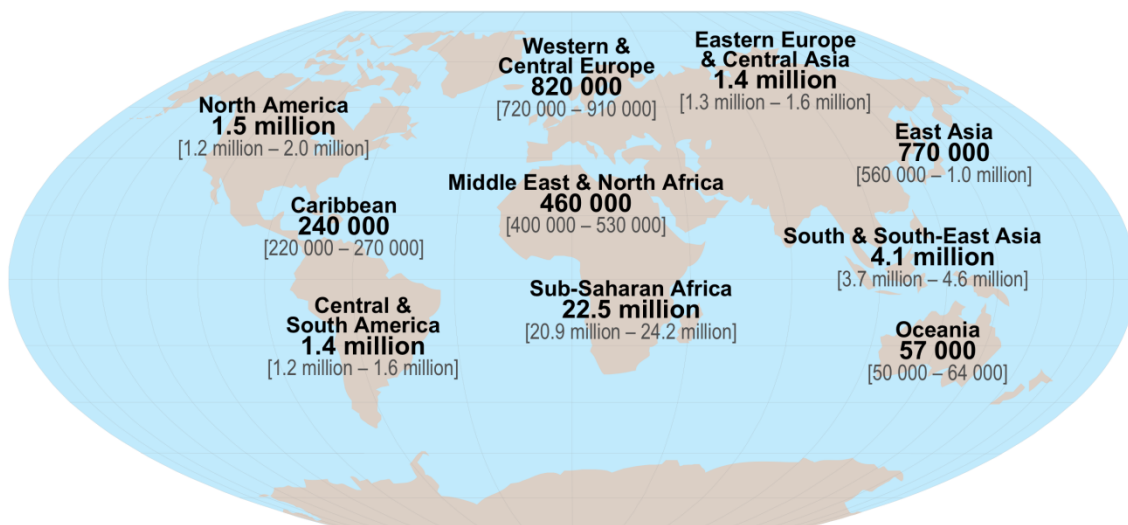


Figura 1.1. Número estimado de indivíduos portadores de HIV no ano de 2009 (UNAIDS, 2009).

Esses números evidenciam a importância dos esforços para o controle e combate a AIDS, uma vez que ainda não existe imunização profilática ou cura para essa enfermidade.

Entretanto avanços importantes foram conseguidos.

A pesquisa básica gerou um grande número de dados, tornando possível identificar o causador da AIDS, por meio do isolamento e identificação do seu agente etiológico, o HIV, em 1983. Atualmente, são conhecidos dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. O primeiro tipo, mais virulento, é responsável pela pandemia da AIDS. O HIV-2, além de ser menos patogênico, é restrito ao oeste da África (van Regenmortel *et al.*, 2000)(Wigg, 2002).

Várias descobertas sobre a biologia do HIV-1 permitiram a elucidação das formas de transmissão, além do desenvolvimento de testes sorológicos e de drogas antivirais, que são essenciais ao controle da infecção pelo vírus (Gallo & Montagnier, 2002).

O advento de novas tecnologias para sequenciamento de DNA e o surgimento de diversos bancos de dados de sequências permitiram um melhor conhecimento do genoma do vírus e auxiliaram no entendimento do papel desempenhado pelos principais genes envolvidos na infecção pelo HIV (Votteler *et al.*, 2008).

1.2. Histórico

Em 1981, foram relatados os primeiros casos de AIDS, relacionados principalmente a homens que faziam sexo com outros homens. A imunodeficiência era associada ao aparecimento de um tipo de câncer, o Sarcoma de Kaposi, e uma série de infecções oportunistas que afetavam os indivíduos infectados. Em pouco tempo, devido ao número de casos registrados da doença, a AIDS atingiu proporções epidêmicas. As ocorrências em diferentes populações, incluindo homens heterossexuais, usuários de drogas, portadores de hemofilia, crianças e receptores de transfusões de sangue levaram a identificação de um mesmo agente responsável pela enfermidade, que era transmitido por meio de fluídos corporais das pessoas infectadas (Prusiner, 2002)(Votteler *et al.*, 2008).

Dois grupos de pesquisa foram os principais responsáveis pela identificação e isolamento do HIV-1, sendo um liderado por Luc Montagnier, do Instituto Pasteur, em Paris/França, e o outro comandado por Robert Gallo, do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (*Centres for Disease Control and Prevention* - CDC), dos Estados Unidos. Outras descobertas da época foram importantes para o isolamento do HIV, tais como, o isolamento da enzima transcriptase reversa (Baltimore, 1970)(Temin & Mizutani, 1970) e a descoberta da interleucina-2 (Morgan *et al.*, 1976), fator de crescimento essencial à cultura

de células de linfócitos T necessárias à replicação do HIV *in vitro* (Prusiner, 2002).

Em 1980, o grupo de pesquisa de Gallo, que possuía linhas de pesquisas relacionadas aos retrovírus, juntamente com colaboradores, descreveu o primeiro retrovírus humano (HTLV-I - human T-cell lymphotropic virus type I). Tratava-se de um vírus causador de leucemia em humanos. A descoberta do primeiro retrovírus humano (HTLV-I) foi crucial no processo de isolamento do HIV. Essa descoberta foi posteriormente confirmada por Yoro Hinuma e colaboradores em 1981 (Hinuma, 1981). Em 1982, esse grupo de pesquisa relatou um novo retrovírus humano, denominado HTLV-II. Esses pesquisadores acreditavam na hipótese de que a AIDS era causada por um vírus da mesma família do HTLV, porque ele apresentava o mesmo modo de transmissão e pelo fato de ambos se replicarem em linfócitos.

Um retrovírus humano distinto de HTLV-I e HTLV-II, com morfologia semelhante à de um lentivírus, foi apresentado pelo pesquisador Luc Montagnier em 1983. Esse retrovírus foi isolado a partir de uma amostra da biópsia de um paciente com linfadenopatia, utilizando um protocolo anteriormente descrito por Gallo e colaboradores (Montagnier, 1984). Após serem encontrados traços de transcriptase reversa no cultivo de linfócitos T dessa amostra, enzima presente apenas nos retrovírus, os vírus isolados a partir dessa cultura receberam a denominação de vírus associado a linfadenopatia (*lymphadenopathy associated virus* – LAV) (Montagnier, 2002). Eles causavam a morte de linfócitos T auxiliares em cultura, diferentemente dos vírus HTLV. No mesmo período, o grupo de Gallo caracterizou um novo vírus, com características distintas dos vírus da família HTLV, que recebeu a denominação de HTLV-III.

Em 1984 o pesquisador Jay Levy e seus colaboradores da Universidade da Califórnia isolaram o vírus a partir de indivíduos assintomáticos, indicando o estado de portador do vírus, e denominando-o de retrovírus associado à AIDS (*AIDS-associated retrovirus* - ARV). Nesse mesmo ano, a relação do HIV como agente etiológico da AIDS foi aceita pela comunidade médica e científica (Gallo, 2002)(Montagnier, 2002)(Prusiner, 2002).

Em 1986, com o intuito de evitar o uso de diferentes denominações para o mesmo vírus responsável pela AIDS, o (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*) recomendou nomear esse agente de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Levy J.A., 1998).

O advento de testes comerciais para detecção do HIV em 1986, que reduziu

significativamente a transmissão do vírus por transfusão de sangue, o desenvolvimento do AZT em 1987, além da disponibilidade da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART) em 1995 foram de grande importância para a melhoria da vida dos portadores de HIV (Gallo & Montagnier, 2002).

1.3. Estágios da progressão do HIV

A seguir será feita a classificação dos estágios de progressão da infecção pelo HIV, na ausência de tratamento. Inicialmente o HIV-1 causa um estado semelhante a de uma gripe, com febre baixa, que se inicia logo após a infecção e dura alguns dias. Ocorre então um período de alguns anos, caracterizado por altos níveis de multiplicação viral e infectividade (Dimmock *et al* 2007). Eventualmente a imunossupressão começa.

- Fase A: varia de infecção primária pelo HIV à infecção subclínica assintomática, para linfadenopatia generalizada persistente (inchaço dos gânglios linfáticos), que indica que a imunossupressão começou e está progredindo. Sem tratamento, esta fase dura em média 10 anos. Formalmente definida por apresentar >500 células T CD4⁺ / μl ou / mm^3 de sangue (normalmente 800-1200 células / μl)(Figura 1.2) (Dimmock *et al* 2007). Fase Infecçiosa.
- Fase B: pessoas sintomáticas, apresentando uma seleção de condições não encontradas na categoria C. Incluem perda de peso, infecções oportunistas (como a candidíase, febre, diarreia durante mais de um mês, e mais de um episódio de herpes-zoster). Estas condições sugerem um problema na imunidade mediada por células. A maioria das pessoas da categoria B têm entre 200 e 500 células T CD4⁺ / μl de sangue (Figura 1.2) (Dimmock *et al* 2007). Fase Infecçiosa.
- Fase C: AIDS, incluindo pessoas com infecções mais graves ou câncer. Varia de leve, com infecções constantes, à severa, com infecções graves, grande perda de peso, miopatia, doença do sistema nervoso periférico e do sistema nervoso central (demência). A maioria das pessoas da categoria C possui contagem células <200 células T CD4⁺ / μL de sangue (Dimmock *et al* 2007) (Figura 1.2) Fase Infecçiosa.

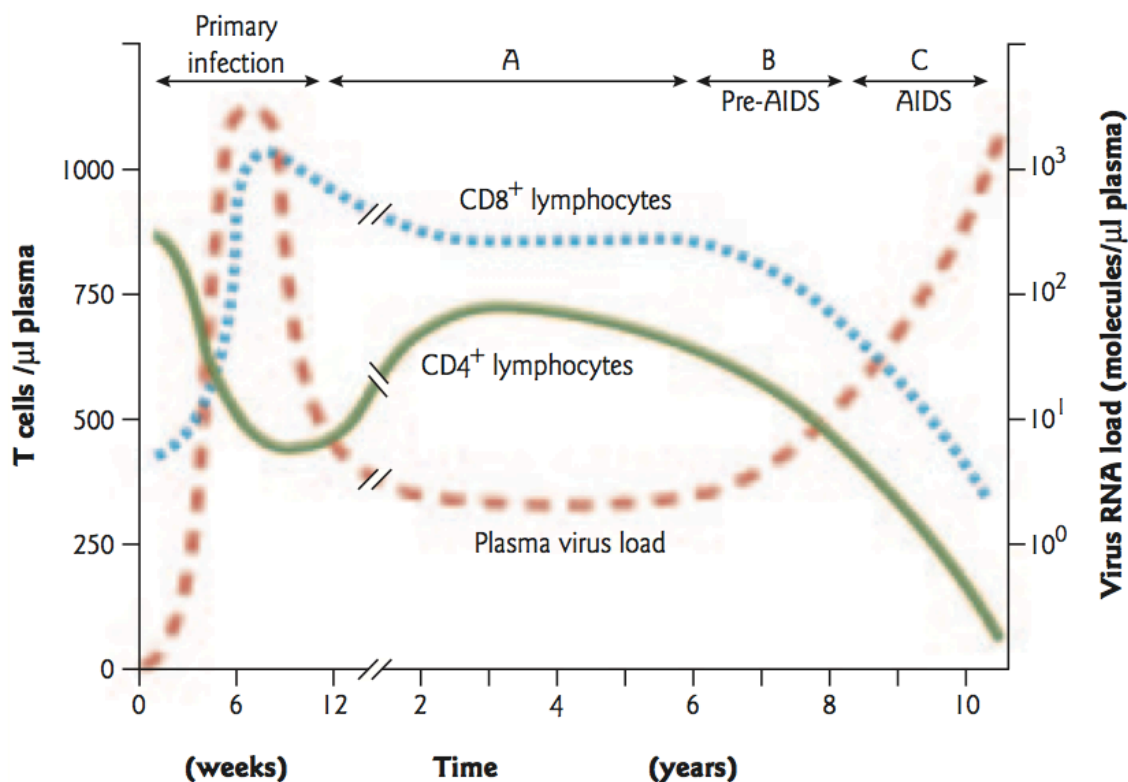


Figura 1.2.Curso da infecção pelo HIV-1. A relação inversa entre a carga viral e a concentração de células T no plasma. A, B e C se referem as categorias de infecção descritas no tópico anterior (Dimmock *et al.*, 2007).

1.4. Epidemiologia

- Atualmente estima-se que 33 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HIV no mundo (UNAIDS, 2009)
- No ano de 2009, 2,6 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus (UNAIDS, 2009)
- As mortes causadas pelo HIV, chegaram a 1,8 milhões de pessoas no mesmo ano (UNAIDS, 2009)
- Mais de 7000 pessoas são infectadas por dia pelo HIV (UNAIDS, 2009)
- Aproximadamente, 97% dessas pessoas recém-infectadas, são provenientes de países pobres. As mulheres correspondem a 51%. E 85% das pessoas infetadas por dia possuem idade superior a 15 anos (UNAIDS, 2009)

1.5. Classificação e Morfologia

O HIV-1 é um típico membro do gênero *Lentivírus* da família *Retroviridae*. O nome é derivado do latim *Lente*, uma referência ao longo período de incubação nos hospedeiros e

sua capacidade de persistir e replicar-se por muitos anos, antes de causar sinais clínicos da doença.

Os *Lentivirus* apresentam como características principais: (i) causa efeitos citopáticos; (ii) provoca deficiências imunológicas, desordens hepáticas e nervosas; (iii) deixa o indivíduo suscetível a doenças autoimunes. Apresentam ainda contínua mutação viral e capacidade de integração de uma cópia do DNA viral no DNA do hospedeiro. O vírus passa a ser denominado provírus, após seu genoma ser integrado no genoma da célula hospedeira (Dimmock *et al*, 2007). Trata-se de um vírus constituído de RNA fita simples, e por ser um retrovírus, utiliza a enzima transcriptase reversa para a transcrição do RNA em DNA. Além de possuir características gerais dos retrovírus, como a presença dos genes estruturais, *gag*, *pol* e *env*, os *Lentivirus* codificam proteínas acessórias (Nef, Vif, Vpr e Vpu) e regulatórias (Tat e Rev) da replicação viral. A descoberta do HIV estimulou a caracterização de vários outros *Lentivirus*, como aqueles isolados de primatas não humanos, SIV (*simian immunodeficiency virus*) (Janeway *et al.*, 2004)(Flint *et al.*, 2004)(Votteler *et al*, 2008).

A análise de diversas sequências isoladas do HIV-1 permitiu a distinção de três grandes grupos: M (*major*), O (*outlier*) e N (non M, non O)(Votteler *et al*, 2008)(Janeway *et al.*, 2002)(Flint *et al.*, 2004). Acredita-se que cada grupo seria resultado de um evento de transferência independente, de lentivirus de primatas não humanos para humanos. No caso do HIV-1, teria ocorrido a transferência do vírus SIV_{cpz} (chimpanzé) para seres humanos e oito linhagens de HIV-2 surgiram a partir da infecção por SIV_{sm} (*sooty mangabeys*). O grupo M do HIV-1 tem a maior prevalência entre os casos de AIDS no mundo, principalmente o subtipo B, o de maior prevalência também no Brasil (Morgado *et al.*, 1998). O grupo *major* (M) pode ser subdividido em subtipos A, B, C, D, E, F, G, H, J e K e suas formas recombinantes CRFs (*circulating recombinant forms*) (Votteler *et al*, 2008)

O *virion* ou partícula viral possui um diâmetro que varia entre 80nm - 110 nm, um genoma de aproximadamente 9,8 kb e um envelope, oriundo da célula hospedeira. As glicoproteínas virais são derivadas de um precursor gp160, que é clivado por proteases celulares, produzindo as glicoproteínas gp120 de superfície (SU) e gp41, a glicoproteína transmembrana (TM). Na superfície do vírion, é possível detectar a presença de *spikes*, trímeros de gp41-gp120, em uma média de 14 por vírion. No interior do envelope, encontra-se um outro envoltório, a matriz, que é constituída pela proteína p17. O capsídeo, que possui

formato cônico é formado pela proteína p24, e no interior dele encontram-se as duas cópias do genoma de RNA fita simples, com polaridade positiva, associadas às proteínas p7 e p6, formando o nucleocapsídeo. As enzimas virais transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR) também são encontradas dentro da partícula viral. Pode ocorrer ainda a presença de proteínas oriundas da célula hospedeira, como o MHC-II (MHC de classe 2) associado ao envelope e a ciclofilina. A associada ao capsídeo (Figura 1.3) (Carter *et al*, 2007)(Larder *et al.*, 2001).

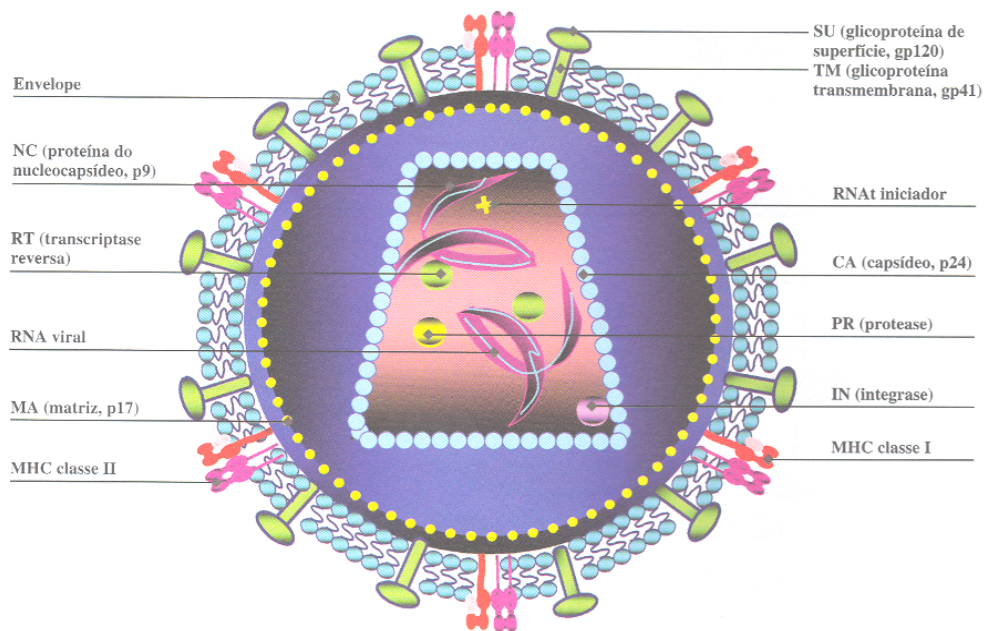


Figura 1.3. Estrutura da partícula do HIV-1 (adaptado de Wigg, 2002).

1.6. Genoma do HIV

O genoma do HIV (Figura 1.4) é relativamente grande, apresentando um número maior de genes quando comparados a outros retrovírus (Cann *et al*, 2005).

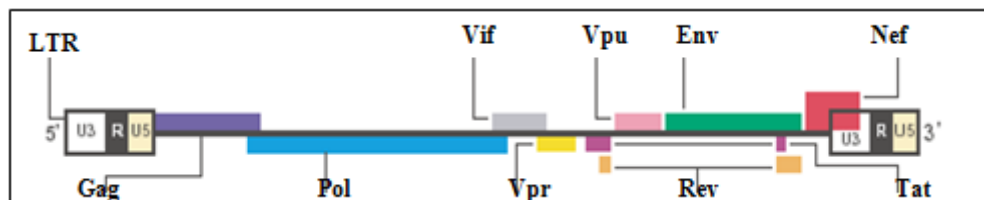


Figura 1.4. Estrutura genômica do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1). Os genes *gag*, *pol* e *env* (barras lilás, azul e verde respectivamente) codificam proteínas estruturais. Os genes *tat* e *rev* (barras roxas e

laranjas respectivamente) codificam proteínas regulatórias. Os genes *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (barras vermelhas, cinzas, amarelas, rosas e azul claras, respectivamente) codificam proteínas acessórias. Nas terminações 3' e 5', encontram-se as sequências repetitivas longas, chamadas de LTRs (Greene e Peterlin, 2002).

As partículas virais possuem duas cópias de RNA de polaridade positiva, sendo que os *virions* podem ser descritos como diplóides. Estas duas moléculas estão presentes dentro dos *virions* na forma de um dímero, formado por pareamento entre bases complementares. Dentro das partículas virais são encontrados ainda uma molécula de RNA transportador (tRNA^{lys-3} no caso do HIV-1 e HIV-2) proveniente da célula hospedeira, que interage por complementaridade de bases a uma região do RNA viral conhecida como *primer binding site* (PBS) (Carter *et al*, 2007).

O genoma do HIV-1 contém nove genes diferentes, sendo três deles comuns a todos os retrovírus: *gag* (que codifica as proteínas estruturais), *pol* (que codifica as enzimas virais protease [PR], transcriptase reversa [RT] e integrase [IN]), além de *env* (que codifica as glicoproteínas do envelope, gp120 e gp 41). Esses genes são considerados estruturais. Os genes *gag*, *pol* e *env* são traduzidos em poliproteínas precursoras, que são posteriormente clivadas por proteases celulares e por uma protease viral (Flint *et al.*, 2004)(Votteler *et al*, 2008)

Diferentemente dos demais retrovírus, o genoma do HIV possui ainda os genes regulatórios, *tat* e *rev*, além de quatro genes acessórios: *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*. Essa denominação de genes acessórios está baseada no fato de que as proteínas oriundas desses genes não são essenciais para a replicação do vírus *in vitro*, entretanto desempenham importante papel *in vivo*, principalmente em relação a aspectos relacionados a evasão e manipulação da resposta imunológica adaptativa e inata (Malim, 2008).

A diferença genômica entre o HIV-1 e o HIV-2 está na presença do gene *vpx* no HIV-2. A proteína Vpr de HIV-2 compartilha a habilidade de induzir parada no ciclo celular em G2 com Vpr de HIV-1, mas Vpx de HIV-2 não possui efeito algum sobre o ciclo celular. Entretanto, Vpx é essencial em células que não estão se dividindo (*non-dividing cells*), como macrófagos e células dendríticas. Devido a origem evolucionária comum, alto grau de homologia e a divergência de funções, Vpx e Vpr de HIV-1 são considerados parálogos (Fletcher *et al.* 1996)(Guyader *et al.* 1989)(Pancio *et al.* 2000)(Yu *et al.* 1991). Flanqueando as extremidades 3' e 5' do provírus, são encontradas longas sequências repetidas

denominadas de LTRs (*long terminal repeats*), que regulam a integração do vírus ao genoma hospedeiro, a expressão gênica e a replicação (Figura 1.4)(Larder *et al.*, 2001)(Wigg, 2002).

O gene *gag* é traduzido em uma poliproteína precursora de 55 kDa, denominada p55 Gag. Essa é clivada pela protease viral em quatro proteínas menores: p17, que forma a matriz; p24, que constitui o capsídeo; p7, que constitui o nucleocapsídeo; p6, que tem função de intermediar a incorporação da proteína Vpr aos *virions*; e dois peptídeos espaçadores p1 e p2. Essas proteínas são encontradas nas partículas virais maduras do HIV-1 (Göttlinger, 2001)(Larder *et al.*, 2001).

O gene *pol* codifica uma poliproteína precursora das enzimas virais PR, RT e IN. A sequência do gene *pol* não possui um códon de iniciação. Assim, não pode ser traduzida de forma independente. As poliproteínas Pol e Gag são traduzidas de maneira fusionada, formando um precursor denominado Gag-Pol. A protease viral cliva o polipeptídeo Pol, separando-o de Gag, e, posteriormente, cliva Pol para gerar PR, RT e a IN. Porém, é somente no meio extracelular, após a liberação do vírus da célula hospedeira, que a protease viral sofre auto-ativação e inicia o processo de clivagem, tornando infecciosa a partícula viral. Todos os produtos do gene *pol* podem ser encontrados dentro das partículas virais do HIV-1 (Larder *et al.*, 2001)(Carter *et al.*, 2007)(Votteler *et al.*, 2008).

O gene *env* codifica uma poliproteína precursora, que é sintetizada na forma de um trímero, com ligações não covalentes entre as subunidades gp120 e gp41 (Flint *et al.*, 2004)(Moore & Doms, 2003).

O gene *tat* codifica um transativador transcricional que é essencial à replicação do HIV-1. Tat é uma proteína originalmente descrita como um ativador do promotor LTR do HIV-1, tendo sido mostrado posteriormente sua capacidade de regular a transcrição reversa, o que afeta a expressão de vários genes celulares e virais. Tat liga-se ao RNA, reconhece uma sequência em forma de *loop*, denominada elemento de resposta à transativação (*transactivation response element- TAR*), localizada na extremidade 5' de todos os RNAs mensageiros do HIV-1. Algumas proteínas celulares ligam-se a TAR, dentre elas uma quinase, que fosforila componentes do complexo da RNA polimerase II. Como resultado dessa ligação, há o aumento na taxa de produção de transcritos virais primários de pelo menos 1000 vezes (Larder *et al.*, 2001)(Flint *et al.*, 2004)(Votteler *et al.*, 2008).

O transcrito completo do HIV possui múltiplos sítios de processamento alternativo

(*splicing*). O processamento alternativo dos RNAs mensageiros é requerido para expressão eficiente dos genes virais. As proteínas Tat, Rev e Nef são processadas na fase inicial da infecção e acumulam-se devido à ativação transcricional produzida por Tat. O acúmulo da proteína Rev é responsável pela mudança da fase inicial para a fase tardia do ciclo de replicação do HIV-1. Rev é uma proteína que se liga ao RNA e reconhece um elemento estrutural específico na região de *env*, denominado elemento de resposta a Rev (*Rev - Response Element- RRE*). Essa proteína ativa a exportação nuclear de transcritos não processados completos ou parcialmente processados, ou seja, que não sofreram processamento e contêm o elemento RRE. Dessa forma, Rev facilita a síntese das proteínas virais estruturais e garante a viabilidade do genoma completo de RNA do HIV-1. Rev também está envolvida no transporte dos transcritos de fase tardia dos genes *vpr*, *vpu* e *vif* para o citoplasma da célula hospedeira. No entanto, esses mRNAs só saem do núcleo após múltiplas cópias de REV ligarem-se nestes mRNAs (Miller *et al.*, 2000) (Larder *et al.*, 2001)(Flint *et al.*, 2004)(Carter *et al.*, 2007).

O gene *nef* (*negative factor*) originalmente recebeu esse nome devido a uma informação incorreta de que seria responsável por regular negativamente a transcrição dos vírus. No entanto, *nef* promove a persistência viral e leva a uma progressão mais rápida para a AIDS. Nef constitui-se numa proteína que interage com outras proteínas da célula hospedeira para facilitar sua resistência à ação do sistema imune e diretamente contribuir para a infectividade do vírus (Kirchoff *et al.*, 1999).

A proteína viral U ou Vpu é essencial à maturação e liberação das partículas virais. Da mesma forma que Vif e Vpr, Vpu tem como alvo para degradação, proteínas celulares da célula hospedeira, utilizando como via as ubiquitinas ligases (Margottin *et al.*, 1998)(Yu *et al.*, 2003)(Hrecka *et al.*, 2007). Vpu também forma canais iônicos em membranas celulares (Schubert *et al.*, 1996). Através desses atributos, ele antagoniza os fatores celulares capazes de restringir a liberação dos virions nascentes das células infectadas. Um dado recente indica que um desses fatores de restrição celular é a proteína transmembrana BST-2/CD317 (*Tetherin*), que retêm virions na superfície da célula (Neil *et al.* 2008)(Van Damme *et al.* 2008).

A proteína viral regulatória “R” ou VPR é incorporada à partícula viral pelo peptídeo p6 de Gag. Vpr foi caracterizada como um importante regulador de apoptose na célula

infectada, existindo fortes evidências de que ela esteja envolvida na sobrevivência viral e progressão à AIDS. Entretanto, esta proteína desempenha outras funções vitais ao ciclo viral, tais como: (i) aumento da eficiência do processo de transcrição reversa; (ii) transativação do promotor do HIV-1 (*long-terminal repeat*, LTR); (iii) facilitação da importação do complexo de pré-integração viral (PIC); (iv) interrupção do ciclo celular no estágio G₂ e modulação da sinalização do receptor de célula T (TCR)(T-cell receptor) (Andersen *et al.*, 2005)(Le Rouzic *et al.*, 2005).

A proteína viral Vif, fator de infectividade viral (*viral infective factor*), tem papel importante na infecção e na replicação do vírus em células não permissivas, sendo essencial para infecções *in vivo*. A principal função de Vif é neutralizar a atividade antiviral de membros da família de citidina deaminases celulares, APOBEC3B, APOBEC3F and APOBEC3G. Na ausência de Vif, APOBEC3G é empacotado nos vírions, resultando na deaminação de citidina em uracila durante a replicação viral, culminando na produção de provírus não funcionais (Holmes *et al.*, 2007)(Soros *et al.*, 2007). As duas últimas proteínas citadas serão analisadas de maneira mais detalhada a seguir. As funções desses genes estão resumidas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Relação dos genes do HIV-1 e algumas de suas funções.

<i>Proteína</i>	<i>Função</i>
Gag	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proteína do Capsídeo se liga ciclofilina “A”. ➤ Proteína Matriz (MA), por miristol auxilia Gag para <i>lipid raft</i> e importa (PIC) para fosforilação. ➤ Proteína associada ao RNA - auxilia no brotamento, interage com Vpr, PTAP-TGS101.
Transcriptase Reserva	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Responsável pela transcrição reversa, com função de DNA polimerase. RNA dependente, RNase H e DNA polimerase – DNA dependente.
Protease	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Realiza o processamento das poliproteínas precursoras virais.
Integrase	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Realiza a integração do DNA proviral.
Envelope (Env)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Clivada no retículo endoplasmático em gp120(SU) e gp41(TM). <ul style="list-style-type: none"> • gp120 se liga a CD4 e ao receptor da quimiocina (CCR5 e CXCR4). • Gp41 medeia fusão com a membrana citoplasmática. • Contém elementos responsivos ao RNA (RRE) que liga a Rev.
Ativador transcricional (Tat)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liga-se a região de ativação transcricional (TAR). <ul style="list-style-type: none"> • Associa-se ao W da ciclina T1 e CDk9. • Aumenta a extensão da RNA Pol II.
Regulador da expressão viral (Rev)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liga-se ao RRE. <ul style="list-style-type: none"> • Inibe o splicing do RNA viral. • Exporta RNA spliced incompleto do núcleo.
Fator de regulação negativa (Nef)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Modulação de CD4/MHC I. <ul style="list-style-type: none"> • Bloqueia apoptose. • Aumenta a infectividade viral. • Altera o estado da ativação celular. • Aumenta patogênese.
Fator de infectividade viral (Vif)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Supera os efeitos inibitórios da célula do hospedeiro. <ul style="list-style-type: none"> • Estabiliza o complexo RT. • Aumenta a infectividade viral. • Auxilia a síntese do DNA proviral e/ou empacotamento viral.
Proteína viral “R” (Vpr)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Retarda a fase G2. <ul style="list-style-type: none"> • Facilita a infecção de Macrófagos.
Proteína viral “U” (Vpu)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Promove a degradação de CD4. <ul style="list-style-type: none"> • Auxilia a liberação do vírus.
Proteína viral “X” (Vpx)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Auxilia na infecção

1.7. Ciclo de replicação do HIV

Da mesma maneira que outros vírus, o HIV replica-se dentro da célula do hospedeiro para garantir sua permanência no mesmo. Para que isso ocorra, precisa passar por um longo caminho desde sua entrada até o núcleo da célula alvo, onde integrará seu material genético (Figura 1.5).

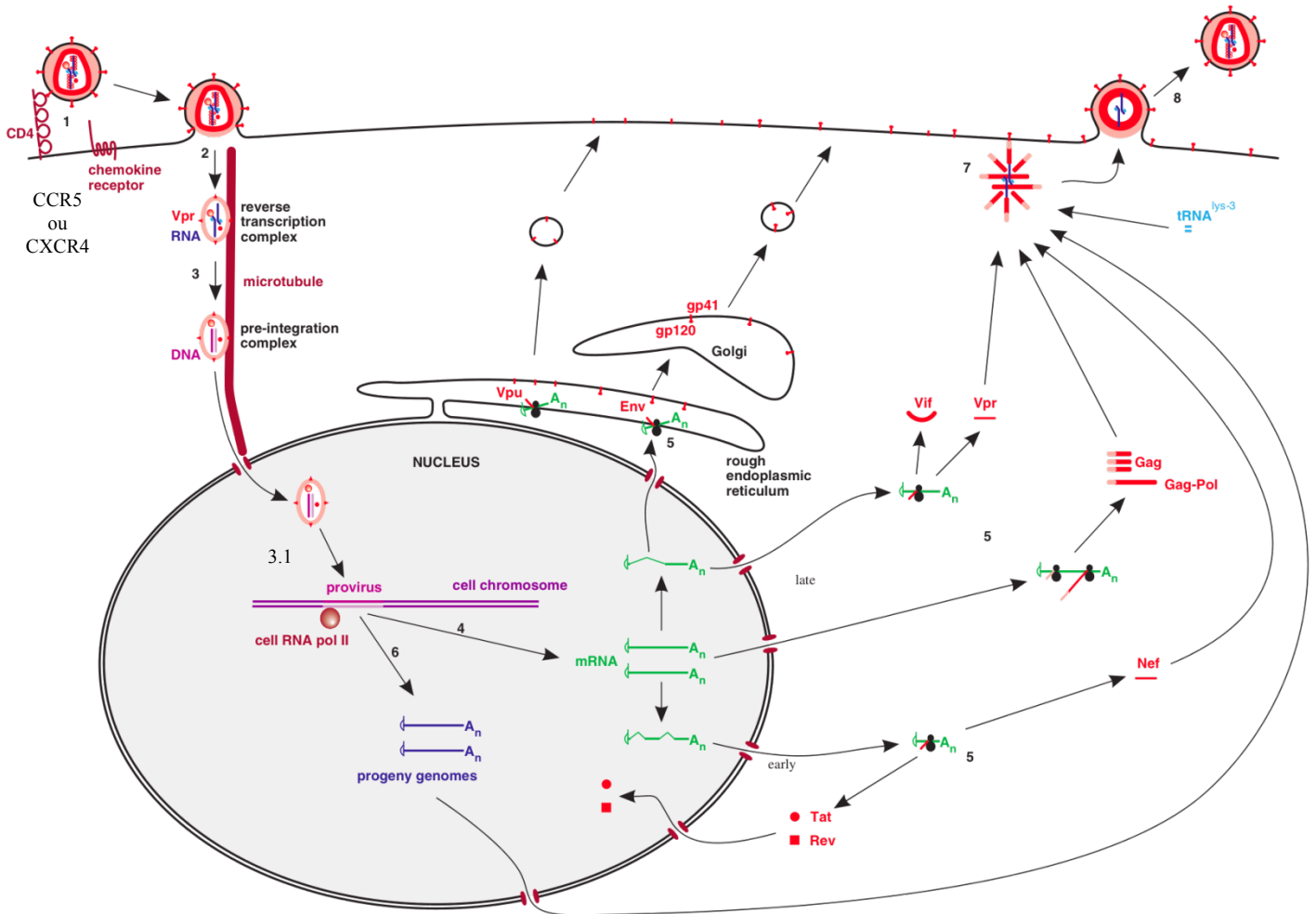


Figura 1.5. Ciclo de replicação do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1) (adaptado de Carter., 2007).

- 1-Ancoramento
- 2-Entrada
- 3- Transcrição reversa
- 3.1-Integração
- 4-transcrição
- 5-Tradução

- 6-Replicação do genoma viral
- 7-Montagem da partícula viral
- 8-Saída

A infecção da célula hospedeira inicia-se pelo reconhecimento do receptor CD4 pela glicoproteína de superfície do vírus, gp120. Em seguida, como consequência de mudanças conformacionais induzidas pela ligação CD4-gp120, outra glicoproteína também presente na superfície viral, a gp41, reconhece um co-receptor, um dos receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4, e esse processo resulta na fusão de ambas as membranas (Feng *et al.*, 1996). A fusão permite que o capsídeo viral alcance o citoplasma. A maioria das linhagens do HIV-1 usa CCR5 como co-receptor, sendo conhecidos como vírus R5. Infectam preferencialmente macrófagos e não induzem a formação de sincícios. As linhagens de vírus que usam o co-receptor CXCR4 são conhecidas como vírus X4 e infectam principalmente linfócitos, induzindo a formação de sincícios. O receptor de quimiocina CCR5 encontra-se na superfície das principais células alvo, como LT CD4⁺, macrófagos e células dendríticas e o co-receptor CXCR4 é encontrado em linfócitos (Clapham *et al.*, 2001)(Clapham *et al.*, 2002)(Milich *et al.*, 1993)(Fouchier, 1995). Em metade das infecções causadas pelo vírus do subtipo B, o surgimento do co-receptor CXCR4 está associado à progressão da doença (Spijkerman *et al.*, 1995).

Uma vez dentro da célula, o vírus abre o capsídeo, por um processo pouco entendido, mas que provavelmente envolve proteínas celulares e virais, como a ciclofilina “A” (Franke, E.K, 1994), Nef e Vif (Schaeffer *et al.*, 2001)(Ohagen, A. e D. Gabuzda., 2000). Logo depois, forma-se um complexo, que recebe o nome de complexo de pré-integração (PIC), o qual compreende as moléculas de RNA viral, molécula de tRNA^{Lys-3} e as proteínas virais: transcriptase reversa, integrase, matriz, nucleocapsídeo, Vpr, Vif e duas proteínas do hospedeiro, HMGI (Y) e a barreira de autointegração (BAF), que se ligam ao DNA viral e auxiliam na sua integração (Chen *et al.*, 1999)(Miller *et al.*, 1997). A RT viral é a responsável pela síntese do DNA dupla fita do vírus.

O PIC se move em direção ao núcleo usando a rede de microtúbulos da célula. Neste processo, a interação de Nef com a proteína celular Vav (um fator de intercâmbio de guanina ou GEF (*guanine nucleotide exchange factor*)) desencadearia uma série de funções efetoras, culminando com o reordenamento do citoesqueleto e conseqüentemente facilitando a migração do PIC para o núcleo (Fackler *et al.*, 1999)(Pulkkinen, 2004). Uma vez na vizinhança do núcleo, o PIC deve enfrentar outro obstáculo, atravessar um poro nuclear significativamente menor que o seu tamanho.

Neste processo, algumas proteínas virais teriam um papel chave, como a proteína viral MA (matriz), que está envolvida neste fenômeno, caracterizando assim um sinal de localização nuclear (NLS), que é reconhecido pelas importinas a e b, as quais fazem parte da via clássica de importação de proteínas para o núcleo.

Após passar por todos esses obstáculos, o DNA proviral se integra em diferentes locais no genoma do hospedeiro, podendo levar a um estado de latência ou de replicação, dependendo do local e da disponibilidade de fatores transcricionais. A integração eficaz do DNA viral dentro do cromossomo, em regiões próximas a genes ativos após a infecção pelo HIV, é mediada pelos integrantes do PIC, citados anteriormente (proteína viral IN e duas proteínas celulares identificadas, como HMGI(Y) e a barreira da autointegração (BAF)(Bushman, 2002). Os provírus da maioria retrovírus são constituídos por uma dupla fita de DNA. Mas o HIV e outros lentivírus possuem uma estrutura conhecida como *DNA flap*, que consiste na formação de um domínio triplo-helicoidal no DNA durante o processo de transcrição reversa e foi descrito como um importante fator na migração do PIC, com papel vital nos estágios iniciais de infecção (Zennou *et al*, 2000)(Carter *et al.*, 2007).

A transcrição do DNA viral é dirigida pelo 5' LTR (*long terminal repeat*), o qual possui sequências promotoras e sítios de ligação a fatores de transcrição, incluindo AP-1 e Sp-1. *Upstream* a essas sequências, são encontrados sítios para a ligação de outros fatores como NF- κ B e NFAT. Uma transcrição eficiente é promovida após a ligação da proteína viral Tat com uma sequência localizada em LTR, que recebe o nome de TAR (*Tat Activating Region*). Essa, por sua vez, possui um sítio de interação com a ciclina T. Tat também se liga a ciclina T, e então a proteína quinase Cdk9 é recrutada e interage com a ciclina T. Essa interação ativa Cdk9, que hiperfosforila o domínio C-terminal da RNA polimerase II, aumentando a elongação dos transcritos virais do HIV-1. Outras proteínas celulares participam do processo de ativação da transcrição por Tat (Lodish *et al.*, 2005)

As funções das proteínas virais Tat e Rev estão relacionadas à transcrição viral. Tat liga-se aos transcritos nascentes e garante que todo o genoma do vírus seja transcrito. Rev liga-se ao RNA viral que sofreu *splicing* incompleto e ao RNA que não sofreu *splicing* e auxilia seu transporte para o citoplasma, enquanto as proteínas virais tardias são traduzidas. Rev é reciclado para ser utilizado novamente no núcleo (Carter *et al*, 2007). A transcrição do genoma viral gera vários transcritos primários, alguns como os codificantes para Tat, Nef e Rev, os quais são processados na ausência de sequências inibitórias de RNA de *splicing* e são transportados para o citoplasma (Yang *et al.*, 2001). Outros são processados de forma incompleta ou não são processados, devido à carência de sítios de

splicing nos transcritos, e a efeitos inibitórios da proteína viral Rev, que interage com alguns fatores celulares (Powell *et al.*, 1997). Estes transcritos codificam algumas proteínas estruturais e proporcionam o genoma viral necessário para ser empacotado dentro do capsídeo. Dessa forma, o equilíbrio entre estes dois mecanismos, *splicing* total e parcial, é requerido para a propagação da infecção.

Alguns genes virais apresentam expressão na fase tardia de replicação do vírus, como Gag e a poliproteína Gag-Pol, traduzidos a partir de transcritos que não sofreram *splicing*. As demais proteínas virais (Vif, Vpr, Vpu e Env) são traduzidas com base em transcritos que sofreram processo de *splicing* de maneira independente. Env e Vpu são traduzidos no retículo endoplasmático rugoso.

Os virions são montados no citoplasma da célula hospedeira e tem como principais componentes as proteínas virais Nef, Vpr, Vif, TR e IN, além de um dímero de RNA. Moléculas de Gag e Gag-Pol formam um arranjo ordenado, e seus domínios ligam-se ao genoma do vírus e em proteínas que serão incorporadas aos virions “nascentes”. Os domínios básicos do NC ligam-se ao genoma viral, inicialmente em um domínio conhecido como ψ , que é a essencial no sinal de “empacotamento”. Os domínios do CA ligam-se a proteína da célula hospedeira ciclofilina A, enquanto a região p6 de Gag liga-se a proteína viral Vpr. Moléculas da proteína Vif são também incorporadas nos virions. Vif tem um papel muito importante na degradação das citidinas deaminases APOBEC3G e APOBEC3F, que poderiam interferir negativamente na replicação do vírus na próxima célula hospedeira. Após a formação do dímero Gag-Pol, a protease sofre um processo autocatalítico de clivagem para a formação das enzimas virais PR, RT e a IN. Em seguida, a protease cliva as poliproteínas de Gag nos constituintes dos virions maduros. Após o recrutamento de proteínas celulares, relacionadas com a formação dos corpos multivesiculares (MVBs), a particular viral utiliza a via de exocitose para formar vesículas intraluminais (Pornillos *et al.*, 2003), o que culmina no brotamento das partículas virais englobadas em uma porção da membrana plasmática da célula.

1.8. A proteína viral R (Vpr)

A proteína viral R (Vpr), originalmente denominada proteína viral regulatória, recebeu essa denominação porque quando sua fase de leitura era interrompida por mutagênese, o vírus resultante apresentava uma replicação mais lenta (Hattori *et al.* 1990)(Ogawa *et al.* 1989)(Wong-Staal *et al.* 1987). A proteína Vpr aparece em dois momentos diferentes durante a replicação viral,

entrando nas partículas virais por meio de uma interação direta com a região p6 da porção C-terminal do precursor de Gag (Planelles *et al.*, 2009). Consequentemente, está presente no citoplasma de células recém infectadas (Tungaturthi *et al.*, 2003). Vpr é então expressa *de novo* pelo provírus, a partir do mRNA tardio. (Schwartz *et al.*, 1991).

1.8.1. Estrutura de Vpr

Apesar de pequena (96 aminoácidos e aproximadamente 14 kDa), Vpr é uma proteína multifuncional (Figura 1.9.1) (página 32). Foi caracterizada como um importante regulador de apoptose na célula infectada, existindo fortes evidências de que ela esteja envolvida na sobrevivência viral e progressão à AIDS (Connor *et al.* 1995) (Somasundaran *et al.*, 2002)(Lum *et al.*, 2003). Entretanto, esta proteína desempenha outras funções vitais ao ciclo viral, tais como: (i) aumento da eficiência e da precisão no processo de transcrição reversa; (ii) transativação do promotor do HIV-1 (*long-terminal repeat*, LTR); (iii) facilitação da importação do complexo de pré-integração viral (PIC); e (iv) modulação da sinalização do receptor de célula T (TCR)(T-cell receptor)(Andersen *et al.*, 2005)(Le Rouzic *et al.*, 2005).

A estrutura molecular de Vpr consiste em 3 α -hélices abrangendo os resíduos 17-33, 38-50 e 55-77, flanqueados por estruturas flexíveis, não estruturadas dos domínios N e C terminal (Figura 1.6 e 1.7) (Morellet *et al.*, 2003). Quatro prolina conservadas (posições 5, 10, 14 e 35), sujeitas a isomerização cis/trans, são encontradas no domínio N-terminal (Bruns *et al.*, 2003).

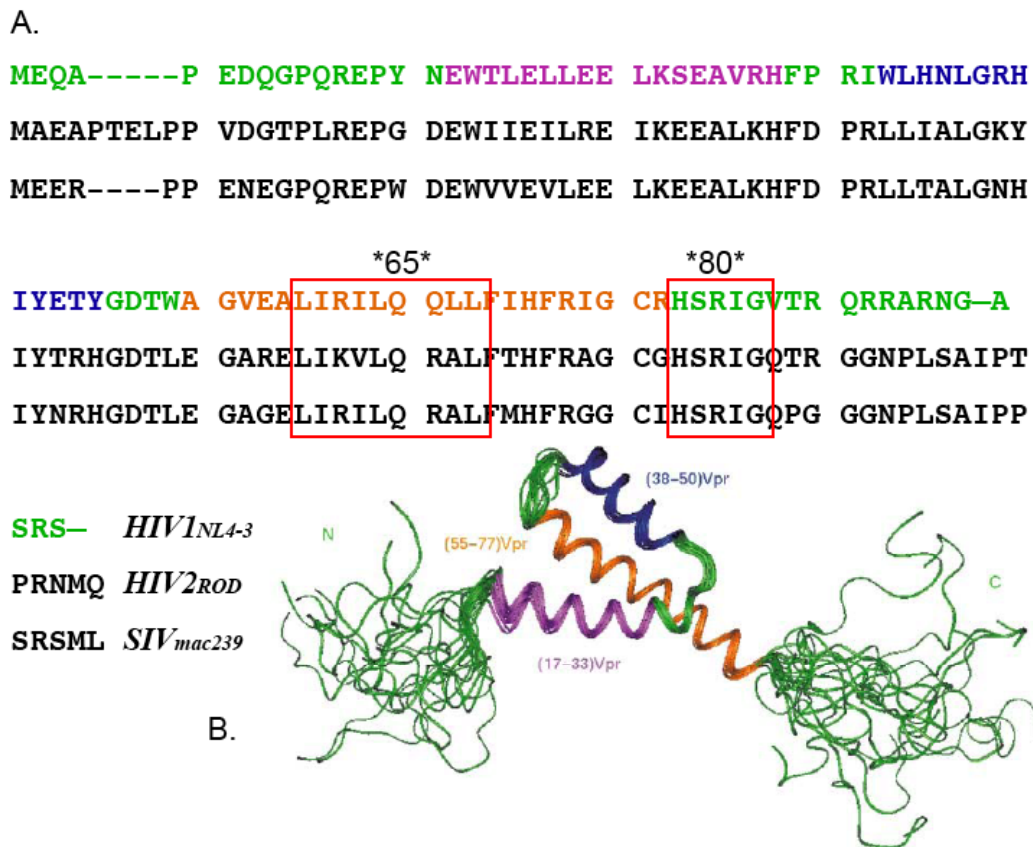


Figura 1.6. Estrutura de Vpr. (A) A seqüência de Vpr encontra-se conservada ao longo dos lentivírus de primatas. Os aminoácidos das posições 65^a e 80^a encontram-se, respectivamente, no meio dos domínios LR e HSRIG. Sabe-se que a integridade de HSRIG é essencial para o efeito de Vpr sobre o ciclo celular. (B) A estrutura terciária de Vpr. Em verde estão representadas as regiões flexíveis de Vpr e em púrpura, azul e laranja estão, respectivamente, a 1^a, 2^a e 3^a hélices. (adaptado de Morelet *et al.*, 2003)

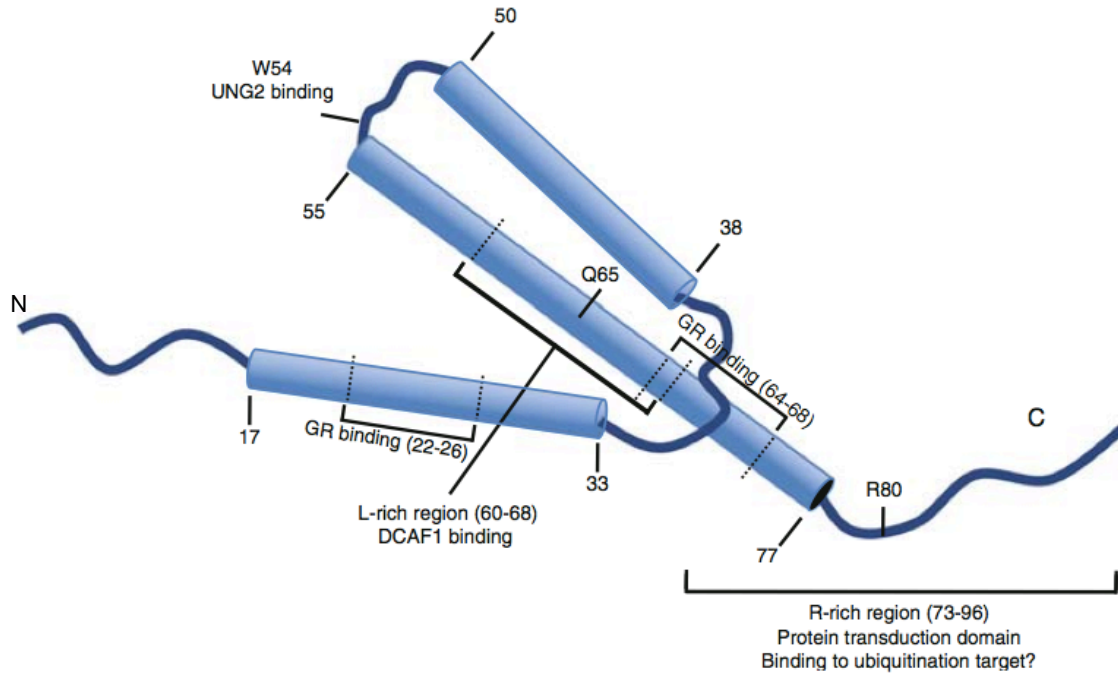


Figura 1.7. Estrutura de Vpr determinada por ressonância magnética. Os cilindros representam as regiões de alfa hélice compreendidas entre os aminoácidos indicados por números. N (amino terminal); C (carboxi terminal); GR (receptor de glicocorticoide). Algumas regiões encontram-se marcadas com suas respectivas funções. A região C terminal está associada a interação com a proteína celular alvo de Vpr para degradação. (adaptado de Morellet *et al.*, 2003)(Planelles *et al.*, 2009)

A ciclofilina A foi anteriormente descrita como capaz de interagir com Vpr através das prolina 14 e 35, assegurando o correto dobramento da proteína viral (Zander *et al.*, 2003). O carboxi terminal de Vpr contém seis resíduos de arginina (R) entre as posições 73 e 96. Esse domínio apresenta similaridade em relação a domínios protéicos de transdução, ricos em arginina (R), o que pode explicar as propriedades de transdução de Vpr, incluindo a capacidade de atravessar a bicamada lipídica da membrana celular (Coeytaux *et al.*, 2003) (Kichler *et al.*, 2000)(Sherman *et al.*, 2002). Em adição, a terceira alfa hélice de Vpr é rica em resíduos de leucina (Schuler *et al.* 1999), e um lado dessa hélice apresenta um trecho de cadeias laterais hidrofóbicas que formam um motivo zipper de leucina (Schuler *et al.* 1999). Essa região é responsável pela formação dos oligômeros de Vpr (Fritz *et al.*, 2008)(Mahalingam *et al.*, 1997)(Schuler *et al.*, 1999)(Wang *et al.*, 1996) e a possível interação com alguns parceiros celulares. Ainda não está totalmente elucidada a forma com que o estado multimérico ou dimérico afeta as funções de Vpr.

Um estudo recente usando citometria de fluxo com fluorescência e transferência de energia por ressonância em tempo real confirmou que moléculas de Vpr podem ficar ligadas dentro das células (Bolton *et al.*, 2007). Essa ligação entre moléculas de Vpr é dependente de uma região de ligação localizada na terceira α -hélice (Figura 5) e mutações nessa região, como I63E e I70S, e não prejudicam a habilidade de Vpr induzir parada no ciclo celular na fase G2 (Bolton *et al.*, 2007). Já mutações no domínio rico em arginina, como R80A e R87/88A, não impedem a associação Vpr-Vpr, mas tornaram esse mutantes incapazes de provocar parada no ciclo celular em G2 (Bolton *et al.*, 2007). Portanto a dimerização de Vpr não é requerida para indução de alterações no ciclo celular.

A marca principal da patogênese do HIV-1 é a depleção progressiva das células T CD4⁺ e a grande propensão dessas células á apoptose. Nesse sentido, Vpr é um importante fator apoptótico. Foi caracterizado ainda um mecanismo de apoptose mediado por Vpr, envolvendo a interação física do domínio Vpr₇₁₋₈₂ (*mitochondriotoxic domain*), contendo a sequência conservada ₇₁HFRIGCRHSRIG-₈₂, com o translocador de nucleotídeo adenina (ANT). A família das proteínas fosfatases Ser/Thr (PP2A) interage com várias proteínas virais para regular vias de crescimento celular e apoptose. Estudos anteriores envolvendo duplo híbrido indicaram o envolvimento de PP2A₁ com a indução de parada do ciclo celular na fase G2 (de Noronha *et al.*, 1993)(Takadori-Kondo *et al.*,1996). Resultados recentes de estudos envolvendo PP2A e Vpr₇₇₋₉₂ apontam essa região de Vpr como um novo domínio funcional da proteína, responsável pela internalização de Vpr em células não infectadas e com funções pró-apoptóticas. A aparente redundância na porção final dessa proteína quanto a indução de apoptose, apenas reforça a importância da mesma na infecção pelo HIV (Godet *et al.*, 2010). As principais funções dessa proteína e sua interação com algumas proteínas celulares serão destacadas a seguir.

1.8.2. Funções de Vpr

Nesta seção, descreveremos as proteínas celulares que muito provavelmente interagem com Vpr.

1.8.2.1. Interações de Vpr com a maquinaria de reparo de DNA

No início da infecção, a proteína Vpr aumenta a eficiência da transcrição reversa interagindo com a enzima de reparo celular, a uracil DNA glicosilase (UNG2), a qual tem como função retirar os dUTPs incorporados erroneamente no DNA. A transcriptase reversa do HIV-1 é uma DNA polimerase dependente de RNA, propensa a erro, sendo que a deleção de *vpr* leva a um aumento de erro em 4 a 18 vezes, dependendo do tipo celular (Harrington *et al.*, 2005)(Iordanskiy *et al.*, 2006) (Mansky *et al.*, 1996)(Mansky *et al.*, 1995).

Vpr interage com UNG2, usando um resíduo de triptofano (Trp) na posição 54, localizado no *loop* que conecta a segunda e terceira α hélice de Vpr. Mansky e colaboradores propuseram que a interação entre Vpr/UNG2 em células que estão produzindo vírus contribui para a incorporação de UNG2 cataliticamente ativa na partículas virais, onde UNG2 pode diretamente influenciar a precisão da transcriptase reversa e talvez assim contribuir para a habilidade do HIV-1 de se replicar em macrófagos. Recentemente, um novo papel resultante da interação Vpr-UNG2 foi proposto, tendo por base a observação que Vpr levou a degradação proteassomal de UNG2 (Schrofelbauer *et al.*, 2005). Esse grupo propôs um efeito negativo na replicação viral, em decorrência do aumento no número de sítios abásicos nos transcritos virais. Apesar das proteínas APOBEC3 serem alvos da proteína viral Vif, a atividade residual da proteína APOBEC3 pode deixar alguns resíduos de uracila que, quando reconhecidos pela maquinaria de reparo de DNA da célula hospedeira, podem ser convertidos em sítios abásicos. Isso produz um efeito negativo na replicação viral de duas formas: (i) sítios abásicos podem bloquear a síntese da fita senso (positiva) de DNA pela transcriptase reversa; ou (ii) esses sítios podem ser alvos de nucleases apurínicas/apirimidínicas (Yang *et al.*, 2007). A presença de resíduos de uracila nos transcritos intermediários da transcrição reversa, na ausência de UNG, impede o pareamento para a síntese da fita positiva (Klarmann *et al.*, 2003). Portanto, os modelos propostos por Schrofelbauer e colaboradores e Mansky e colaboradores para explicar a interação entre Vpr/UNG2 são antagônicos, considerando que um propõe efeito benéfico, enquanto o outro propõe um efeito deletério. Em 2006, Kaiser e Emerman não encontraram nenhuma papel relacionado a presença de UNG2 ou sua atividade na replicação viral, mas essa questão ainda permanece controverso (Planelles *et al.*, 2009)

1.8.2.2. Transativação do LTR

Quando o DNA proviral é integrado ao DNA da célula hospedeira, Vpr promove a transcrição dos genes virais por meio da direta interação com o promotor LTR (*long terminal repeat*), resultando no recrutamento de vários fatores de transcrição ou co-fatores para promotor LTR.

Essa transativação do LTR parece ser um efeito modesto, em comparação ao exercido pela proteína TAT, mas age de forma sinérgica com ela (Cohen *et al.*, 1990) (Sawaya *et al.*, 2000). Um fato interessante é que esta função encontra-se conservada entre os diferentes isolados do HIV-1, HIV-2, SIVmac e SIVagm (Philippon *et al.*, 1999), sugerindo ser uma importante função *in vivo*. A transativação mediada por Vpr também foi relacionada a capacidade de interromper o ciclo celular na fase G₂ (Goh *et al.*, 1998), uma vez que eleva a produção e regulação de genes celulares que podem aumentar a permissividade à infecção viral. Um modelo proposto envolve a interação com várias proteínas regulatórias celulares, como o receptor de glicocorticóides (GR), o complexo p300 / CBP (Kino *et al.*, 2002) e fatores de transcrição SP1, NF-κB e TFIIB (Hogan *et al.*, 2003) (Amini *et al.*, 2004).

É importante mencionar que Vpr promove a transcrição dos genes do HIV-1, não-integrados (*nef*) e pré-integrados ao material genético do hospedeiro (Vpr aumenta a expressão de genes como *gag* e *nef*) (Poon *et al.*, 2007) (Poon *et al.*, 2003). Vpr promove a transativação de LTR por meio da fosforilação de IκB, o que resulta na ligação entre NF-κB e Vpr, no motivo LxxLL de Vpr. Posteriormente ocorre a translocação de NF-κB para o núcleo, e subsequente ligação de NF-κB ao elemento responsivo de LTR, resultando em aumento de transcrição do gene, mediado por NF-κB e Sp1 (Varin *et al.*, 2005).

Outra maneira de Vpr promover a transativação do LTR ocorre pela interação dessa proteína com o fator de transcrição TFIIB, provocando inclusive uma mudança de conformação nesse fator (Agostini *et al.*, 1999). Vpr é um adaptador entre p300/CBP e GR, na formação de um complexo estável, que funciona como um coativador na transcrição de genes por LTR (Kino *et al.*, 2002). Análises mutacionais indicaram que a ligação de p300/CBP com Vpr, ocorre na porção C-terminal da proteína viral, uma região crítica na indução de interrupção do ciclo celular na fase G₂. Isso sugere uma possível relação entre a interrupção causada por Vpr no ciclo celular, e a transcrição dos genes virais. Vpr compõe ainda outro complexo, formado juntamente com p300 e a proteína celular p21 (WAF1). Esse complexo é responsável por reduzir a inibição mediada por

p21, na saída de células da fase G1. Nesse processo a proteína viral assegura a transição de células infectadas, da fase G1 para a fase S, resultando em aumento de células com interrupção na fase G2 do ciclo celular (Felzien *et al.*, 1998)(Goh *et al.*, 1998). A ligação entre vpr e a região C/EBP de LTR e em regiões adjacentes (sítio de NF- κ B) é necessária para a transcrição de genes do HIV-1 subtipo B, em macrófagos (Liu *et al.*, 1999). Essa interação com o a região do variante 1 de C/EBP tem relação com o estado tardio da infecção pelo HIV-1 e com o estado de demência (HIVD)(Burdo *et al.*, 2004).

1.8.2.3. Interação de Vpr com algumas proteínas celulares

ATR

ATR é uma proteína quinase integrante do ponto de checagem (*checkpoint*) do ciclo celular. Estudos realizados por Roshal e colaboradores (Roshal *et al.*, 2003), mostraram que Vpr induz a parada do ciclo celular em G2, por meio da ativação de ATR. Esta última funciona como um sensor para eventuais problemas durante a replicação. Ela pode ser acionada pela depleção de deoxiribonucleotídeos, inibição de topoisomerasas ou luz ultravioleta, que provoca dano ao DNA (McGowan *et al.*, 2004).

ATR pode ativar o ponto de checagem na fase G2 do ciclo celular, simultaneamente à fosforilação inibitória de Cdk1, e de maneira independente de p53 e ATM (ataxia telangiectasia-mutated). O alvo de ATR para controlar a ativação do *checkpoint* na fase G2 é Chk1. Vpr estimula a maquinaria envolvida na detecção de danos ao DNA, sem envolver outras proteínas do *checkpoint*, como p53 e ATM. Aparentemente não ocorre uma interação direta entre Vpr e ATR. O envolvimento de Vpr no ciclo celular ocorre por meio de sua interação com proteínas reguladoras do ciclo celular (proteínas adaptadoras da “família” 14-3-3). As proteínas 14-3-3 ligam-se a proteínas “alvo”, como Chk1, Cdc25C, Wee1 e Cdk2 e regulam sua atividade modificando a localização celular, estabilidade ou prevenindo a desfosforilação. Vpr se liga ao carboxi-terminal das proteínas 14-3-3, na região conhecida por se ligar a fosfoproteínas (Hermeking *et al.*, 2006).

Cdc25

Goh e colaboradores reportaram que Vpr liga-se e provoca a inativação de Cdc25C, a fosfatase responsável por regular positivamente Cdk1. Foi relatado também que a mutação na região de Vpr que se liga em Cdc25, resulta em uma proteína Vpr incapaz de induzir interrupção do ciclo celular em G2 (Goh *et al.*, 2004). A inibição de Cdc25C por Vpr pode ser interpretada como uma consequência de uma sinalização no início da via (*upstream*), onde Chk1 pode fosforilar Cdc25C na serina 216, resultando na inibição de Cdc25C. Entretanto, considerando que Vpr interage diretamente com Cdc25C, é possível que Vpr atue de duas formas e aparentemente de maneira redundante. É possível ainda que Vpr consiga inibir Cdc25C por um processo indireto, interagindo com as proteínas 14-3-3 (Kino *et al.*, 2005)(Planelles *et al.*, 2009).

Wee1

Consistente com o modelo no qual Vpr ativa a via responsiva ao dano no DNA, Yuan e colaboradores (Yuan *et al.*, 2003)(Yuan *et al.*, 2004) encontraram que Vpr ativa um regulador negativo de Cdk1, a proteína quinase Wee1. Também foi mostrado a incapacidade de Vpr induzir parada no ciclo celular na fase G2 na ausência de Wee. A interação da proteína viral e Wee1 resulta em uma regulação positiva da proteína quinase, resultando na fosforilação inibitória da proteína Cdk1 (Kamata *et al.*, 2008).

1.8.2.4. Vpr e a manipulação do sistema Ubiquitina/Proteassoma

Uma importante função desempenhada por Vpr é sua capacidade de inibir a proliferação da célula hospedeira, bloqueando as células infectadas na fase G2/M do ciclo celular (He *et al.*, 1995)(Jowett *et al.* 1995)(Re *et al.*, 1995). Acredita-se que a parada do ciclo celular em G2 induzida por Vpr seja capaz de suprimir a resposta imunológica por meio da prevenção da expansão clonal das células T (Poon *et al.*, 1998) e de promover um ambiente celular otimizado para o máximo nível de replicação viral (Goh *et al.*, 1998).

Um mecanismo conhecido de parada no ciclo celular envolvendo Vpr consiste na inibição da fosfatase Cdc25 por meio de sua interação com a proteína viral e também pela ativação da proteína quinase Wee1. Essas duas enzimas citadas regulam Cdc2/Cdk1, ciclina dependente de quinase 1, que participa na regulação do ciclo celular (Figura 1.9)(de Noronha *et al.*, 2001)(Elder *et al.*, 2001)(Goh *et al.*, 2004)(Kino *et al.*, 2005)(Masuda *et al.*, 2000).

Alguns progressos foram conquistados nos últimos anos, principalmente com relação ao entendimento da indução da parada do ciclo celular em G2 por Vpr e ao envolvimento do sistema ubiquitina/proteassoma (UPS) nesse processo (Figura 1.8). Em particular destaca-se uma ubiquitina ligase (*Cullin ubiquitin E3 ligase*) específica, conhecida como Cul4A-DDB1-DCAF1/ VprBP, associada ao processo de parada do ciclo da célula em G2 (Belzile *et al.*, 2007)(DeHart *et al.*, 2007)(Hrecka *et al.*, 2007)(Le Rouzic *et al.*, 2007)(Schrofelbauer *et al.*, 2007)(Tan *et al.*, 2007)(Wen *et al.*, 2007).

A interação com a E3 ligase é mediada por meio da ligação direta de VprBD/DCAF1 com Vpr (Belzile *et al.*, 2007)(Zhang *et al.*, 2001). Essa associação com Vpr faz com que essa proteína promova a atividade da E3 ligase (Hrecka *et al.*, 2007). Posteriormente ocorre a poliubiquitinação das ligações K48 (Belzile *et al.*, 2010) e subsequente degradação de uma suposta proteína celular ainda desconhecida, resultando na ativação do *checkpoint* na fase G2 (DeHart *et al.*, 2008). A região de Vpr que se liga a DCAF1 foi caracterizada como uma região rica em leucinas, no motivo 60-LIRILQQLL-68 da terceira α hélice de Vpr (Zhao *et al.*, 1994).

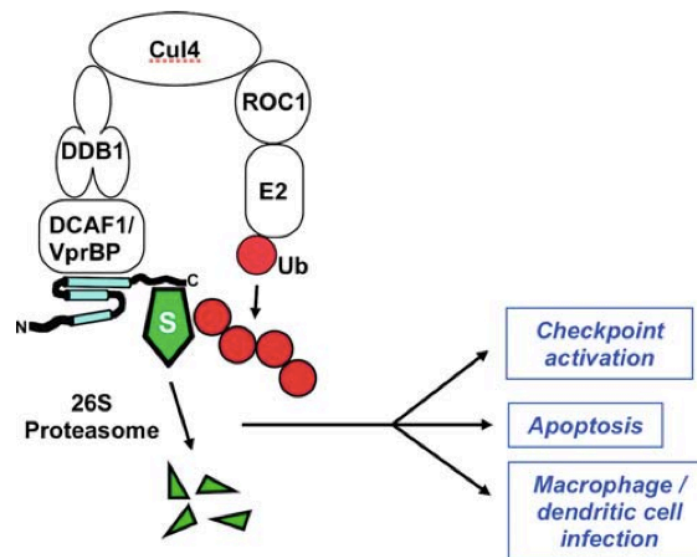


Figura 1.8. Complexo ubiquitina ligase recrutado por Vpr. Modelo mais aceito atualmente para o recrutamento e degradação de uma proteína celular ainda desconhecida (substrato [S] em verde), por meio do complexo Cul4/DDB1/ DCAF1 ubiquitina ligase. A proteína celular é ubiquitinada e posteriormente degradada pelo proteassoma 26 S, o que resulta nos diversos efeitos provocados por Vpr (Planelles *et al.*, 2009).

A interrupção do ciclo celular na fase G2 resulta em dois efeitos conhecidos, que contribuem para a patogênese do HIV-1. O primeiro é o aumento da atividade transcricional do promotor viral durante G2/M. O que eleva a produção de partículas virais. O acúmulo de células infectadas em G2 pode favorecer a tradução seletiva de produtos virais, devido a presença de um suposto local de acesso do ribossomo no genoma do HIV-1. O outro efeito seria o comprometimento das células infectadas, que resultaria na morte celular por apoptose (Brasey *et al.*, 2003)(Andersen *et al.*, 2008)(Goh *et al.*, 1998)(Hrimech *et al.*, 1999)(Zhu *et al.*, 2001).

1.8.2.5. Interação de Vpr com o poro nuclear e os elementos de transporte nuclear

Apesar da falta de um sinal de localização nuclear (NLS) regular, Vpr apresenta características de proteínas localizadas no núcleo e é rapidamente direcionada para esta região celular após a infecção (Depienne *et al.*, 2000)(Di Marzio *et al.*, 1995)(Kamata *et al.*, 2000)(Lu *et al.*, 1993). Inicialmente, acreditava-se que a via importina α dependente seria o caminho utilizado por Vpr para acessar o núcleo celular (Popov *et al.*, 1998)(Vodicka *et al.*, 1998). Também foi proposta a existência de uma via alternativa, ainda não indentificada, para explicar o movimento de Vpr em direção ao núcleo. Seria distinta das vias clássicas de transporte de proteínas pelo complexo do poro nuclear (NPC), normalmente dependentes de M9 e NLS (sinal de localização nuclear) (Jenkins *et al.*, 1998). A interação entre Vpr e importina α foi recentemente reexaminada (Kamata *et al.*, 2005)(Nitahara-Kasahara *et al.*, 2007). Esses estudos apontaram que Vpr é transportado para o núcleo somente por importina α , independentemente de importina B (Kamata *et al.*, 2005). No entanto, Vpr é uma proteína bastante dinâmica, capaz de movimentar entre o núcleo e o citoplasma (Jenkins *et al.*, 2001)(Le Rouzic *et al.*, 2002)(Sherman *et al.*, 2001)(Sherman *et al.*, 2003). Essa capacidade está ligada a uma região distal rica em leucina, que pode formar um sinal clássico de exportação, reconhecido por meio da maquinaria dependente de CRM1 (Sherman *et al.*, 2001)(Sherman *et al.*, 2003).

Vpr apresenta uma grande afinidade pelo envelope nuclear (NE). Diversos grupos já relataram a capacidade de Vpr de interagir com componentes do complexo do poro nuclear (Fouchier *et al.*, 1998)(Le Rouzic *et al.*, 2002)(Popov *et al.*, 1998)(Vodicka *et al.*, 1998).

Estudos anteriores revelaram que Vpr se liga a várias nucleoporinas humanas, como p54, p58 e hCG1. (Fouchier *et al.*, 1998)(Popov *et al.*, 1998)(Vodicka *et al.*, 1998)(Le Rouzic *et al.*, 2002).

O papel de Vpr no envelope nuclear permanece desconhecido, mas recentemente foi sugerido que a atuação de Vpr no complexo do poro nuclear não é essencial, entretanto pode facilitar a replicação do HIV-1 em macrófagos (Jacquot *et al.*, 2007). Essas observações podem ser relacionadas às contribuições da proteína viral Vpr ao complexo de pré-integração viral (PIC), que contém o DNA viral, no movimento em direção ao complexo do poro nuclear (NPC), culminando no deslocamento do complexo (PIC) para o compartimento nuclear. Vpr é capaz de promover pequenas fissuras e rupturas transientes no envelope nuclear, levando a redistribuição inapropriada de reguladores do ciclo celular, incluindo Wee1, Cdc25 e ciclina B para o citoplasma da célula hospedeira (de Noronha *et al.*, 2001). O mecanismo molecular envolvido nesse processo permanece desconhecido. Uma possível explicação é que a interação de Vpr com as nucleoporinas resulta numa montagem incorreta do complexo de poro nuclear, provocando alterações na arquitetura do envelope nuclear, o que pode ocasionar alterações na localização de reguladores do ciclo celular. Isso pode explicar a interrupção causada por Vpr na fase G2 do ciclo da célula. Além disso, modificações estruturais do envelope nuclear podem afetar a estrutura ou a fidelidade da cromatina, levando a uma possível ativação da proteína relacionada à Rad3 (ATR), o que corrobora uma relação de causa e efeito entre o acúmulo de Vpr no envelope nuclear e a indução de parada do ciclo celular na fase G2, e conseqüentemente a apoptose (Jacquot *et al.*, 2007).

1.8.2.6. Vpr e apoptose

Uma importante propriedade relacionada a esta proteína é a indução de apoptose em células T infectadas ou não, assim como em outros tipos celulares como linfócitos B, células progenitoras hematopoiéticas, células citotóxicas naturais (NK), macrófagos, células dendríticas e neurônios (Groux *et al.*, 1992)(Connor *et al.*, 1995)(Le Rouzic *et al.*, 2005) (Yedavalli *et al.*, 2005)(Iordanskiy *et al.*, 2006).

Inicialmente, Vpr foi descrita como uma proteína inibidora e posteriormente como indutora de apoptose. Atualmente acredita-se que, nos estágios iniciais da doença, onde a

concentração em circulação é baixa, Vpr atuaria como um fator anti-apoptótico. Já no estágio tardio, quando os níveis de expressão da proteína são altos, atuaria como um fator pró-apoptótico. Um dos mecanismos anti-apoptóticos possíveis seria mediado pela ligação a uma proteína mitocondrial anti-apoptótica, o fator HAX-1, induzindo sua saída para o citoplasma onde diminuiria o efeito pró-apoptótico de Vpr (Yedavalli *et al.*, 2005).

Dentre os possíveis mecanismos pró-apoptóticos, encontram-se os da via mitocondrial, onde a ligação de Vpr a um fator relacionado à permeabilidade da organela, o translocador de nucleotídeo adenina (ANT) (Sabbah *et al.*, 2006) levaria a liberação do citocromo C e conseqüente ativação da caspase 9 (Muthumani *et al.*, 2002).

Outra proteína celular importante na indução de apoptose por Vpr é a proteína capaz de formar poros na mitocôndria, Bax. A interação entre Vpr e Bax produz mudança conformacional e ativação desta última. Em outro mecanismo não menos provável, Vpr induziria ou mimetizaria dano no DNA, processo que levaria a parada do ciclo celular na fase G₂, o que por sua vez desencadearia a morte celular por apoptose (Zhu *et al.*, 2001)(Andersen *et al.*, 2005).

Um modelo alternativo para explicar o processo apoptótico induzido por Vpr propõe que a apoptose é uma consequência na interrupção prolongada do ciclo celular em G₂. De maneira específica esse modelo sugere: (i) a atividade pró-apoptótica de Vpr em paralelo com a parada do ciclo celular em G₂; (ii) as duas atividades de Vpr necessitam da ativação de ATR; e (iii) a apoptose mostrou-se dependente da fosforilação de Brca1 mediada por ATR, levando a um aumento da expressão da proteína GADD45 α (Figura 1.9)(Andersen *et al.*, 2006)(Jacquot *et al.*, 2007)(Yuan *et al.*, 2003).

Os macrófagos infectados pelo HIV-1 são naturalmente mais resistentes aos efeitos citopáticos do vírus (Gartner *et al.*, 1986)(Gorry *et al.*, 2005)(Kedzierska *et al.*, 2002). Conseqüentemente, tornam-se reservatórios virais, capazes de disseminar o vírus para outros tecidos, incluindo o cérebro (Ghorpade *et al.*, 1998)(Orenstein *et al.*, 1997).

Estudos realizados por Zimmerman e colaboradores, mostraram a importância da via de sinalização de ATR no processo de apoptose provocado por Vpr e a ausência da expressão de algumas proteínas presentes nessa via em macrófagos (ATR, Chk1 e Rad17), o que explica, em parte, a resistência dos macrófagos aos efeitos citopáticos dos HIV-1 (Zimmerman *et al.* 2006).

1.8.2.7. Vpr e o receptor de glicocorticóide

Vpr é capaz de interagir e formar um complexo com o receptor de glicocorticóide (GR)(Refaeli *et al.*, 1995), aumentando a atividade dos corticoesteróides, atuando como um co-ativador (Kino *et al.*, 1999)(Refaeli *et al.*, 1995)(Sherman *et al.*, 2000). Essa interação é mediada por um motivo LXXLL, presente em Vpr, que se liga também com o co-ativador do receptor de esteróide-1 e com as proteínas p300/CREB (Kino *et al.*, 1999)(Refaeli *et al.*, 1995)(Sherman *et al.*, 2000).

Sherman e colaboradores identificaram que a interrupção do ciclo celular em G2 e a ligação ao GR (*glucocorticoid receptor*) são fenótipos independentes de Vpr, tendo por base experimentos onde mutantes de Vpr com incapacidade de interromper o ciclo celular em G2 mativeram a capacidade de se ligar a GR. Além disso, a atividade de transativador exercida por Vpr, atribuída a sua capacidade de interromper o ciclo celular em G2, mostrou-se, pelo menos parcialmente, independente da atuação de Vpr como coativador de GR (Sherman *et al.*, 2000).

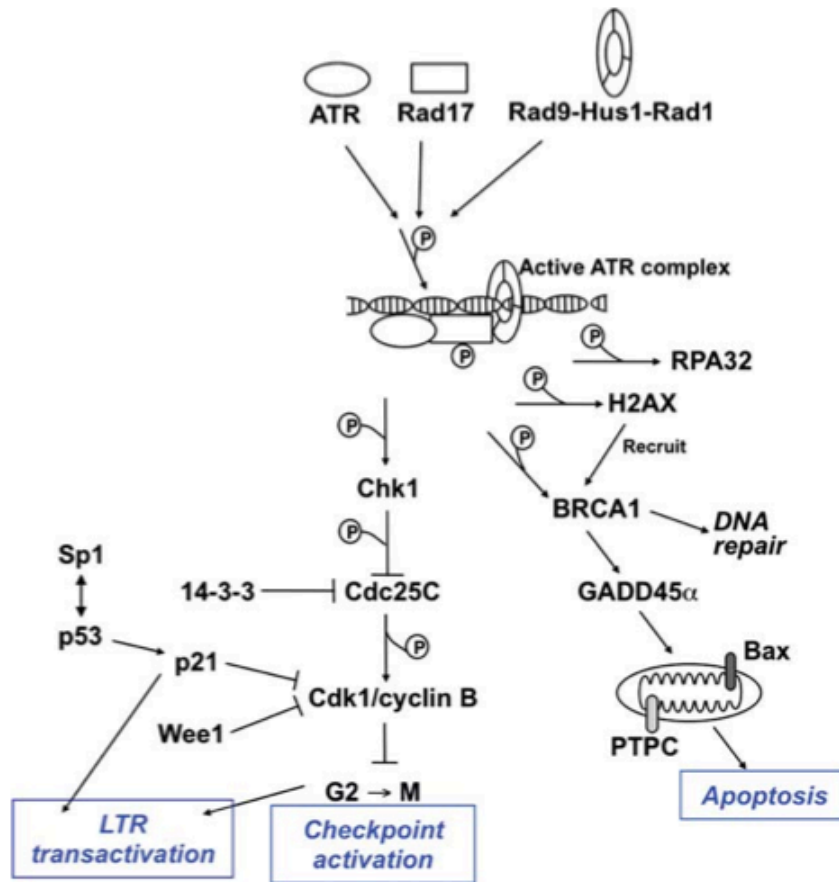


Figura 1.9. Vias de sinalização relacionadas a Vpr. Vias de sinalização propostas para mediar a parada do ciclo celular na fase G2, apoptose e transativação do LTR, por meio de Vpr do HIV-1 (Planelles *et al.*, 2009)

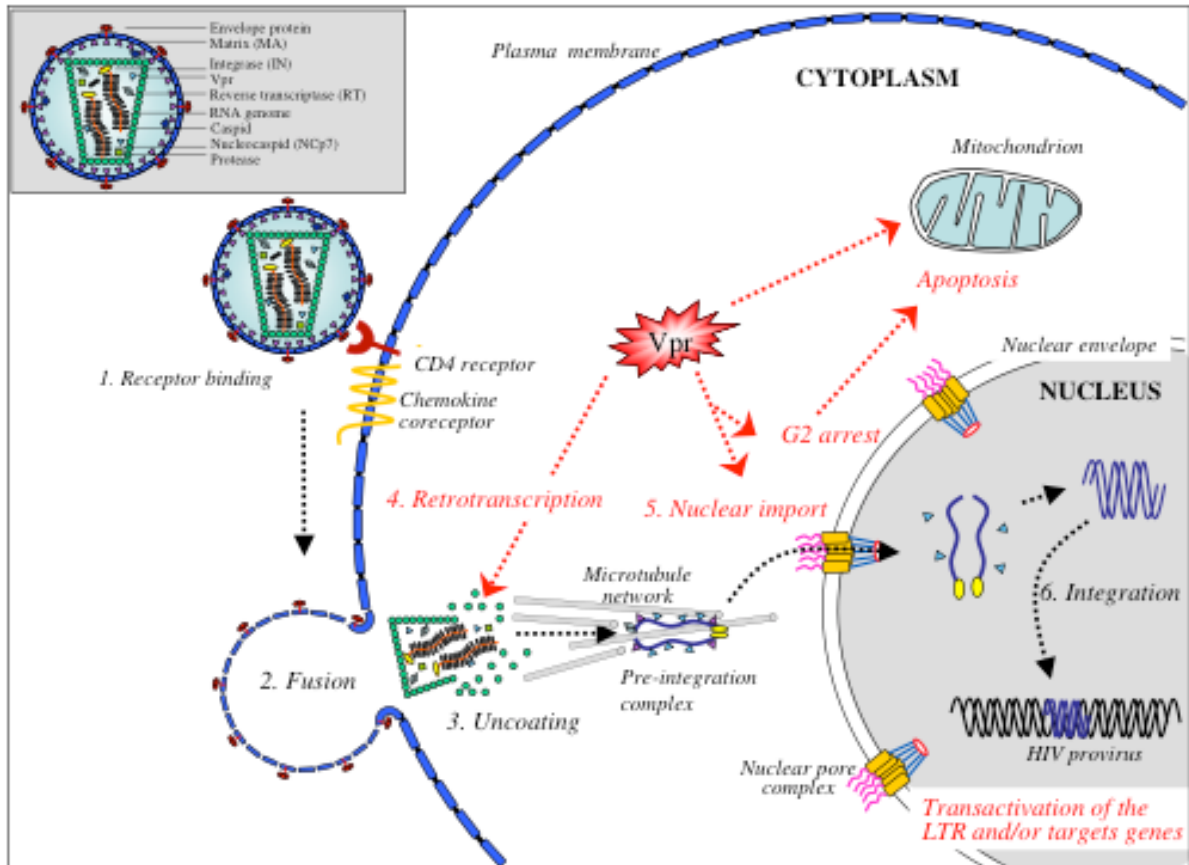


Figura 1.9.1. Primeiros passos da infecção pelo HIV-1 na célula alvo. Estão destacados os eventos funcionais no qual Vpr está envolvido. Vpr possui múltiplas funções durante o ciclo de vida do vírus, incluindo a fidelidade do processo de transcrição reversa, a importação do DNA viral para o núcleo celular, como parte do complexo de pré-integração viral, controle da progressão do ciclo celular, regulação da apoptose e transativação de LTR, assim como de genes da célula hospedeira (Le Rouzic *et al.*, 2005).

1.9. A proteína Vif

Vif (*Viral infectivity factor*) é uma proteína citoplasmática do HIV-1 de 192 aminoácidos e 23 kDa essencial para a replicação em células T primárias *in vivo*. (Malim *et al.*, 2009)(Chiu *et al.*, 2009). Vif é importante em células não-permissivas, mas dispensável para a replicação do vírus em células permissivas. Essa proteína viral é responsável por bloquear a atividade antiviral de uma família de proteínas, chamadas citidinas deaminases, com destaque para APOBEC3G e APOBEC3F.

O mecanismo utilizado por Vif para desempenhar essa função consiste na mobilização dos componentes da via de degradação celular, levando a degradação proteossomal, principalmente de APOBEC3G (A3G). Na ausência de Vif, APOBEC3G é

incorporado na partícula viral (Sheehy *et al.*, 2003)(Stopak *et al.*, 2003)(Mariani *et al.*, 2003), inibindo a síntese do DNA viral durante o processo de transcrição reversa, catalisando a deaminação de citidina em uracila durante a síntese da fita negativa de cDNA (Conticello *et al.*, 2005)(Holmes *et al.*, 2007)(Miyagi *et al.* 2007)(Bishop *et al.*, 2008). Essas alterações levam a degradação do DNA viral, com a transição de guanosina para adenosina nas sequências provirais (conhecido como hipermutação G para A). APOBEC 3G tem como alvo preferencial dinucleotídeos GG, mudando TGG (W) para TAA (*stop codon* ou código de parada)(Esnault *et al.*, 2005)(Jern *et al.*, 2007).

Vif funciona como um adaptador entre o complexo cullin 5 E3 ubiquitina ligase e APOBEC 3G, levando a sua poliubiquitinação e posterior degradação proteossomal, prevenindo o empacotamento de A3G nos virions nascentes (Kirchhoff *et al.*, 2010). Em seguida, serão feitas algumas análises mais detalhadas sobre: (i) APOBEC3G e APOBEC3F; (ii) processo de degradação proteossomal de A3G e A3F; (iii) ligação entre Vif e APOBEC3; e (iv) algumas funções desempenhadas por Vif.

1.9.1. Proteínas APOBEC3G e APOBEC3F

A família APOBEC (*apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide*) é formada por citidinas deaminases que compõem um grande grupo de proteínas com o motivo conservado H-X-E-(X)27-28-P-C-X2-4-C, capaz de converter citosina em uracila no RNA ou DNA. Esse domínio funcional está localizado na porção N-terminal de APOBEC. O processo de conversão de citosina em uracila pode ser resumido da seguinte forma: os resíduos de histidina e cisteína se ligam a um íon zinco, e na presença de água o resíduo glutamato promove o transporte de prótons que culmina na liberação de um grupo amina na posição C4 da citosina, convertendo-a uracila (Niewiadomska *et al.*, 2009). Nos humanos, os genes da subfamília APOBEC3 estão codificados em *tandem* no cromossomo 22 (Jarmuz *et al.*, 2002). Uma das funções atribuídas aos diversos membros da família APOBEC3 na célula é sua capacidade de inibir diversos retroelementos endógenos, assim como diversos retrovírus.

A3G (*apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide 3G*) foi a primeira enzima desta família, que se descobriu capaz de inibir o HIV-1 e a que possui maior efeito anti-viral. Depois da A3G, a A3F (*apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide 3F*) é o segundo

membro desta família mais eficiente na supressão de infecções de HIV-1(Δvif)(Yu *et al.*, 2004a).

1.9.2. Processo de degradação proteassomal de A3G e A3F

As proteínas APOBEC3 são importantes armas celulares no combate de retrovírus como o HIV-1. Entretanto, os *lentivírus* SIV e HIV codificam a proteína viral Vif, que pode induzir a poliubiquitinação e degradação de múltiplas moléculas APOBEC3 (Yu *et al.*, 2003)(Mehle *et al.*, 2004)(Stopak *et al.*, 2003)(Marin *et al.*, 2003)(Conticello *et al.*, 2003)(Sheehy *et al.*, 2003)(Liu *et al.*, 2004)(Liu *et al.*, 2005).

A proteína Vif forma um complexo contendo as proteínas (Figura 1.8), *Cul5*, *EloginB*, *EloginC*, e *Rbx1*, denominado E3 ubiquitina ligase (Figura 1.9.2)(Yu *et al.*, 2003)(Mehle *et al.*, 2004)(Liu *et al.*, 2005)(Yu *et al.*, 2004b)(Luo *et al.*, 2005) Kobayashi *et al.*, 2005).

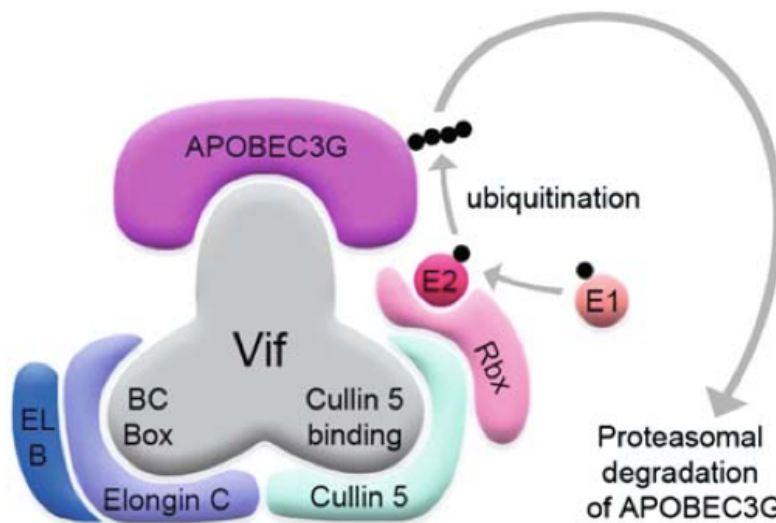


Figura 1.9.2. Complexo de degradação proteassomal de A3G e A3F. Vif se liga a *EloginC* por meio do domínio específico *BC-Box*. *EloginC* interage também com *EloginB*. O complexo formado por Vif-EloginC-EloginB se liga a *Cullin5*, formando o complexo Cul5-EloB/C-Vif E3 ligase. *Cul5* se liga a *Rbx* que recruta a enzima conjugadora E2 ubiquitina. A enzima E1 ativa a ubiquitina, que é transientemente transferida para E2, e em seguida passa para a molécula alvo APOBEC3. A poliubiquitinação de APOBEC3, resulta em sua degradação pelo proteossoma 26S.

Esse complexo (E3 ubiquitina ligase) é crucial para a regulação de processos celulares, como mitose e o ciclo celular, por meio da degradação de determinadas proteínas (Pickart, 2004). Um grupo de proteínas que compõem o complexo E3 ubiquitina ligase, mais especificamente as proteínas *cullin*, são as responsáveis por intermediar a especificidade na degradação das proteínas. As proteínas *cullin* formam um arcabouço, onde as demais proteínas constituintes do complexo poderão se ligar e conduzir o substrato para a enzima conjugadora E2 ubiquitina. A proteína *cullin* que se liga a Vif, é *Cul5*, comumente associada as moléculas adaptadoras *ElonginC* e *ElonginB*. *ElonginC* reconhece substratos que contenham a região *BC-box*. O motivo SLQxLA em Vif é altamente conservado em proteínas Vif lentivirais, e forma um motivo vírus específico chamado *BC-box*, que participa da ligação com *ElonginC*, que por sua vez se liga a *ElonginB*, que interage com *Cul5*.

Vif se liga a *Cul5*, em dois sítios altamente conservados, o motivo Hx5Cx17-18Cx3-5H (Luo *et al.*, 2005)(Xiao *et al.*, 2007)(Mehle *et al.*, 2006) e LPx4L que se encontra *downstream* (Stanley *et al.*, 2008). O primeiro motivo é responsável pela ligação do zinco, responsável por estabilizar a molécula, e o segundo é uma interface hidrofóbica altamente conservada responsável pela seleção feita por *Cul5*. Após o complexo E3 ubiquitina ligase interagir com A3G e encaminhá-la para a proximidade da enzima conjugadora E2-ubiquitina, induz a poliubiquitinação da deaminase, uma modificação pós-traducional, que marca a proteína para degradação pelo proteossoma 26S.

Além desta função, existem também evidências que Vif pode ajudar a suprimir a tradução do mRNA da A3G, sendo que este efeito combinado com a aceleração da degradação proteossomal resultam na depleção eficiente dos níveis intracelulares da desaminase contrapondo a sua atividade anti-viral.

Funções adicionais tem sido atribuídas a Vif, como prevenir a encapsidação de A3G nos vírions de uma forma independente da degradação, como a exclusão física da A3G dos locais de formação das partículas virais, ou inibição da encapsidação da deaminase por competição da ligação com componentes virais como o nucleocapsídeo da poliproteína Gag ou o RNA viral.

1.9.3. Ligação entre Vif e APOBEC3

Vif possui diversos elementos estruturais que permitem a interação com várias moléculas. Além dos elementos estruturais de Vif, necessários para a interação com as proteínas APOBEC3 (Figura 1.9.3), existem também alguns domínios nas deaminases, importantes para a interação com Vif.

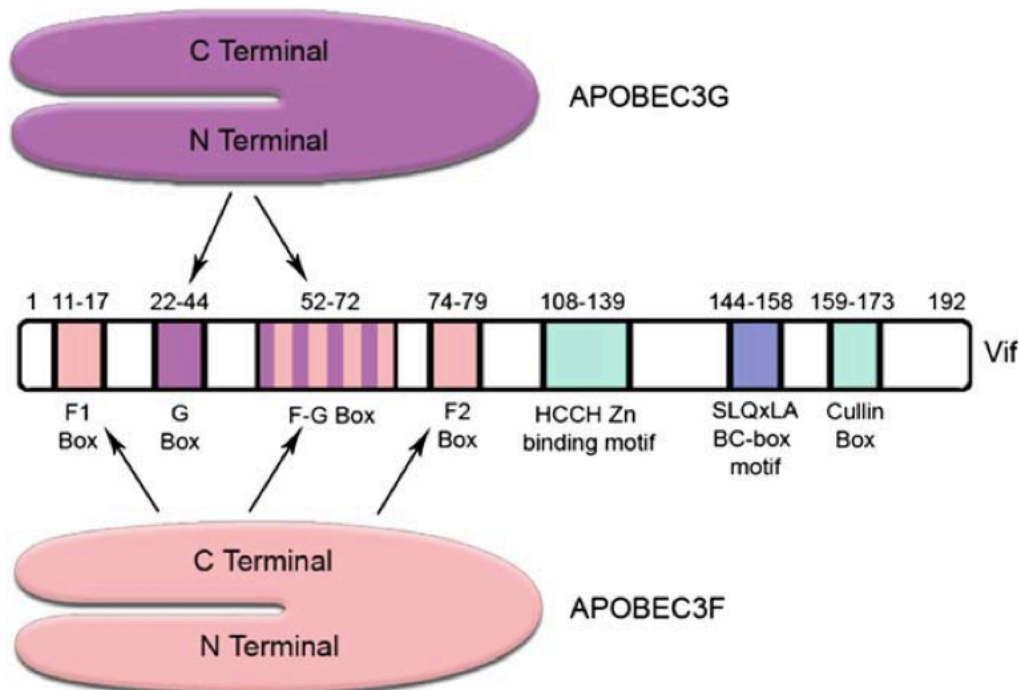


Figura 1.9.3. Ligação entre Vif e APOBEC3. Vários domínios para a interação entre Vif e APOBEC3. Além do mapeamento de domínios de ligação a outras proteínas, A3F e A3G possuem diferentes regiões de interação em Vif.

A porção N-terminal da citidina deaminase A3G é a região que interage com Vif (Conticello *et al.*, 2003). Enquanto em A3F, a porção C-terminal é suficiente para interação e degradação por Vif (Zhang *et al.*, 2008). Uma região presente em Vif de HIV-1, compreendendo os aminoácidos entre 22 e 44, mostrou-se importante para supressão de A3G, mas não para A3F (Tian *et al.*, 2006)(Simon *et al.*, 2005)(Schrofelbauer *et al.* 2006)(Russell *et al.*, 2007)(He *et al.*, 2008). No entanto, outra região entre os aminoácidos 52 e 72 foi caracterizada como importante na supressão de ambas as deaminases (A3G e A3F)(He *et al.*, 2008)

Várias regiões de Vif determinam a especificidade de ligação a diversas APOBEC3 e outras proteínas celulares. Assim, as proteínas Vif de vírus de diferentes espécies podem exercer seletividade espécie-específica dentre as proteínas que elas degradam. Desta forma, Vif de HIV-1 só é capaz de inibir A3G humana, e o único aminoácido que determina essa especificidade é o aspartato na posição 128 em A3G. Vif de SIVagm, que também é incapaz de inibir a A3G humana ou de macaco (Rhesus).

Uma substituição na posição 128 pelo resíduo equivalente em Agm (African Green Monkeys)(D128K) foi suficiente para reverter a especificidade das proteínas Vif do HIV-1 e SIVagm, para a ligação e degradação dos seus respectivos A3G humano e Agm. (Bogerd *et al.*, 2004)(Schrofelbauer *et al.*, 2004)(Mangeat *et al.*, 2004)(Xu *et al.*, 2004).

A Fosforilação das proteínas Vif e A3G também possuem importante papel na modulação dessas interações. Vif pode ser fosforilado em diferentes serinas e treoninas: T96, S144, e T188 (Yang *et al.*, 1998)(Yang *et al.*, 1996). Mutações nesses resíduos conservados não afetam a ligação entre Vif e A3G, ou mesmo a degradação de A3G (Mehle *et al.*, 2004). Entretanto, mutações que previnem a fosforilação da serina na posição S144 na região *BC-box* de Vif diminuem a função de Vif, por inibir sua interação com *ElonginC*, dificultando o processo de degradação proteossomal. Um estudo recente propôs que A3G também pode ser fosforilada (Shirakawa *et al.*, 2008). Shirakawa e colaboradores demonstraram a capacidade da proteína Kinase A (PKA) de se ligar e fosforilar A3G na posição 32 (treonina). A fosforilação da treonina nessa posição parece reduzir a interação entre Vif e A3G, além de reduzir os níveis de degradação e ubiquitinação de A3G.

Estudos de modelos em computador e de mutagênese, também foram usados para estudar a interação de dois aminoácidos presentes em A3G (T32 e R24), considerados importantes para ligação e posterior degradação por Vif. Portanto, a fosforilação pode ser outro mecanismo pelo qual a interação entre Vif, A3G e a maquinaria de degradação proteossomal podem ser regulados (Niewiadomska *et al.*, 2009)

1.9.4. Outras funções de Vif e interação com proteínas celulares

Além dos efeitos antivirais de Vif por meio da degradação das proteínas APOBEC3, vários outros estudos descrevem Vif como um indutor de atraso no ciclo celular (Sakai *et al.*, 2006)(Wang *et al.*, 2007)(Dehart *et al.*, 2007).

A proteína viral Vpr é o principal responsável por provocar a interrupção do ciclo celular na fase G2, observada em células T CD4+(He *et al.*, 1995)(Jowett *et al.*, 1995)(Stewart *et al.*, 1997). Inesperadamente, porém, estudos em células infectadas pelo HIV-1, na ausência de Vpr, apresentaram um acúmulo de células em G2. Através de experimentos na presença e na ausência de Vif, foi possível confirmar que esse fenômeno é dependente de Vif (Sakai *et al.*, 2006). Vif faz uso da mesma maquinaria utilizada na degradação de APOBEC3, para provocar o atraso do ciclo celular. No entanto o substrato celular responsável pelo atraso de células em G2, degradado por meio da maquinaria formada por Cul5 E3 ligase, ainda não foi identificado. (DeHart *et al.*, 2008).

Vif se liga a diversas proteínas celulares. Ku70 é uma delas e está envolvida no mecanismo de reparo de quebra da fita dupla de DNA, constituindo-se em um dos componentes do complexo de pré-integração viral do HIV-1 (Li *et al.*, 2001).

O fator nuclear SP140, também interage com Vif (Madani *et al.*, 2002). SP140 é expresso em células não permissivas. A expressão de Vif nessas células causa um efeito de espalhamento nas manchas ou locais de concentração dessa proteína nuclear, ou a sua retenção no citoplasma (Madani *et al.*, 2002). Estas manchas são conhecidas como corpos PML e estão relacionados a algumas funções na transcrição, reparo de DNA, defesa viral, *stress* celular, regulação do ciclo celular, proteólise e apoptose (Bernardi *et al.*, 2007). Ciclofilina A e a tirosina quinase Hck, são outras proteínas da célula que interagem com Vif (Hassaine *et al.*, 2001)(Billich *et al.*, 1995).

Capítulo 2. Relevância da pesquisa & Objetivos

2.1. Relevância da Pesquisa

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) caracteriza-se por uma imunossupressão progressiva e aumento da infectividade e replicação viral. Apesar dos exatos mecanismos moleculares envolvidos nos mecanismos patogênicos envolvidos não terem sido completamente elucidados, diversos fatores genéticos do hospedeiro e do vírus foram descritos. Dentre os fatores virais, encontram-se a presença de alterações em domínios protéicos em regiões biologicamente ativas de várias proteínas virais acessórias como Tat, Nef, Vif e Vpr (Azad *et al.*, 2000)(Roshal *et al.*, 2001)(Sakai *et al.* 2006). A proteína Vpr, foi caracterizada como um importante regulador de apoptose (Le Rouzic *et al.*, 2005) e existem fortes evidências de que ela esteja envolvida na sobrevivência viral e progressão à AIDS (Connor, Chen *et al.* 1995) (Somasundaran *et al.*, 2002)(Lum *et al.*, 2003). Já a proteína viral Vif, tem como principal função inibir um grupo de proteínas celulares (APOBEC3), responsáveis por combater o vírus. Além disso, Vif foi descrita como capaz de produzir um atraso no ciclo da célula (Dehart *et al.*, 2008)

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar as sequências dos genes virais acessórios vif e vpr presentes em dois diferentes momentos de infecção em indivíduos HIV-1 positivos.

2.2. Objetivo Geral

Caracterizar as sequências dos genes virais vif e vpr presentes em dois diferentes momentos de infecção em indivíduos HIV-1 positivos.

2.3. Objetivos Específicos

- Amplificar, clonar e sequenciar os alelos de vif e vpr.
- Identificar possíveis alterações na sequência dos alelos de ambos os genes e correlacioná-las com marcadores clínicos de progressão à doença.
- Realizar análises filogenéticas das sequências dos alelos dos genes vif e vpr.
- Determinar o impacto das alterações detectadas na estrutura terciária de ambas as proteínas.

Capítulo 3. Material e Métodos

3.1. Material de Estudo

Foram utilizadas amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), pertencentes a um grupo de 10 pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)(Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Dados laboratoriais de amostras de 10 pacientes em dois estágios da infecção pelo HIV-1 pertencentes ao banco de sangue Osher Center for Integrative Medicine/UCSF – UCSF, Positive Health Program, São Francisco/Califórnia, EUA. Em negrito se encontram os pacientes cujas sequências foram analisadas.

Código	Data da Coleta (Estágios inicial(E) e tardio(L))	LT-CD4 ⁺ (cel./mm ³)	T-CD8 ⁺ (cel./mm ³)	Carga Viral (n ^o cópias/ml)
539 – AS00 14021	29/11/2000 E1	690	989	67409
	27/03/2006 L1	441	1113	-----
721 – AS02 07524	08/04/2002 E2	700	960	6047
	17/07/2003 L2	240	600	24877
774 – AS02 17297	14/08/2002 E3	688	544	108094
	27/01/2006 L3	336	848	17501
842 – AS03 10532	22/05/2003 E4	595	595	39600
	08/08/2005 L4	359	635	39147
892 – AS03 19989	27/10/2003 E5	924	1204	32992
	14/02/2005 L5	530	1325	81628
1324 – AS04 03363	18/02/2004 E6	884	1014	258
	05/04/2007 L6	528	1488	9040
1415 – AS05 00875	14/01/2005 E7	618	948	6634
	26/04/2006 L7	323	1140	17698
1442 – AS05 07846	03/06/2005 E8	1156	2482	2820
	22/02/2007 L8	832	2016	944
1450 – AS05 09350	07/07/2005 E9	796	640	22544
	12/04/2007 L9	192	708	81710
1475 – AS05 15033	25/10/2005 E10	570	1266	130029
	13/02/2007 L10	266	854	19602

Os pacientes não foram submetidos à terapia anti-retroviral e monitorados durante o período de 2000 a 2007, no Osher Center for Integrative Medicine/UCSF – UCSF Positive Health Program, San Fransisco, Califórnia, EUA. O material foi gentilmente cedido pelo Dr. Frederick Hecht, da Universidade de San Francisco-UCSF, EUA, como parte de um projeto colaborativo

entre o Laboratório de Virologia Molecular da UnB e o laboratório do Dr. Frederick Hecht. A coleta do sangue foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos do UCSF/Osher Center for Integrative Medicine.

As amostras de cada paciente foram identificadas como inicial (*early* [E]) ou tardia (*late* [L]), de acordo com a data em que as coletas de sangue foram efetuadas. Cada indivíduo recebeu uma numeração de 1 até 10 no intuito de facilitar sua identificação (Tabela 3.1).

3.2. Extração de DNA genômico

O DNA genômico de células mononucleares de sangue periférico, correspondentes aos 10 pacientes em dois diferentes períodos (E e L) foram extraídos segundo o protocolo descrito em (Sambrook *et al.*, 2001). Inicialmente, 2 ml de meio de congelamento RPMI/DMSO contendo aproximadamente 10^6 células foram centrifugados a 1500 rpm por 8 minutos. O pellet formado foi ressuspensionado em 30 μ l de proteinase K (concentração final de 66 μ l/ml).

Em seguida foi adicionado 470 μ l de tampão de lise de leucócitos (SLGB)(Tris-Cl 10 mM pH 6,0; EDTA 10 mM pH 8,0; NaCl 50 mM; SDS 0,2%), com uma posterior incubação de três horas a 55°C. Após esse período de incubação, foi realizada a adição de 500 μ l de solução de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico - 24:25:1 – fenol equilibrado) seguido de inversão e centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, foi transferida apenas a fase aquosa (onde se encontra o DNA) para um novo tubo tipo eppendorf de 2 ml. Foi feita então a adição de 500 μ l de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico – 24:1).

Foram repetidos os passos de inversão para misturar os componentes, e as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriormente descritas: 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. Novamente a fase aquosa foi transferida para um tubo eppendorf de 2 ml, onde foi adicionado 250 μ l de solução de precipitação de proteínas (SPP)(Acetato de Amônio 7,5 M).

Após homogeneizar por inversão e incubar em banho-maria a 55°C por 15 minutos, a mistura foi centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf de 2,0 ml. Na etapa de precipitação do DNA, acrescentou-se 750 μ l de álcool isopropílico absoluto previamente resfriado. O tubo ficou

por 30 minutos no freezer a -80°C , depois da homogeneização por inversão. O conteúdo foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C .

Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o pellet contendo o DNA foi lavado (sem ressuspender) com 750 μl de etanol 70% resfriado. Depois de repetir as condições anteriores de centrifugação (10000 rpm por 15 minutos a 4°C), o álcool foi desprezado por inversão sob papel absorvente. O DNA foi então ressuspendido em 100 μl de água deionizada (mili Q) e parte foi armazenada em uma alíquota para uso (na geladeira a 4°C) e uma alíquota para estoque (-20°C no freezer).

3.3. Quantificação das amostras de DNA

As amostras de DNA genômico e as amplificadas por PCR foram quantificadas por meio de dois métodos: (i) eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), utilizando-se um marcador de peso molecular de 100ng/ μl (Invitrogen Corporation); e (ii) espectrofotometria, para determinar o grau de pureza, o qual foi avaliado numa absorbância que compreende os comprimentos de ondas de 260nm a 280nm.

Ambas as amostras foram quantificadas no aparelho NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (Thermo Scientific). Para a utilização desse aparelho, é necessário 1,5 μl de DNA, que no caso do DNA genômico foi diluído seguindo as diluições seriadas 1:10, 1:100 e 1:1000 para obtenção do melhor resultado. O sistema é capaz de cobrir uma ampla faixa de comprimento de onda. A gota de DNA, contendo 1,5 μl , é depositada no pequeno orifício do aparelho para captação do material, que realiza análise e apresenta, por meio de um programa de computador (Nanodrop ND-3300 2.6.0), todos os resultados referentes ao DNA analisado, como a quantificação em ng/ μl e a pureza por meio dos parâmetros acima citados.

3.4. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Com objetivo de garantir que o *pool* dos alelos de vpr e vif amplificados sejam representativos do *pool* presente em cada momento da infecção, foram tomados os seguintes cuidados: (i) o DNA genômico de células de sangue periférico foi extraído sem passagem prévia das células mononucleares, por qualquer tipo de cultura *in vitro*; (ii) foi utilizada uma alta quantidade de DNA genômico, 750 ng a 1 μg , o que garantiu a presença de

aproximadamente uma média de 130 integrações de DNA proviral por amostra (Connor, Chen *et al.* 1995).

Por outro lado, para diminuir a possibilidade de amplificação inespecífica, o *pool* de alelos de *vpr* presentes nos estágios iniciais e finais da infecção foi amplificado por meio de da técnica de *nested* PCR (Figura 3.1).

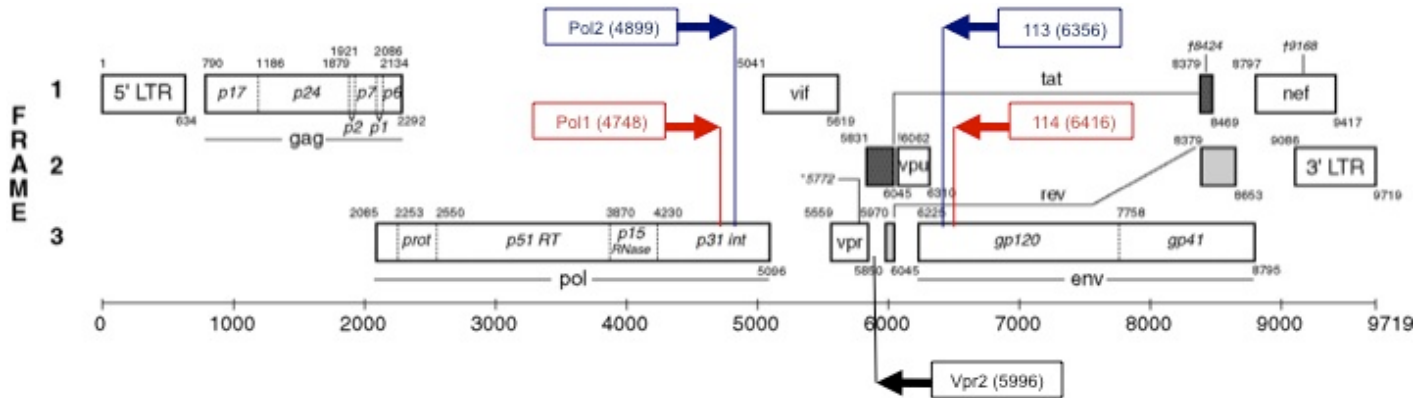


Figura 3.1. Estratégia de amplificação de alelos de *vpr* e *vif*. A região contendo ambos os genes foi amplificada utilizando os iniciadores Pol1 (4748) e 114 (6416) (setas vermelhas) e os iniciadores Pol2 (4899) e 113 (6356) (setas azuis), por meio de da técnica de *nested* PCR, descrita anteriormente. A seta preta corresponde ao iniciador Vpr2 (5996), usado posteriormente no sequenciamento das amostras (adaptado de Los Alamos)

A primeira reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: 1X Pfx Amplification Buffer, 1 mM de $MgSO_4$; 0,3 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 0,3 μM de cada *primer* e uma unidade (0,4 μl) de Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). Vale ressaltar que se trata de uma DNA polimerase recombinante e altamente processiva, com atividade exonuclease de *proofreading* 3'-5'. Além disso, essa enzima é do tipo *hot start* o que aumenta sua especificidade e sensibilidade.

Após a primeira reação de PCR, foi realizada a segunda reação de *nested* PCR, nas mesmas condições e utilizando-se 1 μl da primeira reação de PCR. Os iniciadores utilizados, assim como as regiões nas quais eles anelam em relação ao DNA do isolado HXB2, e o programa de PCR utilizados encontram-se descritos a seguir. Os iniciadores foram testados em uma reação de PCR separada, utilizando como DNA *template* ou molde o plamídeo pBRNL4.3, que contém os genes *Vif* e *Vpr*, presentes no estudo. Em todas as reações, foi usado um controle negativo, no qual, no lugar do DNA, foi utilizada água deionizada (mili-Q).

Os oligonucleotídeos usados para amplificação dos alelos de vif e vpr foram:

Pol1 (4748): 5' - GACAGCAGTACAAATGGCAGTATTC - 3'
114 (6416): 5' - GTACCTCTGTATCATATGCTTTAGCAT - 3' } 1669 pb

Pol2 (4899): 5' - CGGGTTTATTACAGGGACAGCAG - 3'
113 (6356): 5' - CACAAAATAGAGTGGTGGTTGCTTCCT - 3' } 1485 pb

O programa de PCR usado para amplificação dos alelos de vif e vpr foi:

94°C - 5 min; (94°C - 45 seg; 59°C - 1 min; 68°C - 2 min) x 32; 68°C - 10 min ; 4°C - ∞

3.5. Clonagem

As etapas de clonagem e sequenciamento foram realizadas no Departamento de Patologia, da Divisão de Imunologia e Microbiologia da Universidade de Utah/Estados Unidos, durante estágio de seis meses (setembro de 2010 a março de 2011), numa colaboração com o Laboratório de Virologia Molecular da UnB.

Antes da clonagem, os produtos de PCR foram purificados a partir do gel de agarose 1%, utilizando o kit de extração de banda *QIAquick Gel Extraction Kit-QIAGEN*. Os fragmentos amplificados, com aproximadamente 1485 pb, foram clonados no vetor pCR[®] II-Blunt-TOPO[®] (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a amplificação dos diferentes produtos de PCR, 4ul de cada reação foram usados para a ligação no vetor. Posteriormente, 5 µl do volume de ligação foram usados para transformar 50µl de bactérias One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen), conforme descrito no kit Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen). Brevemente, após incubação no gelo por 30 min, a reação de transformação foi submetida a um choque térmico por 30 segundos a 42°C, seguido de incubação a 0°C por 1 min. Posteriormente, as bactérias transformadas foram ressuspensas em 500 ul de meio LB e incubadas a 37°C por 1h sob agitação a 225 rpm. Finalmente, cerca de 100ul de meio LB, contendo as bactérias transformadas com os clones recombinantes, foram plaqueadas em meio LB-ágar (1,5% de ágar bacteriológico, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina) e incubadas à 37°C durante toda noite.

3.6. Obtenção de DNA plasmidial e análise dos recombinantes

As colônias das bactérias contendo os vetores recombinantes foram recolhidas da placa com o uso de palitos estéreis e incubadas em aproximadamente 5ml meio LB líquido, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, a uma temperatura de 37°C durante toda noite. Posteriormente, esses pré-inóculos foram centrifugados a 3000g por 6 min, descartando-se o sobrenadante.

A minipreparação de DNA plasmidial foi realizada seguindo o protocolo do kit Genejet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). Selecionou-se 9 clones por placa, nos diferentes períodos de cada paciente (E e L), totalizando 18 clones por indivíduo. Os clones selecionados receberam uma numeração de 1 até 9, por exemplo: paciente E9 clone 1 = E9.1. Foi feita ainda uma minipreparação de DNA plasmidial contendo todos os demais clones, em cada placa, representando o *pool* de sequências de cada paciente.

Após extração do DNA plasmidial, a presença do inserto foi confirmada por digestão com a enzima de restrição *Eco* RI e por PCR usando os oligonucleotídeos (pol2 / 113).

3.7. Sequenciamento

Os clones recombinantes identificados foram sequenciados em ambas as direções. Foram utilizados os iniciadores Vpr2 (senso) e 113 (reverso), para o sequenciamento dos genes virais *vif* e *vpr*. As reações de sequenciamento nucleotídico foram realizadas no *DNA Sequencing Core Facility*, que faz parte do *Health Science Center* na Universidade de Utah - EUA, utilizando-se o kit *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* versão 3.1 (*Applied Biosystems*) e o polímero POP-7™ (*Applied Biosystems*), para o equipamento *ABI 3730xl DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*).

3.8. Análise de Bioinformática

Para confirmar a confiabilidade das sequências, foi utilizado o programa *sequence locator* (Los Alamos, 2011), que localiza a amostra na sequência consenso de HXB2.

Após essa análise, as sequências de maior qualidade foram selecionadas e enviadas para o programa *Gene Cutter* (Los Alamos, 2011) para a obtenção das sequências *fasta* de nucleotídeos e aminoácidos.

Em seguida, as sequências foram alinhadas pelo programa Bioedit 7.0.9 (2007) por meio do algoritmo ClustalW. Foram criados consensos com as sequências de cada paciente e cada estágio das duas proteínas estudadas (Figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9). A partir desses consensos, foi gerado ainda um consenso geral para o estágio inicial e um consenso para o estágio tardio. Nas sequências consenso estão presentes apenas os aminoácidos que aparecem em número igual ou superior a 50 % das sequências. Outro alinhamento foi realizado reunindo todas as alterações encontradas nas sequências de cada paciente e estágio independentemente da frequência (Figuras 8.1, 8.2, 8.3 e 8.4). A sequência utilizada como padrão ou consenso para a comparação nos alinhamentos com as sequências obtidas, foi a sequência consenso do subtipo B das proteínas Vif e Vpr, obtida no *site* Los Alamos (Los Alamos, 2011).

Para a geração das tabelas 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4, foi escrito um *script* de linguagem Perl. A entrada desse *script* é constituída por sequências fasta de aminoácidos dos seguintes pacientes: E2, E3, E5, E6, E7, E8, E9, L2, L8, L9 e L10, e a saída é a contagem das mutações por posição em relação a sequência consenso. Para a análise filogenética, foi usado o algoritmo *Maximum likelihood* (máxima verossimilhança) no programa Mega 5 (2011).

Os modelos das estruturas terciárias foram gerados com o programa SWISS MODEL do banco de dados SWISSPROT (2011). As estruturas utilizadas como base na geração dos modelos computacionais, foram obtidas no *site* RSCB PDB (*PROTEIN DATA BANK*) (PDB, 2011). Os modelos gerados foram validados e analisados em relação à sua qualidade estereoquímica pelos *softwares* VADAR versão 1.8 (Willard *et al.*, 2003) e MolProbity versão 3.19 (Davis *et al.*, 2007), que através de gráficos de Ramachandran (*Ramachandran Plot*) examina os aminoácidos em relação às regiões energeticamente favoráveis. O *Ramachandran Plot* mostra os ângulos de torção phi-psi (eixo x – phi e eixo y – psi) para todos os resíduos da estrutura. Os resíduos de glicina são identificados separadamente por triângulos, pelo fato desses não serem restritos à regiões do gráfico (*plot*) adequados a outros tipos de cadeia lateral. As diferentes cores e regiões delimitadas nos gráficos, podem assim ser descritas: áreas mais escuras [região em vermelho (VADAR) ou delimitadas por linha azul clara (MolProbity)] correspondem ao *core*, região que representa a combinação mais favorável dos valores de phi-psi. As outras regiões de combinação phi-psi menos favoráveis respectivamente nessa ordem são: *Allowed* (delimitada por azul escuro no gráfico

do MolProbity e região amarela no gráfico VADAR), *Generous* (área branca no MolProbity e área verde do gráfico do VADAR), *Dissallowed* (área branca no MolProbity e área cinza do gráfico do VADAR). Essas regiões foram determinadas por meio da observação da distribuição phi-psi para 121.870 resíduos de aminoácidos de 463 proteínas com estrutura conhecida. As duas regiões mais favoráveis foram *core* e *allowed*. Poucos aminoácidos foram encontrados nas regiões *Generous* e *Dissallowed*. Portanto os resíduos encontrados nessas regiões devem ser investigado mais detalhadamente. O ideal é que 90% dos resíduos de aminoácidos de um modelo se encontrem na região *core* (Morris *et al.*, 1992). A porcentagem de resíduos na região do *core* é um dos melhores indicativos para a qualidade estereoquímica do modelo. Finalmente, para a comparação da estrutura terciária dos clones com a estrutura do consenso do subtipo B, utilizou-se o algoritmo *Smith-Waterman superposition* no programa Calculate Structure Alignment – Pairwise Structure Alignment V.1.1 (PDB, 2011).

3.9. Modelo de regressão linear simples

Com objetivo de verificar a existência de uma possível correlação entre as alterações encontradas nas diferentes regiões analisadas e os níveis de LT-CD4 presentes nos diferentes estágios da infecção, foi realizado um gráfico de regressão. Primeiramente foi obtido um *score* para cada paciente e estágio, baseando-se na similaridade entre as mutações apresentadas pela sequência consenso de cada paciente em cada estágio, com as sequências consenso correspondente aos estágios inicial e final da infecção. Dessa forma, para um dado paciente e estágio, exemplo E2 inicial, a ocorrência de alterações idênticas as presentes na sequência consenso do estágio inicial receberam um valor negativo, no entanto, aquelas mutações idênticas as presentes na sequência consenso correspondente ao estágio tardio receberam um valor positivo, sendo que, os valores do *score* para cada paciente e cada estágio, foram obtidos a partir da somatória de ambos os valores.

Finalmente, a partir dos valores do escore e os correspondentes aos níveis de LT-CD4 para cada paciente e estágio, foi criado um gráfico de regressão usando-se o programa SPSS. O modelo de regressão simples foi analisado quanto a quatro requisitos de qualidade: **(I)** O coeficiente de correlação linear de Pearson (r), cujo o valor para indicar forte correlação deve ser maior que 0,70. **(II)** O coeficiente de determinação (r^2), que representa a porcentagem de

explicação do modelo, ou seja quanto o modelo explica a influência do *score* sobre a contagem de células CD4+ e a carga viral. **(III)** Teste de significância do modelo (F). O modelo é considerado significativo quando o valor de Sig. é menor que 0,05. **(IV)** Teste de significância do coeficiente de regressão (t). O modelo é considerado significativo se o valor de Sig. for menor que 0,05.

Capítulo 4. Resultados e Discussão

No processo de infecção pelo HIV-1, os diferentes níveis de progressão a AIDS observados são determinados por uma complexa interação entre fatores genéticos do hospedeiro e do próprio vírus (Willey *et al.*, 1992)(Weiss, 1993). Embora a maioria dos indivíduos HIV-1 positivos desenvolvam a síndrome num período de 10 anos, aproximadamente 5% permanecem assintomáticos, com níveis estáveis de LT CD4+ por mais de uma década (Buchbinder *et al.*, 1994).

O HIV-1 sofre constante influência do ambiente celular, tendo que enfrentar flutuações da pressão do sistema imune no tempo e no espaço. Dentre os principais fatores do hospedeiro, encontram-se os mecanismos de defesa, que tentam “eliminar” o vírus para evitar o estabelecimento de uma infecção crônica.

As principais linhas de defesa estão representadas pela ação do sistema imune, basicamente linfócitos T citotóxicos (LTc), anticorpos neutralizantes (imunidade adaptativa)(Moore *et al.*, 2002)(O'connor *et al.*, 2002) e por fatores celulares, como por exemplo as proteínas APOBEC (A3G e A3F), TRIM-5 α e BST-2/CD317, que tem função de restringir a replicação viral (imunidade inata), alguns deles já identificados, (Sheehy *et al.*, 2002)(Stremlau *et al.*, 2004) e outros ainda por serem descobertos (Varthakavi *et al.*, 2003). Finalmente, além de ter que ultrapassar todos estes obstáculos, freqüentemente o vírus é submetido também à pressão exercida pelo coquetel anti-retroviral.

Estas forças exercidas pelo hospedeiro impõem enorme pressão seletiva que levam a alterações no material genético e conseqüentemente ao *fitness* viral, o que finalmente define a habilidade de um dado genótipo produzir progênie infecciosa em um determinado microambiente.

Dessa forma, o estudo das mudanças genéticas e suas conseqüências biológicas, são fundamentais ao entendimento da dinâmica evolucionária dos parâmetros de patogênese na população viral ao longo da infecção.

Usualmente, os níveis de replicação e infectividade são usados para medir o *fitness* viral, desde que, estes permitam dimensionar a completa realização do ciclo viral dentro da célula hospedeira.

Diferentes isolados virais podem ser distinguidos pelo tropismo celular e efeitos citopáticos (Albini *et al.*, 1998). Dessa forma, estudos longitudinais com vírus isolados seqüencialmente ao longo da infecção, mostraram claramente que partículas virais isoladas

logo após a infecção são predominantemente macrófago-trópico, não formam sincícios e se replicam lentamente (Henriksson *et al.*, 1998). No entanto, isolados linfotrópicos, formadores de sincícios e com elevada capacidade de se replicar, surgem em aproximadamente 50% dos pacientes assintomáticos e estão associados a rápido declínio das células T e progressão à AIDS (Price *et al.*, 1998). Estes estudos levaram a proposição de duas principais hipóteses, a primeira, que o surgimento das variantes mais infecciosas levaria o sistema imune a uma disfunção, e a segunda, que o surgimento das mesmas, seja uma consequência da progressiva depleção do sistema imune.

Neste contexto, recentes estudos realizados por Kirchhoff e colaboradores (Arganaraz *et al.*, 2003)(Carl *et al.*, 2001)(Kirchhoff *et al.*, 1999)(Lama *et al.*, 1999) mostraram claramente a relação direta entre o estado do sistema imune do hospedeiro e as mudanças específicas no genoma viral, que se traduzem em importantes alterações nas propriedades biológicas do vírus. Estes estudos mostraram que mutações ocorridas ao longo da infecção, no gene que codifica a proteína acessória Nef, levam à alteração de importantes funções para o ciclo viral. Assim, à medida que a infecção progride, as partículas virais parecem perder a capacidade de modular a expressão da proteína CPH-I, e passam a ter maior capacidade inibitória da expressão do receptor viral CD4. Finalmente, estes autores estabeleceram uma relação causa-efeito, entre a maior capacidade moduladora de CD4, o aumento de infectividade e replicação das partículas virais, características estas, observadas em populações virais presentes no estágio tardio da infecção e relacionadas ao desenvolvimento da AIDS. Outro trabalho revelou que alterações na sequência do promotor viral LTR (na região de TAR – *transactivation response*), poderiam aumentar a transcrição de LTR, o que contribuiria para o aumento do potencial replicativo dos vírus em estágio tardio. Resultando na aceleração da progressão da doença (Hiebenthal-Millow *et al.*, 2003)

Essas são algumas das evidências da clara relação entre alterações na sequência do genoma viral, ao longo da infecção, com aumento ou diminuição de determinada função das proteínas virais. Baseado nesses dados, nosso grupo tem como hipótese, a possível existência de um “relógio biológico”, encarregado de disparar em determinado momento do processo infeccioso mudanças genéticas virais, que redundam em alterações fenotípicas cruciais à viabilidade do vírus no organismo, e fundamentalmente na sua propagação para um novo hospedeiro.

Considerando que as proteínas Vif e Vpr, possuem um crítico papel na infectividade e replicação viral, acreditamos que a caracterização das sequências das mesmas em distintos momentos da infecção, poderá proporcionar importante informação a respeito da relevância fisiológica destas proteínas virais na patogênese e evolução viral

4.1. Amplificação e Sequenciamento

Dos dez pacientes em cada estágio, oito foram amplificadas com sucesso, totalizando dezesseis amostras (Figura 4.1 A). As amostras E1 e E4, apresentaram problemas, provavelmente devido a degradação do DNA, e não puderam ser amplificadas.

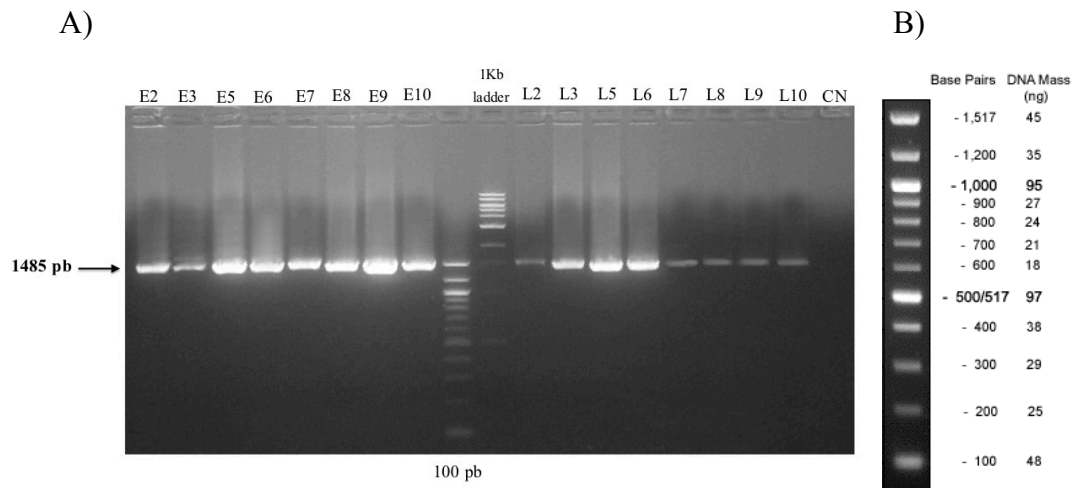


Figura 4.1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo das amostras amplificadas. A) Foto do gel de agarose 1 % contendo as oito amostras amplificadas por PCR (*Polimerase chain reaction*) nos dois diferentes estágios de infecção, inicial (E) e tardio (L). Os primers utilizados foram Pol2F e 113R, gerando um fragmento de 1485 pb. CN corresponde ao controle negativo da reação de PCR. **B)** Um dos Marcadores moleculares de DNA utilizados, *100 bp DNA Ladder (New England Biolabs)*, com o tamanho correspondente de cada banda e sua respectiva massa em ng.

Após a purificação dos produtos de PCR, o fragmento de 1485 pb, flanqueado pelos oligonucleotídeos pol 2 e 113 foi clonado conforme descrito anteriormente. Foram sequenciados nove clones de cada paciente e estágio, num total de 240 clones e 480 reações, utilizando-se primers senso (*forward*; pol2) e reverso (*reverse*; Vpr2). Posteriormente foram selecionadas as sequências de melhor qualidade, com base na análise dos esferogramas das sequências no

programa Sequencher 4.9, totalizando 223 sequências senso e reverso. Por último selecionou-se dentre as sequências redundantes senso e reverso, aquelas de melhor qualidade, utilizando o programa Sequencher 4.9. Obteve-se então 33 sequências vif estágio inicial (E) e 24 sequências vif estágio tardio (L). No caso de vpr foram obtidas 34 sequências estágio inicial (E) e 24 sequências no estágio tardio (L).

4.2. Caracterização e frequência das alterações nas sequências dos alelos das proteínas Vpr e Vif presentes em dois estágios da infecção

As sequências de nucleotídeos foram traduzidas nas sequências de aminoácidos com o programa *Gene Cutter* (Los Alamos 2011) e os alinhamentos foram feitos com o programa *Bioedit 7.0.9* (Figuras 4.2 a 4.5). A frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos das proteínas Vpr e Vif foram obtidas por script Perl, conforme descrito no capítulo anterior (Tabelas 4.1 a 4.4).

Tabela 4.1. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vpr no estágio inicial. Os pacientes E2 (vermelho), E8 (amarelo) e E9 (verde) aparecem destacados, pois suas sequências foram estudadas em ambos os estágios (inicial e tardio). P/M na primeira coluna significa P - Paciente e M - Mutação. As alterações são representadas da seguinte forma: primeiro o aminoácido da sequência consenso de referência, seguido da posição no qual a mudança ocorreu e por último o aminoácido encontrado na posição. Um "-" seguido pela posição da sequência e por um aminoácido, representa uma inserção, enquanto o símbolo do aminoácido seguido pelo número e por "-" representa uma deleção. Um asterisco representa um códon de parada.

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vpr – Estágio Inicial - <i>Early</i>																			
P/M	M11	Q3R	P5L	G9R	R12K	P10S	Y15H	Y15F	N16D	N16V	W18R	L20P	L22H	N28R	N28S	E29G	A30S	R36K	I37P		
E2		1				1		1					1	1	2					1	
E3															5						
E5																					
E6																4					
E7			5									5						5			
E8	1				1	3	1				1							7	2		
E9						8								8				2		7	
Total	1	1	5	1	3	1	9	1	5	5	1	1	1	9	7	2	12	2		8	

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vpr – Estágio Inicial - <i>Early</i>																			
P/M	I37V	I37M	I37A	I37S	W38R	G41N	H45Y	Y50C	G51E	W54*	A55T	A55E	V57A	E58Q	E58K	E58G	I60L	R62S	I63M	Q66R	
E2	1					2		1			1	1	1	1	1						1
E3						1															
E5							5											5	5	5	
E6							4														
E7		5					5		5	5											
E8	1	1	1				7		1	1				1				1			1
E9					1	1				8							1	8			
Total	2	6	1	1	1	7	17	1	6	6	9	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vpr – Estágio Inicial - <i>Early</i>																	
P/M	I70T	F72L	R73G	I74L	G75K	G75R	C76Y	Q77R	I83V	T84V	R85P	Q86R	R87K	A89T	-91R	N92D	G93R	S95G	
E2								3	2	1				1	1	1			1
E3								1	1										
E5							2	5	5			5							
E6								4	4										
E7					5								5	5			5		
E8		1		1	1	2		6			7		1	7			1		
E9	1		2					8		8			2	8	8	8	8		8
Total	1	1	2	1	6	2	2	27	7	9	17	5	8	13	9	9	6		9

Tabela 4.2. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vpr no estágio tardio. Os pacientes L2 (vermelho), L8 (amarelo) e L9 (verde) aparecem destacados, pois suas sequências foram estudadas em ambos os estágios (inicial e tardio). P/M na primeira coluna significa P - Paciente e M - Mutação. As alterações são representadas da seguinte forma : primeiro o aminoácido da sequência consenso de referência, seguido da posição no qual a mudança ocorreu e por último o aminoácido encontrado na posição. Um "-" seguido pela posição da sequência e por um aminoácido, representa uma inserção, enquanto o símbolo do aminoácido seguido pelo número e por "-" representa uma deleção. Um asterisco representa um códon de parada.

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vpr – Estágio Tardio - Late																			
P/M	Q3R	A4T	D7G	G9R	R12K	Y15H	Y15F	E17G	T19A	L20P	L20I	N28R	N28S	A30S	F34L	R36K					
L2	2					2	2	1	1	1											
L8				2	1									2	5						
L9		1	1											9		2					
L10														3		1					
Total	2	1	1	2	1	11	2	1	1	1	2	9	5	6	1	2					

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vpr – Estágio Tardio - Late																			
P/M	I37P	I37V	L39F	H40Q	G41N	G43R	Q44L	H45Y	I46T	G51K	W54*	A55T	A55E	E58Q	I60L	I70T					
L2	2	3		1			1	1						2	2						
L8		5		1	2	1		5													
L9	9		1						1			9				1					
L10							3														
Total	11	8	1	2	5	1	1	6	1	1	1	11	2	2	2	11					

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vpr – Estágio Tardio - Late															
P/M	F72L	G75R	G75W	C76R	Q77R	R80K	I83V	T84V	R85P	Q86R	A89T	-91R	N92D	G93R	S95G		
L2				1	2			2	1		3	2	2		2		
L8		2			7	1	2		5		5			1			
L9	2		1		7			9		2		9	9		9		
L10					3		3										
Total	2	2	1	1	19	1	5	11	6	2	8	11	11	1	11		

Tabella 4.3. Frequência das alterações presentes nas seqüências de aminoácidos da proteína Vif no estágio inicial. Os pacientes E2 (vermelho), E8 (amarelo) e E9 (verde) aparecem destacados, pois suas seqüências foram estudadas em ambos os estágios (inicial e tardio). P/M na primeira coluna significa P - Paciente e M - Mutação. As alterações são representadas da seguinte forma : primeiro o aminoácido da seqüência consenso de referência, seguido da posição no qual a mudança ocorreu e por último o aminoácido encontrado na posição. Um "-" seguido pela posição da seqüência e por um aminoácido, representa uma inserção, enquanto o símbolo do aminoácido seguido pelo número e por "-" representa uma deleção. Um asterisco representa um códon de parada.

		Alterações nas seqüência de aminoácidos de Vif – Estágio Inicial - <i>Early</i>																			
P/M	R4K	Q6*	M8I	M8L	R19N	R19N	T20A	W21*	K22R	S23R	K26E	H27Y	Y30H	I31V	R33K	G37D	G37K	W38L	W38*		
E2						3	1			2		1	2		2	2	2	1	1		
E3						1				1							1				
E5					5							5	5			5					
E6					3												3				
E7				5					5					5		5					
E8									1					7		7					
E9	1	1	1	1	8	8				1	1	8	8	8	8	8		8	8	1	
Total	1	1	1	1	12	8	12	1	1	5	8	1	14	15	12	27	6	9	1	1	

		Alterações nas seqüência de aminoácidos de Vif – Estágio Inicial - <i>Early</i>																			
P/M	F39V	F39S	Y40D	R41K	Y44D	E45Q	T47P	H48N	H48R	R50K	I51T	V55A	H56R	G60R	D61E	A62G	R63K	R63T	R63E	V65I	
E2	1	1	1			1		4		2	1						3	1		1	
E3								1		1							1				
E5							5								5		5			5	
E6								3		3							3				
E7							5		5												
E8							7							1							
E9	8			1	1	8		8				1	1				8			8	
Total	9	1	1	1	1	9	17	16	5	6	1	1	1	1	5	5	15	1	5	9	

		Alterações nas seqüência de aminoácidos de Vif – Estágio Inicial - <i>Early</i>																	
P/M	Y69H	T67I	W70*	D78E	D78G	G82S	I87V	A89T	K92R	K92E	S95N	V98I	D101G	D101N	Q105H	Q105*	L109T	Y110H	
E2							1			1			2		5		1		2
E3																			1
E5		5							5					5	5				1
E6																			3
E7				5				7	5		5	5		5					
E8	1		3	7		1			6		7	7		7			1		
E9	1				1		8			8			8						
Total	2	5	3	12	1	1	9	7	16	9	12	12	10	17	10	1	1		6

Tabela 4.3. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vif no estágio inicial. Os pacientes E2 (vermelho), E8 (amarelo) e E9 (verde) aparecem destacados, pois suas sequências foram estudadas em ambos os estágios (inicial e tardio). P/M na primeira coluna significa P - Paciente e M - Mutação. As alterações são representadas da seguinte forma: primeiro o aminoácido da sequência consenso de referência, seguido da posição no qual a mudança ocorreu e por último o aminoácido encontrado na posição. Um "-" seguido pela posição da sequência e por um aminoácido, representa uma inserção, enquanto o símbolo do aminoácido seguido pelo número e por "-" representa uma deleção. Um asterisco representa um códon de parada.

		Alterações nas sequências de aminoácidos de Vif – Estágio Inicial - <i>Early</i>																			
P/M	S116T	S118P	I120V	N122K	A123T	I124L	L125V	H127R	H127C	I128L	I128R	I128K	V129G	S130R	R132S	E134K	Q136H	G138R			
E2					2	1													1		
E3					1			1											1		
E5				5			5	5		5						5					
E6					3			3													
E7								5					5	5	5	5					
E8	1							7					7	7	7	7					
E9		1	1		1	7					1	1	6	1	1	1					
Total	1	1	1	5	7	9	5	23	1	5	8	1	12	12	25	1	1	1	1		

		Alterações nas sequências de aminoácidos de Vif – Estágio Inicial - <i>Early</i>																	
P/M	N140S	G143R	S144F	A151T	I154T	I154V	T155K	K158Q	K158R	I159T	I159R	T167R	T167A	K168T	W174*	K176E	Q178K	Q178R	
E2	1				1	1	2	2	1	1	1	2		1					1
E3							1	1				1							
E5				5					5		5		5						5
E6							3	3				3							
E7				5					5										5
E8		3							7		7								1
E9			1				1	1	1	7	7								8
Total	1	3	1	16	1	1	7	7	13	13	13	6	5	9	1	1	1	5	6

		Alterações nas sequências de aminoácidos de Vif – Estágio Inicial - <i>Early</i>									
P/M	K179R	K179*	G185R	S186N	T188S	M189L	N190R	N190S	-193L	-193Q	
E2	1			1	1						
E3											
E5						5					
E6											
E7		5						5			
E8			3				1	6	1		
E9		8								1	
Total	9	5	3	1	1	5	1	11	1	1	

Tabela 4.4. Frequência das alterações presentes nas sequências de aminoácidos da proteína Vif no estágio tardio. Os pacientes L2 (vermelho), L8 (amarelo) e L9 (verde) aparecem destacados, pois suas sequências foram estudadas em ambos os estágios (inicial e tardio). P/M na primeira coluna significa P - Paciente e M - Mutação. As alterações são representadas da seguinte forma : primeiro o aminoácido da sequência consenso de referência, seguido da posição no qual a mudança ocorreu e por último o aminoácido encontrado na posição. Um "-" seguido pela posição da sequência e por um aminoácido, representa uma inserção, enquanto o símbolo do aminoácido seguido pelo número e por "-" representa uma deleção. Um asterisco representa um códon de parada.

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vif – Estágio Tardio - Late																			
P/M	M8P	M8L	D14V	I18T	R19N	T20A	S23N	S23R	H27R	Y30H	I31V	R33K	G37D	G37K	G37E	F39V	F39S	E45Q	T47I		
		1		1	2	2		2	2	4	1	5		2		2		2		2	
L8	1	3			3		1	3		4	4	4	3			8			9		
L9			1		9			9		9		9				1			9		
L10					3			3					2							1	
Total	1	4	1	1	17	2	1	6	11	13	5	18	5	10	1	11		2	11	1	

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vif – Estágio Tardio - Late																			
P/M	T47N	T47P	H48N	H48D	R50K	I51T	I51M	E54G	R63K	R63T	V65I	I66M	H73N	E76K	D78E	I87V	R90G	K92R	K92E		
		1	4			2			2	2	2								1	2	
L8		4	3		3			1	3	3				1		4			4		
L9			8	1					9		9	1	2					1		9	
L10			3		3				3											1	
Total	1	5	18	1	6	2	1	1	17	2	11	1	2	1	5	11		1	5	11	

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vif – Estágio Tardio - Late																			
P/M	R93S	S95N	T96A	V98I	D101G	D101N	Q105R	L109T	Y110H	F112L	F115S	A123T	I124L	G126R	H127R	I128R	V129G	S130R	R132S		
		2		2	4	1		2					2		1	4		1	1	3	
L8		4		4		3			4			3		1	7			4	4	4	
L9			1	1	9		1				1	1	6			9				9	
L10									3			3	8		3				3	9	
Total	1	6	1	7	13	4	1	2	7	1	1	6	8	1	11	13		5	5	16	

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vif – Estágio Tardio - Late																			
P/M	Q136H	N140S	A151T	I154V	T155K	K157R	K158G	K158Q	K158R	I159T	I159R	L163S	T167R	K168T	L169Q	N175S	K176E	Q178R			
	2	2	1	2					1	3	2			2					2		
L8			4		3			3		4		3							2		
L9			5			1	1		8	9	9	1		9	1				1		
L10					3			3				3									
Total	2	2	10	2	6	1	1	6	9	7	11	1	6	11	1	1		2	2		

		Alterações nas sequência de aminoácidos de Vif – Estágio Tardio - Late									
P/M	K179R	T180A	S186N	T188S	N190D	N190S	H192Q				
	2		2	2	1	1					
L8						4	2				
L9	9	1									
L10					1						
Total	11	1	2	2	1	5	2				

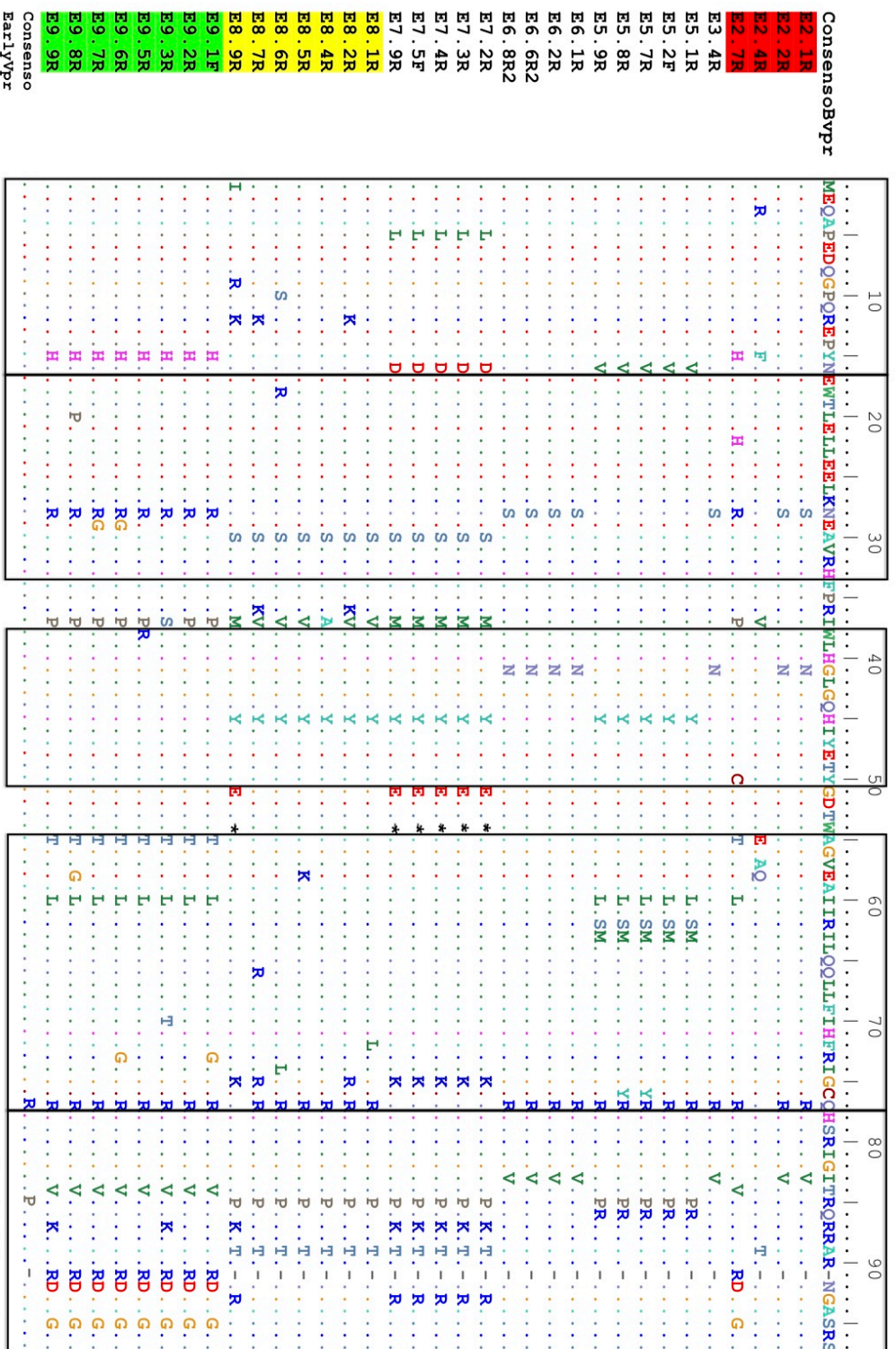


Figura 4.2. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vpr de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B (ConsensusBvpr) do HIV-1. Em destaque estão os pacientes cujas sequências foram estudadas em ambos os estágios, E2 (vermelho), E8 (amarelo), E9 (verde). Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido e as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço. As caixas pretas indicam os domínios da proteína Vpr (Morcellet et al., 2003).

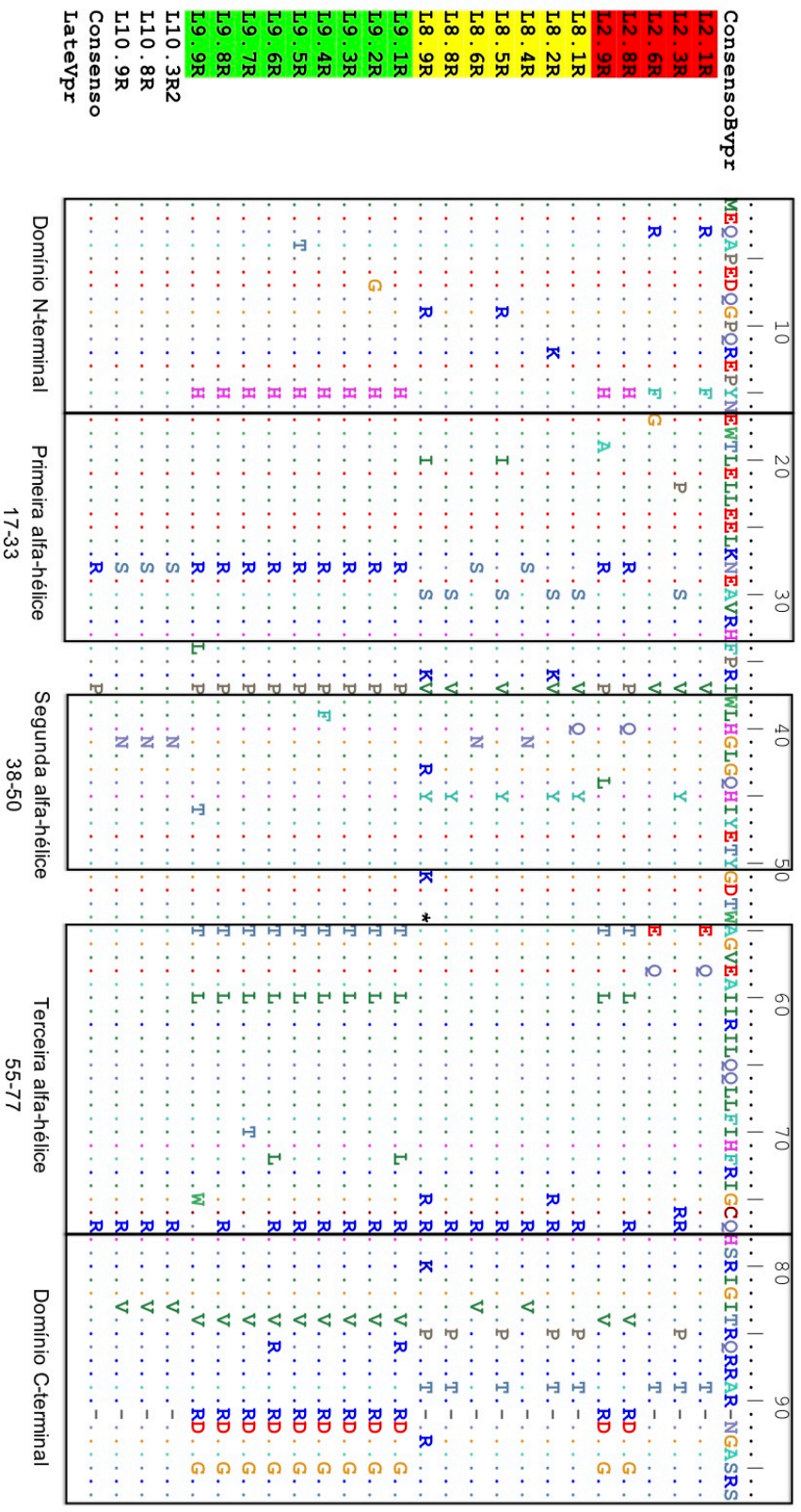


Figura 4.3. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vpr de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B (ConsensoBvpr) do HIV-1. Em destaque estão os pacientes cujas sequências foram estudadas em ambos os estágios, E2 (vermelho), E8 (amarelo), E9 (verde). Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido e as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço. As caixas pretas indicam os domínios da proteína Vpr (Morelet et al., 2003).

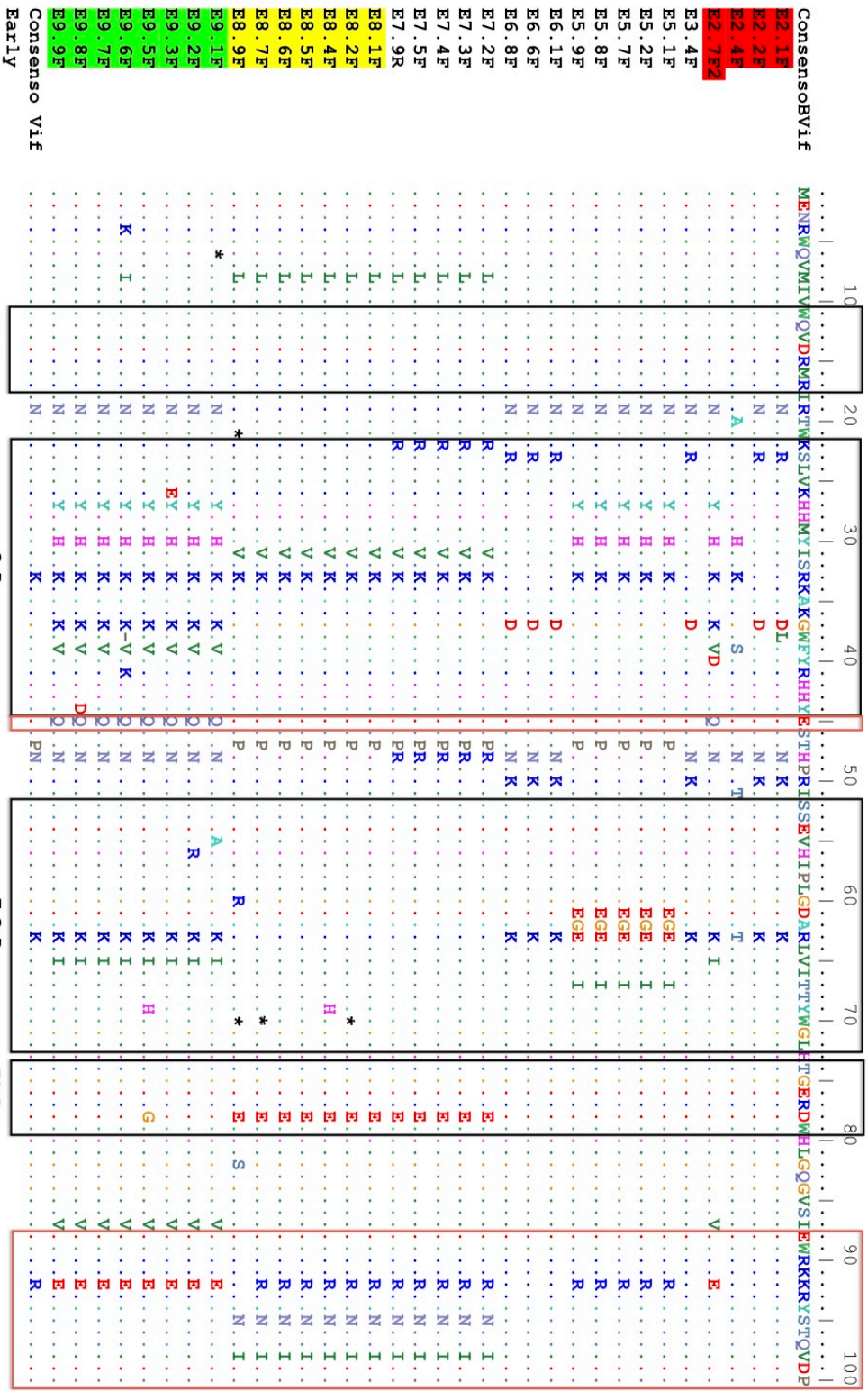


Figura 4.4. Alinhamento das seqüências dos alelos da proteína Vif de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à seqüência consenso do subtipo B (ConsensoBvif) do HIV-1. Em destaque estão os pacientes cujas seqüências foram estudadas em ambos os estágios, E2 (vermelho), E8 (amarelo), E9 (verde). Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada por um asterisco. As caixas pretas indicam os domínios da proteína Vif e as vermelhas resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Niewiadomska et al., 2009).

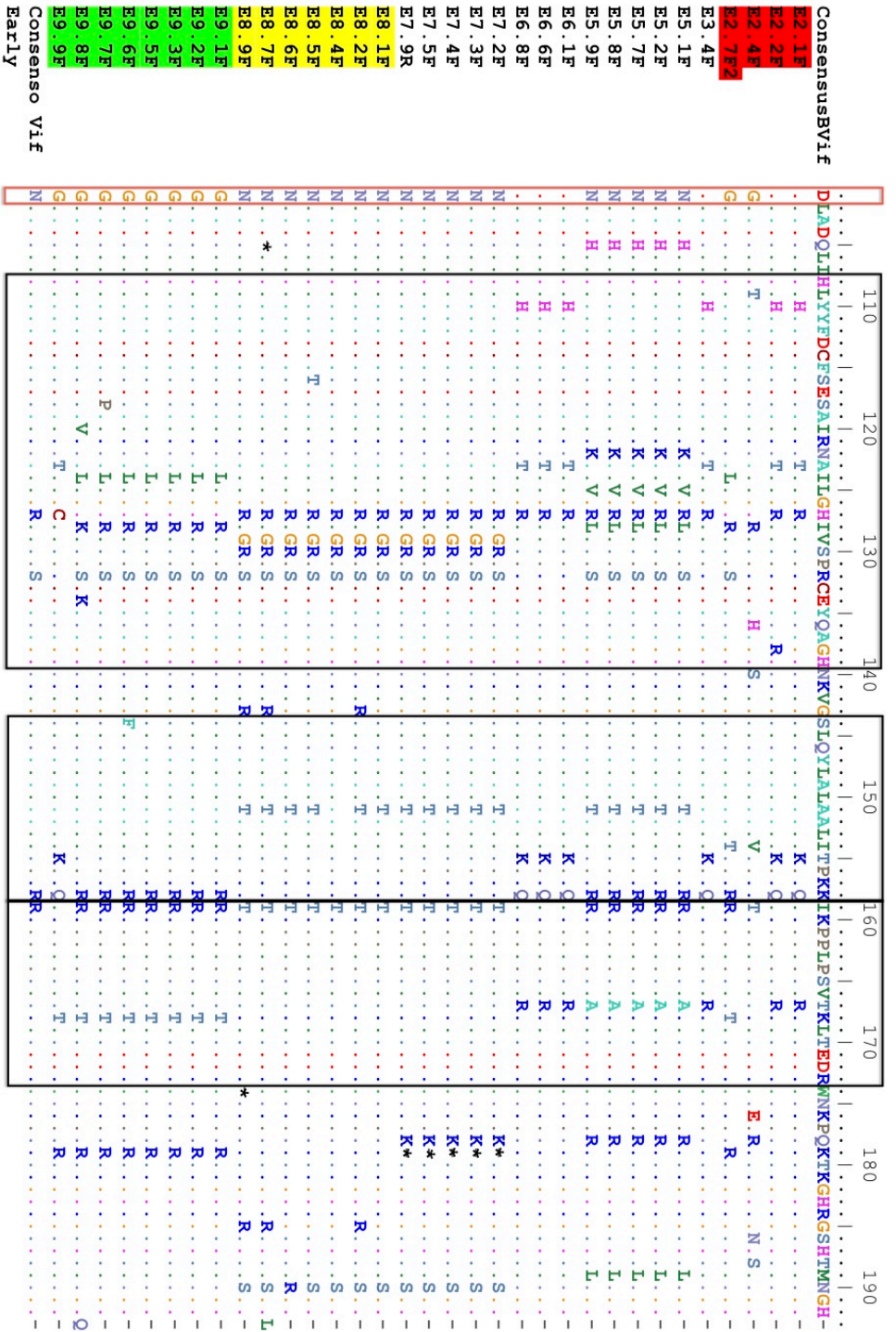


Figura 4.4. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vif de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B (ConsensusBvif) do HIV-1. Em destaque estão os pacientes cujas sequências foram estudadas em ambos os estágios, E2 (vermelho), E8 (amarelo), E9 (verde). Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada por um asterisco. As caixas pretas indicam os domínios da proteína Vif e as vermelhas resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Niewiadomska et al., 2009).

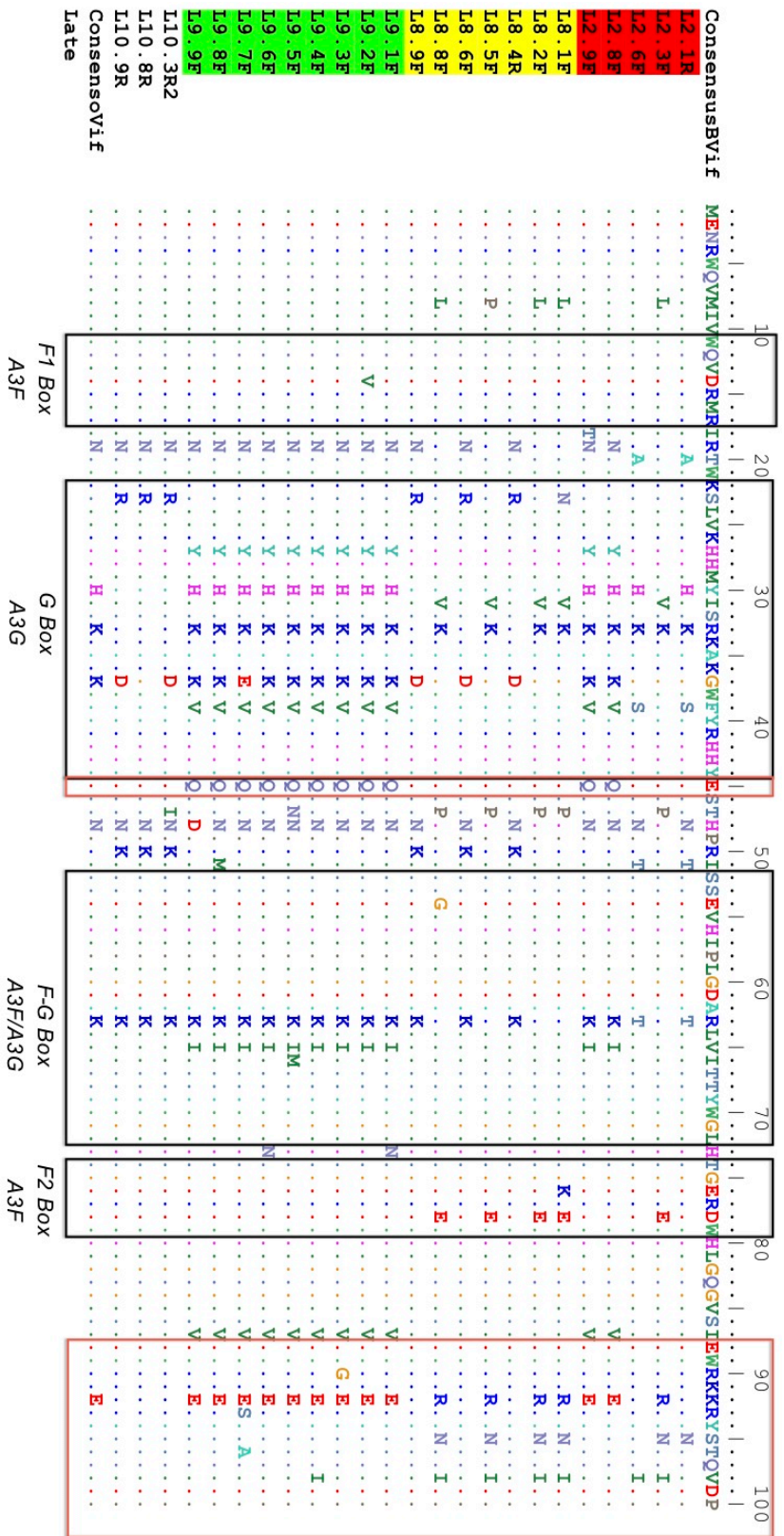


Figura 4.5. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vif de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B (vifconsensusB) do HIV-1. Em destaque estão os pacientes cujas sequências foram estudadas em ambos os estágios, E2 (vermelho), E8 (amarelo), E9 (verde). Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada por um asterisco. As caixas pretas indicam os domínios da proteína Vif e as vermelhas resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Newiadomska et al., 2009).

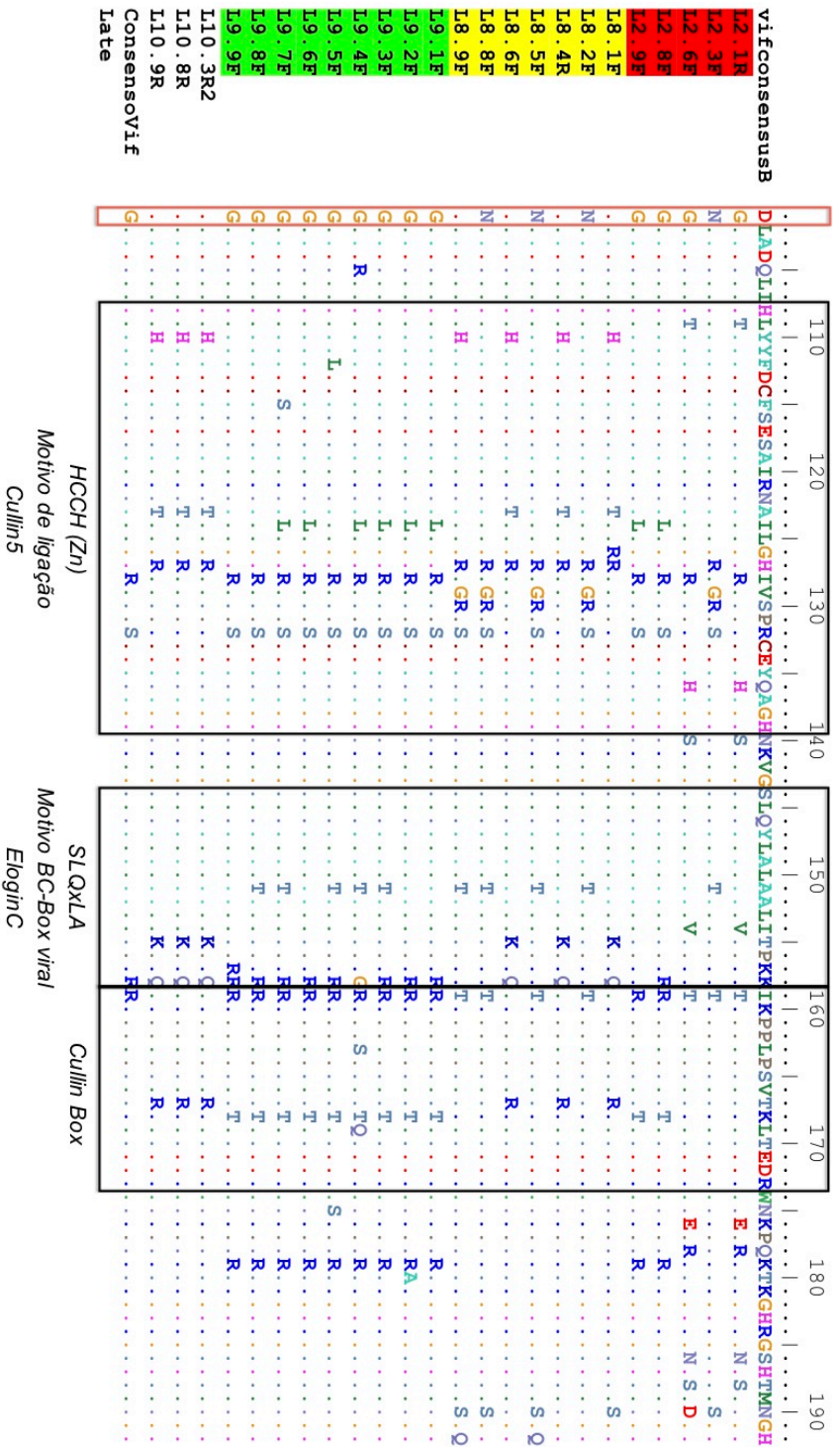


Figura 4.5. Alinhamento das sequências dos alelos da proteína Vif de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à sequência consenso do subtipo B (vifconsensusB) do HIV-1. Em destaque estão os pacientes cujas sequências foram estudadas em ambos os estágios, E2 (vermelho), E8 (amarelo), E9 (verde). Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada por um asterisco. As caixas pretas indicam os domínios da proteína Vif e as vermelhas resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Niewiadomska et al., 2009).

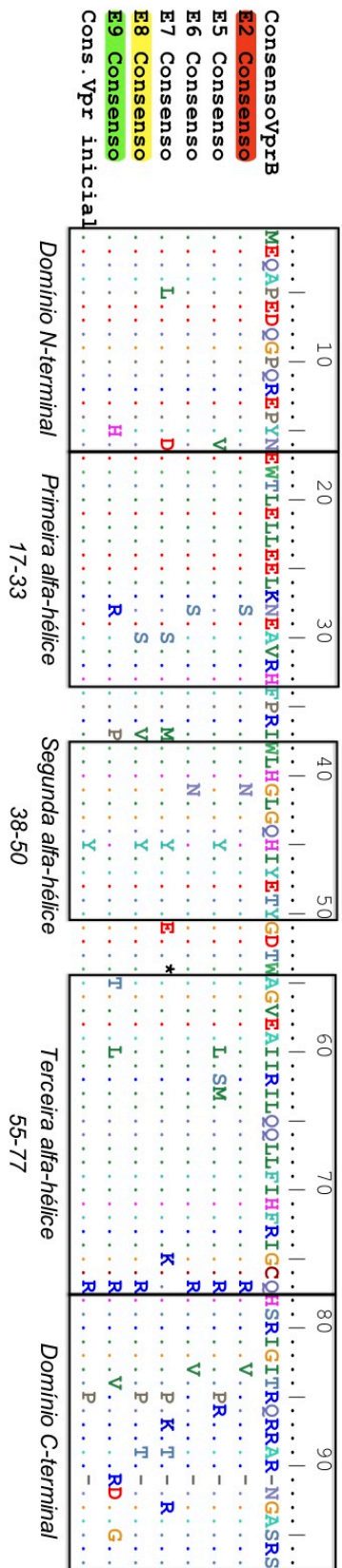


Figura 4.6. Alinhamento das sequências consenso dos alelos de vpr presentes no estágio inicial da infecção, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.

As sequências consenso dos alelos de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais frequentes (igual ou >50%) presentes nos clones sequenciados quando comparados com a sequência do consenso do subtipo B, da mesma forma, foram obtidas a sequência consenso correspondente aos alelos dos pacientes no estágio inicial da infecção. Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos, as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vpr encontram-se delimitados por meio de retângulos pretos (Morellet et al., 2003).

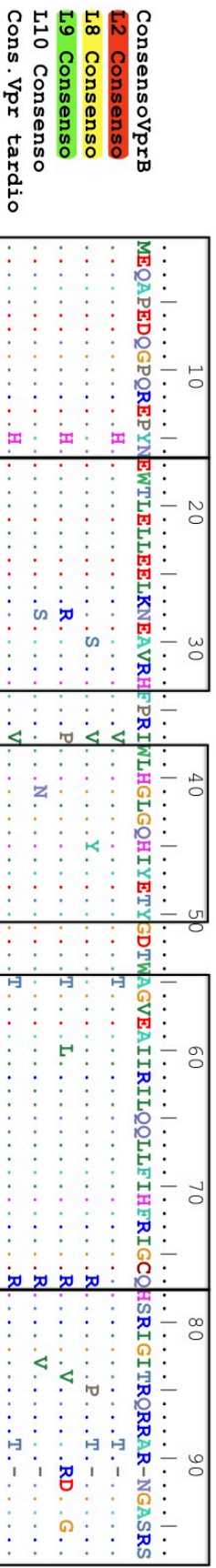


Figura 4.7. Alinhamento das seqüências consenso dos aldos de vpr presentes no estágio tardio da infecção, com a seqüência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.

As seqüências consenso dos alelos de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais frequentes (igual ou >50%) presentes nos clones seqüenciados quando comparados com a seqüência do consenso do subtipo B, da mesma forma, foram obtidas a seqüência consenso correspondente aos alelos dos pacientes no estágio tardio. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos, as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vpr encontram-se delimitados por retângulos pretos (Morellet et al., 2003).

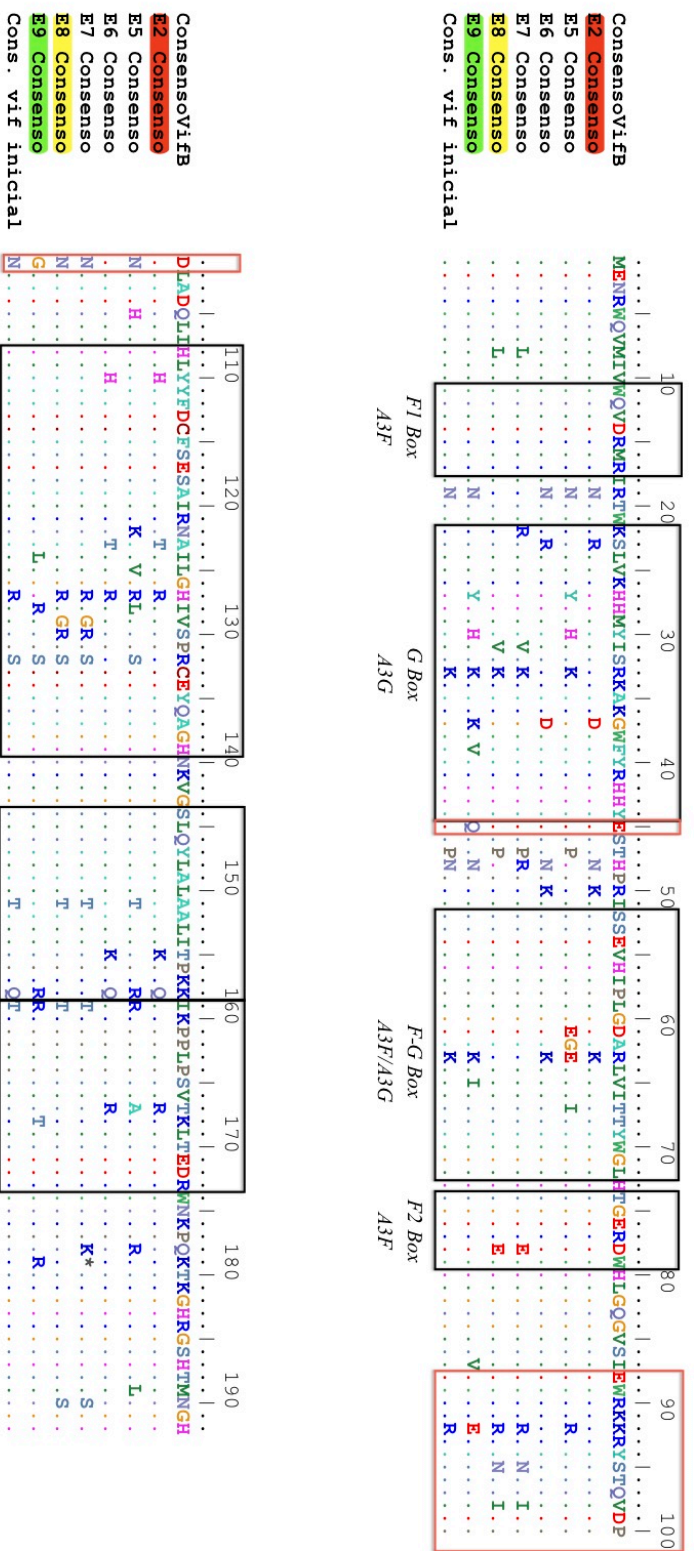


Figura 4.8. Alinhamento das seqüências consenso dos aloes de vif presentes no estágio inicial da infecção, com a seqüência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.
As seqüências consenso dos aloes de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais frequentes (igual ou >50%) presentes nos clones seqüenciados quando comparados com a seqüência do consenso do subtipo B, da mesma forma, foram obtidas a seqüência consenso correspondente aos aloes dos pacientes no estágio inicial da infecção. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos, as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vif encontram-se delimitados por meio de retângulos pretos e os vermelhas delimitam resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Niewiadomska et al., 2009).

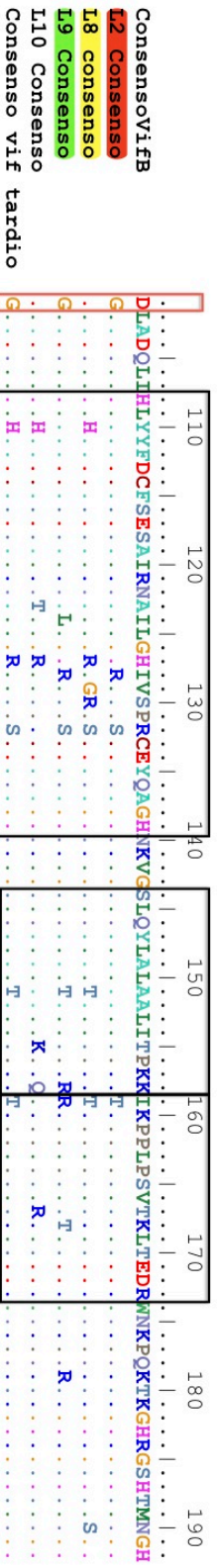
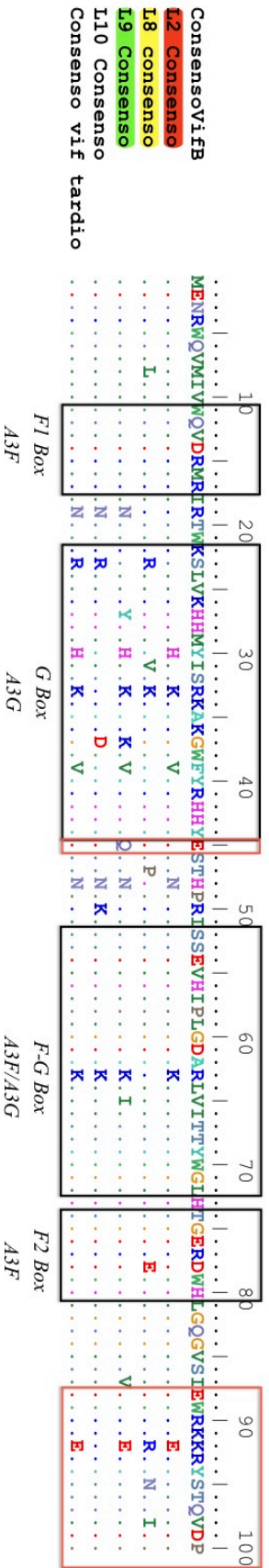


Figura 4.9. Alinhamento das sequências consenso dos alelos de vif presentes no estágio inicial da infecção, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.

As sequências consenso dos alelos de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais frequentes (igual ou >50%) presentes nos clones sequenciados quando comparados com a sequência do subtipo B, da mesma forma, foram obtidas a sequência consenso correspondente aos alelos dos pacientes no estágio tardio da infecção. Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos, as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vif encontram-se delimitados por meio de retângulos pretos e os vermelhas delimitam resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Niewiadomska et al., 2009).

4.3. Análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos iniciais e tardios e as funções da proteína Vpr

Considerando o caráter multifuncional da proteína acessória Vpr e sua relevância para o HIV-1 *in vivo*, foi realizada a caracterização dessa proteína viral em dois momentos da infecção. Existem relatos anteriores da associação entre inserções, deleções, alterações e a presença de *stop codon* prematuros em sequências do gene vpr, com a progressão para a AIDS. (Yedavalli *et al.*, 2005)

As sequências do gene vpr, foram traduzidas para aminoácidos, com o uso da ferramenta de bioinformática *gene cutter* dos site *Los Alamos*. A estrutura de Vpr é constituída basicamente de três alfa hélices bem definidas: nas posições dos resíduos de aminoácidos 17-33, 38-50, e 55-77, cercados pelos domínios N e C terminais da proteína (Morellet *et al.*, 2003). O domínio N-terminal, caracterizado por ser carregado negativamente, apresenta quatro prolínas conservadas (nas posições 5, 10, 14 e 35), sujeitas a isomerização cis-trans (Morellet *et al.*, 2003)(Bruns *et al.*, 2003). Foi descrito que a peptil-propil isomerase celular ciclofilina A, interage com Vpr por meio das prolínas nas posições 14 e 35, para assegurar o correto dobramento da proteína viral (Zander *et al.*, 2003). Curiosamente no domínio N-terminal foi possível observar que todas as sequências do paciente E7 (estágio inicial) apresentaram a alteração P5L. Uma alteração na posição S10P, também presente somente no estágio inicial, foi encontrada no indivíduo E8 (1 alelo). Como citado anteriormente são aminoácidos conservados que podem estar em posição cis ou trans (Bruns *et al.*, 2003).

O extremo carbóxi teminal de Vpr contém seis resíduos de argininas entre as posições 73 e 96, semelhante a domínios de transdução de outras proteínas, os quais também são ricos em arginina. O que poderia explicar as propriedades de transdução de Vpr, incluindo sua capacidade de atravessar a bicamada lipídica da membrana celular (Coeytaux *et al.*, 2003)(Kichler *et al.*, 2000)(Sherman *et al.*, 2002). O paciente E9 apresentou mudança na posição R73G em dois alelos, o que representou a alteração de um aminoácido polar e de carga positiva (R), para um aminoácido apolar e neutro (G). Já o estágio tardio desse paciente não apresentou essa alteração. Também foram detectadas nesta região as mudanças R85P e R87K . A alteração R85P foi encontrada em vários pacientes: L2 (1 alelo); E5 e E7

(5 alelos cada); E8/L8 (12 alelos) e também resultou na substituição por um aminoácido apolar e neutro, como ocorrido em R73G. Já a mutação R87K foi constatada nos pacientes: E7, E8 e E9 (5,1 e 2 alelos respectivamente), resultando em mudança para um aminoácido polar e positivo (K), a exemplo do aminoácido arginina (R), o que nesse caso pode ter menor impacto na função de transdução desempenhada com auxílio dessas argininas. A última alteração relativa a essas argininas (R), ocorreu em L8 (1 alelo) e foi em R80K, sendo uma substituição da mesma natureza descrita anteriormente, mas provavelmente com menor impacto sobre as funções relacionadas a esses aminoácidos. De uma maneira geral, as mudanças encontradas nas argininas (R), dessa região (73-96), foram mais frequentes no estágio inicial, o que poderia ter um impacto negativo na replicação viral, no começo da infecção, já que diminuiria a capacidade de transdução e trânsito através da bicamada lipídica, o que por sua vez afetaria todas as outras funções desempenhadas por essa proteína e de vital importância no ciclo viral, como são a parada do ciclo celular em G2 e transativação do promotor LTR.

Uma importante função de Vpr, o *G2 arrest*, é desempenhada por meio das serinas nas posições 79, 94 e 96. (Le Rouzic *et al.*, 2005). Função normalmente atribuída ao domínio C-terminal onde estão localizadas estas serinas. Em ambos os estágios e em todos os alelos do paciente 9 (E9/L9) e no paciente 2 (E2 e L2)(1 e 2 alelos respectivamente) foi observado a substituição da serina S94G (a inserção de uma arginina (R) em alguns alelos desloca a serina para posição 95 no alinhamento). A mudança para um aminoácido apolar e neutro (G) pode representar efeito deletério na indução de parada do ciclo em G2 e apoptose. O indivíduo 9 por apresentar essa alteração com grande frequência em ambos os períodos o que pode representar um vírus portador de uma proteína Vpr com redução dessa função.

A primeira alfa hélice (região compreendida entre os aminoácidos 17-33) é essencial para a localização nuclear, empacotamento nos vírions e a entrada no núcleo da célula da proteína Vpr. Como descrito anteriormente, a prolina da posição 35, localizada entre a primeira e a segunda alfa hélice de Vpr, tem papel crucial na formação da correta estrutura de Vpr. Não ocorreram mudanças nessa prolina das sequências analisadas.

A segunda alfa hélice está associada as funções de oligomerização de Vpr e translocação do complexo de pré integração (PIC) para a região nuclear (Kamata *et al.*, 2005) . Nessa região no estágio inicial foram encontradas as mutações W38R (paciente E9),

H45Y (E5, E7 e E8) e Y50C (E2). No estágio tardio foram encontradas as mudanças: I37V (L2 e L8); H40Q (L2 e L8); G41N (L8 e L10); G43R (L8); Q44L (L2); H45Y (L2 e L8); I46T (L9) a maioria dessas mudanças foram descritas como incapazes de provocar alterações estruturais e funcionais na proteína (Morellet *et al.*, 2003). Apenas as alterações encontradas nas posições W38R (E9) , L39F e I46T (L9) estão relacionadas a redução da incorporação de Vpr nos vírions. As modificações V57A (E2, 1 alelo) e G75K (E7, todos os alelos sequenciados), G75K (E8, 1 alelo), G75R (E8, 2 alelos)(L8, 2 alelos) e G75W (L9, 1 alelo) são descritas como capazes de alterar a localização nuclear de Vpr.

Duas mudanças relevantes, foram encontradas nas posições W54, os pacientes E7, E8 e L8 apresentaram *stop codons* na posição, representados por asterisco (alterações nessa região foram descritas como capaz de afetar a interação entre Vpr e UNG2) e F72L (mutação pontual responsável por reduzir a importação de Vpr para o núcleo da célula hospedeira. Isso pode influenciar a progressão da doença) (E8 e L9)(Caly *et al.*, 2008). A mutação R77Q, encontrada em diversos alelos (nos pacientes E2, E3, E5, E6, E8, E9, L2, L8, L9 e L10) foi associada por Fisher e colaboradores ao subtipo B do HIV-1 e não a progressão da doença, como foi descrito anteriormente (Lum *et al.*, 2003). Estudos recentes de Srinivasan e colaboradores (com 976 sequências, sendo 298 do subtipo B) sobre o polimorfismo de cada um dos aminoácidos de Vpr, revelou a presença de resíduos aminoácidos que possuem uma única variante (9, 33, 39 e 47). Duas dessas variantes únicas foram encontrados nas sequências analisadas: G9R (E8/L8) e W39R (E9). As variantes encontrados nessas posições coincidiram com os encontrados no estudo citado anteriormente (Srinivasan *et al.*, 2008).

Em suma, as alterações que ocorreram principalmente no estágio inicial, foram encontradas nos seguintes domínios : N-terminal (as prolinas conservadas nas posições 5 e 10), C-terminal (nos resíduos de argininas das posições R73, R85 e R87) e na segunda alfa hélice (V57A, G75K , G75R). Essas alterações podem ter impacto negativo em algumas funções desempenhadas por Vpr, como uma menor afinidade de ligação com a ciclofilina A (em decorrência da alteração presente em duas prolinas conservadas, nos pacientes E7 e E8). Apesar da isomerização ser um processo menos importante para as prolinas 5 e 10, essa menor interação entre Vpr e ciclofilina A, poderia ter consequências negativas para o vírus. Principalmente no que diz respeito ao correto dobramento da proteína viral e suas funcionalidades , em especial a síntese *de novo* de Vpr e a indução de parada do ciclo celular

na fase G2 (Zander *et al.*, 2003). Outra possível mudança funcional no estágio inicial, seria uma menor capacidade de transdução e de atravessar bicamada lipídica (Sherman *et al.*, 2002), isto devido a mudanças nas argininas da porção C-terminal de Vpr, o que novamente traria consequências negativas ao vírus como redução na eficiência de bloqueio do ciclo em G2, transativação do LTR e apoptose. Por último, algumas mudanças na segunda alfa hélice de Vpr, poderiam alterar a localização nuclear de Vpr no estágio inicial. O impacto negativo dessas alterações, seria principalmente sobre a função de transativação de LTR e de alguns genes da célula alvo por Vpr (Figura 1.9). Curiosamente, os pacientes E9/L9 e E8/L8 apresentaram algumas alterações deletérias para as funções desempenhadas pela proteína Vpr, em ambos os períodos (inicial e tardio). É possível destacar a alteração na serina S94G (serina associada ao bloqueio do ciclo celular em G2)(E9/L9); a alteração F72L (mudança pontual responsável por reduzir a importação de Vpr para o núcleo da célula hospedeira, o que pode influenciar a progressão do ciclo viral) no paciente 9 e a presença de um *stop codon* na posição W54 (afeta a interação entre Vpr e UNG2) no paciente 8. A presença destas alterações em ambos os períodos pode obedecer a uma baixa taxa de diferenciação viral, dado o curto espaço de tempo entre as coletas das amostras (inicial e tardia) nesses pacientes ou ser resultado de uma mudança viral acontecida anteriormente a primeira coleta das amostras, em resposta a alguma mudança no microambiente do hospedeiro.

Finalmente a sequência consenso de todos os pacientes no estágio tardio, possui um maior número de mudanças quando comparada a sequência consenso “geral” do estágio inicial (Figuras 4.6 e 4.7).

4.3.1. Análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos iniciais e tardios e as funções da proteína Vif

A principal função da proteína Vif é inibir proteínas celulares da família APOBEC3. Com base nisso, foram analisados os domínios funcionais ligados a essa ação. Os principais aminoácidos descritos como relevantes para a ligação entre APOBEC e Vif, são os seguintes resíduos conservados: W5, W11, W21, W38, W79, W89, T96, C114, C133, S144, T155, P164 e T188 (Barraud *et al.*, 2008). Nas sequências analisadas de Vif foram encontradas algumas alterações nos triptofanos conservados. O indivíduo E2 apresentou uma substituição na posição W38L em um alelo. Já o paciente E8 (1 alelo) apresentou um

stop codon na posição W21 e o paciente E9 (1 alelo) apresentou a mesma alteração, porém na posição W38, o que levaria a produção de uma proteína truncada, portanto não funcional.

No estágio tardio, foram encontradas mudanças em alguns alelos, nas treoninas conservadas das posições: T96A (L9), T155K (L8 e L10) e T188S (L2). Vif pode ser fosforilado nessas treoninas, mas quando mutadas mostraram não afetar a capacidade de ligação Vif-A3G (Mehle *et al.*, 2004). As mudanças comumente encontradas nos domínios funcionais de ligação a A3G e A3F são as substituições: R33K (domínio *G Box*), R63K (domínio *F-G Box*), K92R (região importante para ligação a A3G), D101N, H127R, R132S (os dois últimos no domínio HCCH de ligação a *Cullin5*), K158R (domínio *BC-Box*) e I159R (*Cullin Box*). Todas as mutações relacionadas anteriormente estão presentes na sequência consenso do estágio inicial, aparecendo em mais de 50% das sequências dos clones iniciais. Não há na literatura informação a respeito dos efeitos dessas alterações nas funções de Vif.

No estágio tardio as mudanças presentes na sequência consenso, com ocorrência igual ou superior a 50% nos alelos são as seguintes: Y30H, R33K, G37K (domínio *G Box*), R63K (domínio *F-G Box*), K92E (região importante para ligação a A3G), D101G, I128R, R132S (os dois últimos no domínio HCCH de ligação a *Cullin5*), K158R (domínio *BC-Box*) e I159R (*Cullin Box*). Um aminoácido localizado na posição 101 descrito como crucial para a ligação entre Vif e APOBEC (Barraud *et al.*, 2008), encontra-se mutado no estágio inicial nos indivíduos E2 (2 alelos) e E9 (8 alelos)(D101G) e E5 (5 alelos), E7 (5 alelos) e E8 (6 alelos)(D101N). Já no estágio final está presente nos pacientes L2 (5 alelos)(D101G / D101N), L8 (3 alelos)(D101N) e L9 (9 alelos)(D101G). Estas mudanças podem ter consequências na afinidade de ligação entre a proteína viral e APOBEC. Um dos domínios de interação entre APOBEC3F e Vif (*F1 Box*; 11-17) encontra-se extremamente conservado nos dois momentos de infecção (inicial e tardio).

Em resumo, após a análise das principais regiões de interação entre Vif e APOBEC, foram observadas alterações nos triptofanos conservados presentes no estágio inicial dos pacientes E2 (W38L), E8 (W21) e E9 (W38). Essas alterações citadas anteriormente, principalmente a presença de *stop codons* nas posições W21 e W38, poderia interferir na capacidade de interação inicial da proteína viral com seu alvo celular. As consequências negativas para o vírus se refletiriam principalmente na síntese do DNA viral durante o processo de transcrição reversa. A presença de APOBEC nas partículas virais, culminaria na

degradação do DNA viral (Conticello *et al.*, 2005)(Holmes *et al.*, 2007)(Miyagi *et al.* 2007)(Bishop *et al.*, 2008). Por outro lado, as mudanças ocorridas nas treoninas conservadas em pacientes no momento tardio (L2, L8, L9 e L10), não afetam a capacidade de ligação entre Vif e APOBEC. Portanto foram encontradas mais mudanças capazes de interferir na interação entre Vif e seu alvo celular no período inicial. No entanto um Ácido aspártico (D) presente na posição 101, que foi descrito como essencial para a ligação entre Vif e APOBEC (Barraud *et al.*, 2008), apresentou-se alterado em sequências de ambos os períodos (inicial e final). Com Possíveis consequências deletérias para a função desempenhada por Vif na degradação de APOBEC, nos diferentes momentos estudados.

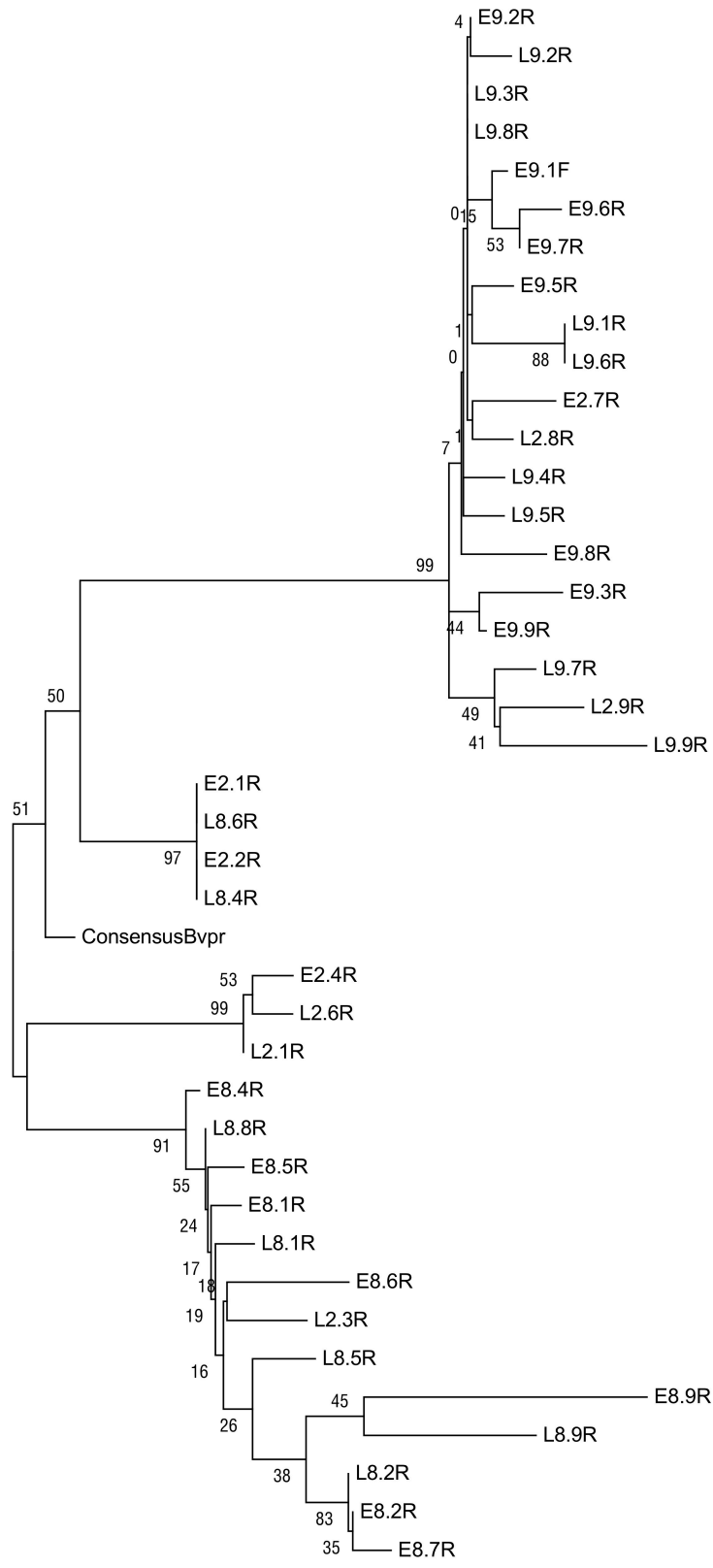
4.4. Análise filogenética

As árvores filogenéticas referentes as sequências das proteínas Vpr e Vif foram geradas no programa Mega 5, com o algoritmo *Maximum likelihood* (máxima verossimilhança), utilizando-se as sequências dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9, por possuírem sequências dos alelos de ambos os estágios, e a sequência de referência do subtipo B, obtida no *site* Los Alamos. A reprodutibilidade de cada ramo foi estimada por um valor de *bootstrap* de 1000 réplicas. As sequências consenso do subtipo B das proteínas Vif e Vpr foram utilizadas como grupo externo. Um valor de *bootstrap* igual ou superior a 50% foi considerado relevante para uma possível evolução dos vírus do estágio tardio, a partir dos variantes presentes no estágio inicial.

Na árvore filogenética gerada utilizando-se as sequências de aminácidos de Vpr, os alelos do paciente 8 (E8/L8) tendem a ficar próximos na árvore, assim como as do paciente 9 (E9/L9). Enquanto os alelos do paciente 2 (E2/L2) se interpõem entre as sequências de E8/L8 e E9/L9. Isso pode ter ocorrido devido a maior variabilidade observada nas sequências do paciente E2/L2 (Figuras 4.2 e 4.3). Em relação a uma análise evolutiva do vírus intra-hospedeiro, um fator importante a ser considerado é o tempo entre as coletas das amostras. Apesar do intervalo entre as coletas dos pacientes analisados não ser ideal, Nota-se a presença de ramos entre sequências do estágio inicial e tardio do mesmo paciente, com valores de *bootstrap* superiores a 50% (E2.4R e L2.6R [53%]; E8.2R e L8.2R [83%]; E8.4R e L8.4R [91%]). Além da tendência das sequências dos pacientes E8/L8 e E9/L9 de

apresentarem-se agrupados na árvore filogenética, o que pode ser um indício de co-evolução viral.

A árvore filogenética gerada utilizando as sequências de aminoácidos de Vif apresentou o mesmo padrão da análise filogenética de Vpr. Os pacientes E8/L8 e E9/L9, se encontram agrupados, novamente com a interposição de alguns alelos do paciente E2/L2, confirmando os resultados obtidos com as sequências de Vpr. Uma possível explicação seria a maior variabilidade apresentada também na sequência da proteína Vif. Isso pode ocorrer devido a sobreposição (*overlap*), que ocorre entre os genes vif e vpr. Isso faz com que os alelos do paciente E2/L2 se aproximem dos alelos dos demais pacientes na árvore filogenética. Da mesma maneira que ocorreu anteriormente com Vpr, estão presentes ramos entre sequências do estágio inicial e tardio do mesmo paciente, com valores de *bootstrap* superiores a 50% (E2.4F e L2.1R [55%]; E9.9F e L9.9F [99%]; E8.4F e L8.1F [79%]), indicando uma evolução viral ao longo da infecção.



0.02

Figura 4.9.1. Árvore filogenética dos alelos de Vpr presentes em dois estágios de infecção inicial (E) e tardio (L). Árvore gerada no programa Mega 5 com o método *Maximum likelihood* (máxima verossimilhança). O *bootstrap* foi de 1000 replicatas 78

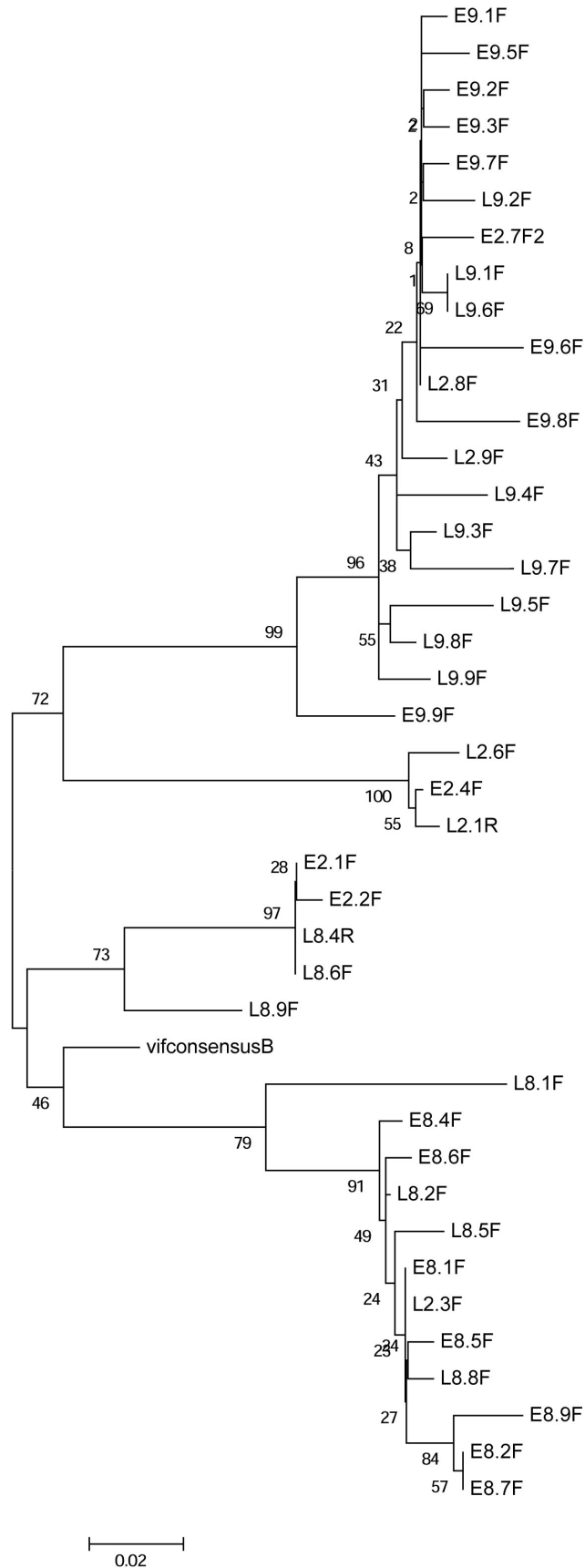


Figura 4.9.2. Árvore filogenética dos alelos de Vif presentes em dois estágios de infecção inicial (E) e tardio (L). Árvore gerada no programa Mega 5 com o método *Maximum likelihood* (máxima verossimilhança). O *bootstrap* foi de 1000 replicatas 79

4.5 Análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos de vpr e vif e os diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1

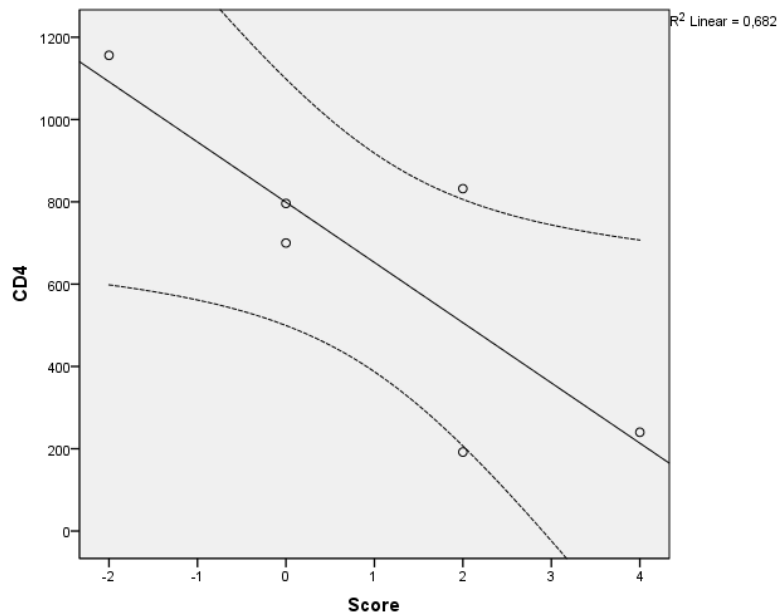
Como explicado em material e métodos, e com objetivo de verificar uma possível correlação entre as alterações presentes nos alelos em cada estágio da infecção e seus correspondentes níveis de LT-CD4⁺ e carga viral detectados em sangue periférico, foi primeiramente criado um *score* baseado na similaridade entre as alterações apresentadas pela sequência consenso de cada paciente com as sequências consenso de cada estágio. Finalmente, a partir dos valores do *score* e os correspondentes aos níveis de LT-CD4 e carga viral para cada paciente e estágio, foi gerado um gráfico de regressão (Figuras 4.7 e 4.9). O modelo de regressão simples foi analisado quanto a quatro requisitos de qualidade: **(I)** O coeficiente de correlação linear de Pearson (r), cujo o valor para indicar forte correlação deve ser maior que 0,70. **(II)** O coeficiente de determinação (r^2), que representa a porcentagem de explicação do modelo, ou seja quanto o modelo explica a influência do *score* sobre a contagem de células CD4⁺ e a carga viral. **(III)** Teste de significância do modelo (F). O modelo é considerado significativo quando o valor de Sig. (representação para significância) é menor que 0,05. **(IV)** Teste de significância do coeficiente de regressão (t). O modelo é considerado significativo se o valor de Sig. for menor que 0,05.

Dessa forma, e com base no gráfico, foi possível observar uma forte correlação negativa ($r = -0,826$ [Vpr] e $r = -0,840$ [Vif]) entre os níveis de células LT CD4⁺ e o valor do *score* para cada paciente e estágio, ou seja, quanto maior o número do *score*, menor é o número LT-CD4⁺. Os valores de Sig. para o teste de significância do modelo (F) e para o teste de significância do coeficiente de regressão (t) foram menores que 0,05 para Vif e Vpr (Sig. (F) = 0,043; Sig. (t) = 0,043 [Vpr] e Sig. (F) = 0,036 ; Sig. (t) = 0,036 [Vif]) indicando que o modelo em que o *score* influencia a contagem de células CD4⁺ é significativo. O valor de r^2 indica que o *score* se aplica a mais de 68,2% (Vpr) e 70,6 % (Vif) dos indivíduos estudados. (Figuras 4.7 e 4.9)

Entretanto, ao analisar os gráficos produzidos a partir dos dados do *score* e os valores da carga viral para cada paciente e estágio, não foi possível observar uma correlação significativa entre o valor do *score* e carga viral. Principalmente quando se observa os valores de r ($r = 0,377$ [Vpr] e $r = 0,693$ [Vif]), menor que 0,70 para as duas proteínas virais. Além disso os valores que indicam a significância do modelo foram superiores a 0,05 (Sig. (F) =

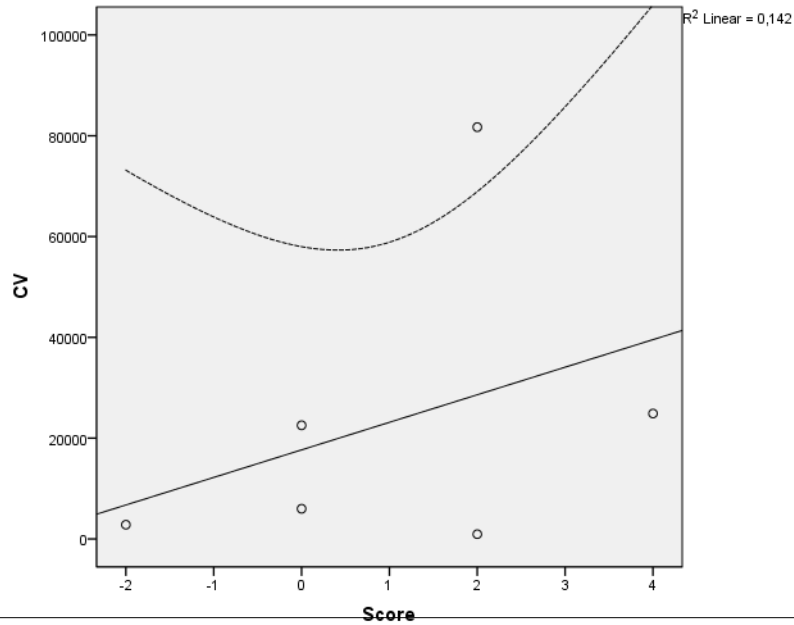
0,462; Sig. (t) = 0,462 [Vpr] e Sig. (F) = 0,127; Sig. (t) = 0,127 [Vif]), portanto um modelo onde o *score* influencia a carga viral para estas amostras analisadas não é significativo (Figuras 4.8 e 4.9.1)

Em resumo, as alterações detectadas nos alelos de ambas as proteínas virais se correlacionam significativamente e de uma forma negativa com os níveis de células LT-CD4+, indicando que o surgimento de alterações nas sequências no estágio tardio estariam relacionada com a queda de LT-CD4+ e conseqüentemente com a deteriorização do sistema imune do paciente. Entretanto não foi possível traçar uma correlação significativa entre os *scores* e a carga viral dos pacientes nos dois momentos da infecção, o que em certa forma viria a confirmar relatos da literatura no sentido da falta de correlação entre infectividade viral e a queda de linfócitos CD4+ e a conseqüente deterioração do sistema imunológico (Rodríguez *et al.*, 2009)(Wu *et al.*, 2009). A análise de um maior número de alelos, assim como de amostras obtidas a intervalos maiores, seria de grande ajuda para confirmar essas tendências.



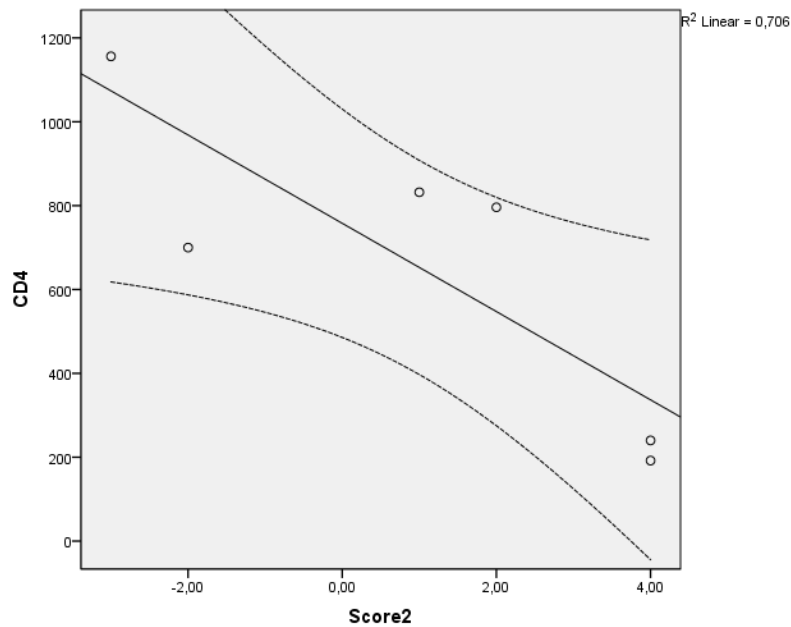
Modelo: $CD4 = -146,364 \cdot Score + 799,030$; $r = -0,826$; Sig. (F) = 0,043 ; Sig. (t) = 0,043

Figura 4.9.3. Correlação entre os *scores* das seqüências dos diferentes estágios da proteína Vpr e a contagem de células CD4+ dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9. O círculo representa o número de células CD4 e o *score* correspondente. O coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (r^2), a significância do modelo (F) e do coeficiente de correlação (t), baseado no gráfico, são descritos no texto. O valor de r^2 representado no gráfico encontra-se em módulo.



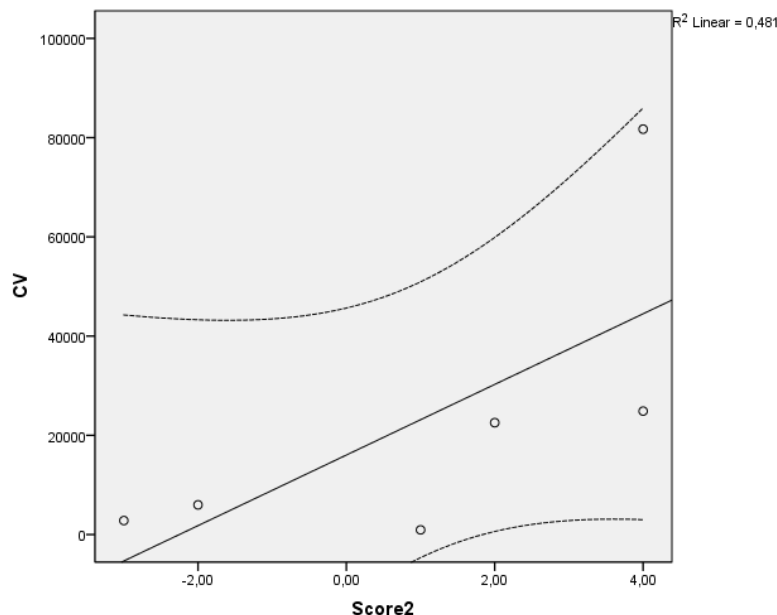
Modelo: $CV = 5468,227 \cdot Score + 17677,606$; $r = 0,377$; $\text{Sig. (F)} = 0,462$; $\text{Sig. (t)} = 0,462$

Figura 4.9.4 Correlação entre os escores das seqüências dos diferentes estágios da proteína Vpr e a contagem de carga viral (CV) dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9. O círculo representa a contagem de carga viral e o *score* correspondente. O coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (r^2), a significância do modelo (F) e do coeficiente de correlação (t), baseado no gráfico, são descritos no texto.



Modelo: $CD4 = -105,273 \cdot Score + 757,939$; $r = -0,840$; $\text{Sig. (F)} = 0,036$; $\text{Sig. (t)} = 0,036$

Figura 4.9.5 Correlação entre os escores das seqüências dos diferentes estágios da proteína Vif e a contagem de células CD4+ dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9. O círculo representa o número de células CD4 e o *score* correspondente. O coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (r^2), a significância do modelo (F) e do coeficiente de correlação (t), baseado no gráfico, são descritos no texto. O valor de r^2 representado no gráfico encontra-se em módulo. *Score 2*, representa o *score* da proteína viral Vif.



Modelo: $CV = 7115,568 \cdot \text{Score} + 16030,265$; $r = 0,693$; $\text{Sig. (F)} = 0,127$; $\text{Sig. (t)} = 0,127$

Figura 4.9.6. Correlação entre os escores das seqüências dos diferentes estágios da proteína Vif e a contagem de carga viral (CV) dos pacientes E2/L2, E8/L8 e E9/L9. O círculo representa a contagem de carga viral e o *score* correspondente. O coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (r^2), a significância do modelo (F) e do coeficiente de correlação (t), baseado no gráfico, são descritos no texto. *Score* 2, representa o *score* da proteína viral Vif.

4.6. Análise da estrutura terciária das proteínas Vpr e Vif

Foi gerado o modelo computacional da estrutura terciária do alelo E8.1R da proteína Vpr no programa SWISS MODEL, assim como o da estrutura consenso do subtipo B (Figura 4.9.7 B). Foi utilizado ainda, o programa Calculate Structure Alignment, o qual sobrepôs as estruturas terciárias do clone e do consenso do subtipo B. O modelo foi determinado na presença de CD(3)CN e em água pura, com baixo pH, no caso de Vpr (Morellet *et al.*, 2003). O modelo computacional de Vif foi determinado para o domínio *BC-Box*, que teve sua estrutura resolvida conforme descrito no artigo de Stanley e colaboradores (Stanley *et al.*, 2008). A seqüência E8.1 R (Vpr) foi escolhido por apresentar uma das mutações mais relevante dentre as encontradas, F72L, que corresponde à troca de uma fenilalanina por uma leucina na posição 72. Ambos os resíduos de aminoácidos possuem característica apolar e neutra. Em adição, foi encontrada uma similaridade estrutural de 95% (Figura 4.9.2 C). Portanto provavelmente essa mutação não provoca modificação na função da proteína. Isso é corroborado na figura 4.9.2 C, pois a estrutura do clone estudado e a do consenso do subtipo B são extremamente semelhantes. Foi feito o mesmo procedimento para o alelo L8.9R

presente no estágio tardio. Esse alelo apresenta um *stop codon* na posição W54 (importante na interação com UNG2), o que resulta em uma proteína viral truncada, caso a mesma seja traduzida. Essa proteína não apresentaria a terceira alfa hélice, nem a porção C-terminal, sendo portanto incapaz de desempenhar as principais funções de Vpr, principalmente as funções ligadas a interrupção do ciclo celular em G2 e apoptose (Figura 4.9.3 A). A mesma perderia a função de transdução desempenhada por meio da região carbóxi terminal ou mesmo a capacidade de ligação ao GR (receptor de glicocorticóide).

Todo o processo anteriormente descrito para a análise da estrutura terciária das proteínas, foi repetido para o alelo E8.1F (Vif) de Vif. A região analisada corresponde ao motivo *BC-Box* (140 – 155). A principal alteração encontrada nesse domínio foi a alteração A151T, com a mudança de um aminoácido apolar (A) para um aminoácido polar (T). A região onde ocorre a alteração é responsável por criar a face hidrofóbica que interage com *EloginC* (Stanley *et al.*, 2008). Apesar da mudança, não houveram alterações significativas na estrutura desse domínio de ligação a *EloginC*, que justificasse uma possível interferência na ligação entre essa região de Vif e *EloginC*. Com o auxílio do programa *Calculate Structure Alignment*, foi possível determinar a similaridade estrutural entre o consenso do subtipo B e o alelo E8.1F, com um valor de similaridade entre as estruturas superior a 90%.

Os gráficos de Ramachandran (*Ramachandran Plot*) produzidos para a validação e análise da qualidade estereoquímica dos modelos, são apresentados nas figuras 4.9.9.1, 4.9.9.2 e 4.9.9.3. Os modelos computacionais dos alelos de Vpr apresentaram as seguintes porcentagens de resíduos de aminoácidos na região do *core*: E8.1R - 88,3% (MolProbity) e 77% (VADAR) (Figura 4.9.9.2); L8.9R - 84,3% (MolProbity) e 69% (VADAR) (Figura 4.9.9.2). É importante ressaltar que o modelo obtido no *site* PDB (1M8L), utilizado como base para geração dos modelos de E8.1R e L8.9R, assim como o modelo gerado do consenso do subtipo B de Vpr, apresentam uma porcentagem de resíduos na região do *core* inferior a 90% (Figura 4.9.9.1 e 4.9.9.3). Já o modelo do alelo de Vif apresentou uma porcentagem de resíduos de aminoácidos na região do *core* mais satisfatória, próxima de 90%: E8.1F - 86,7% (MolProbity) e 88% (VADAR) (Figura 4.9.9.3)

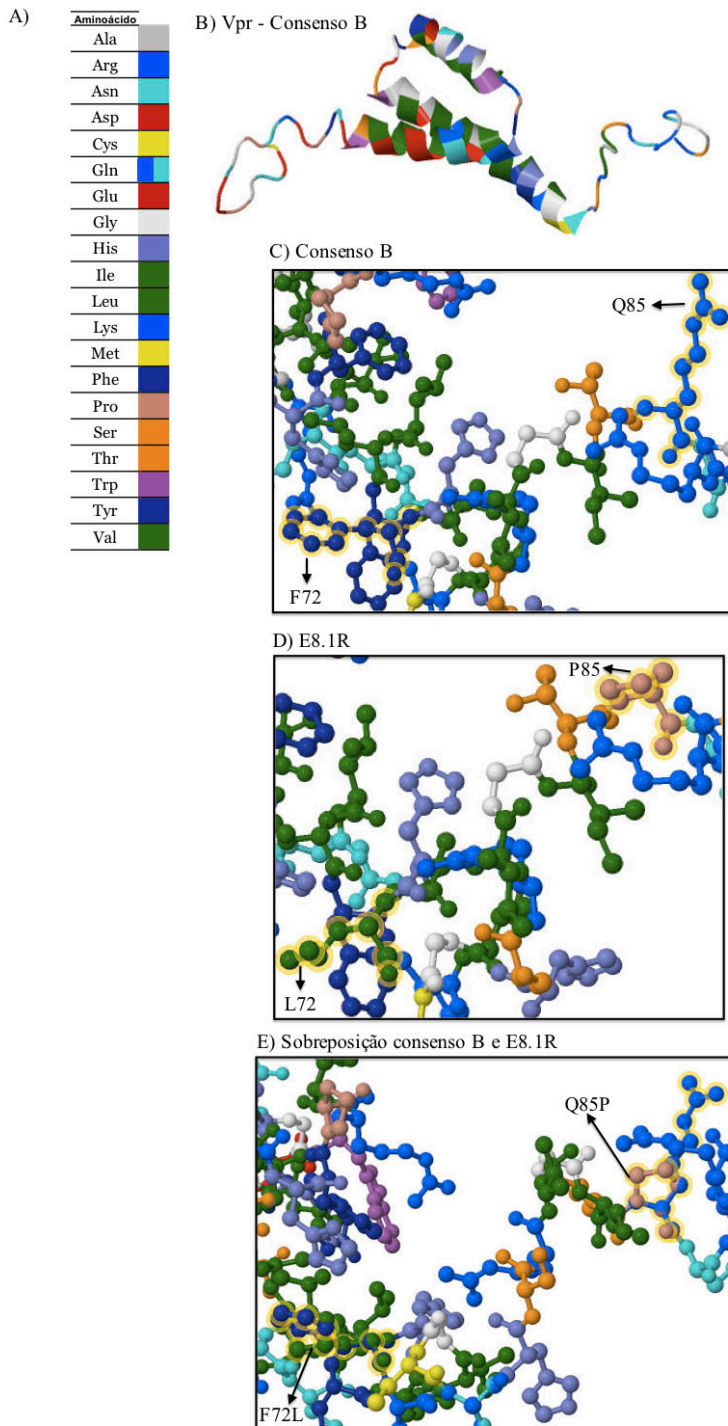


Figura 4.9.7. Comparação entre os modelos computacionais das estruturas terciárias da proteína Vpr. **A)** Correspondência entre os aminoácidos e as cores **B)** Estrutura terciária de Vpr do consenso do subtipo B. **C)** Detalhe da região na proteína no consenso do subtipo B onde estão localizados os aminoácidos F72 e Q85. **D)** Detalhe da região na proteína de E8.1R onde estão localizados os aminoácidos F72 e Q85. **E)** Detalhe da sobreposição das proteínas C) e D), com destaque para a sobreposição dos aminoácidos, indicada pelas setas (jmol, 2011).

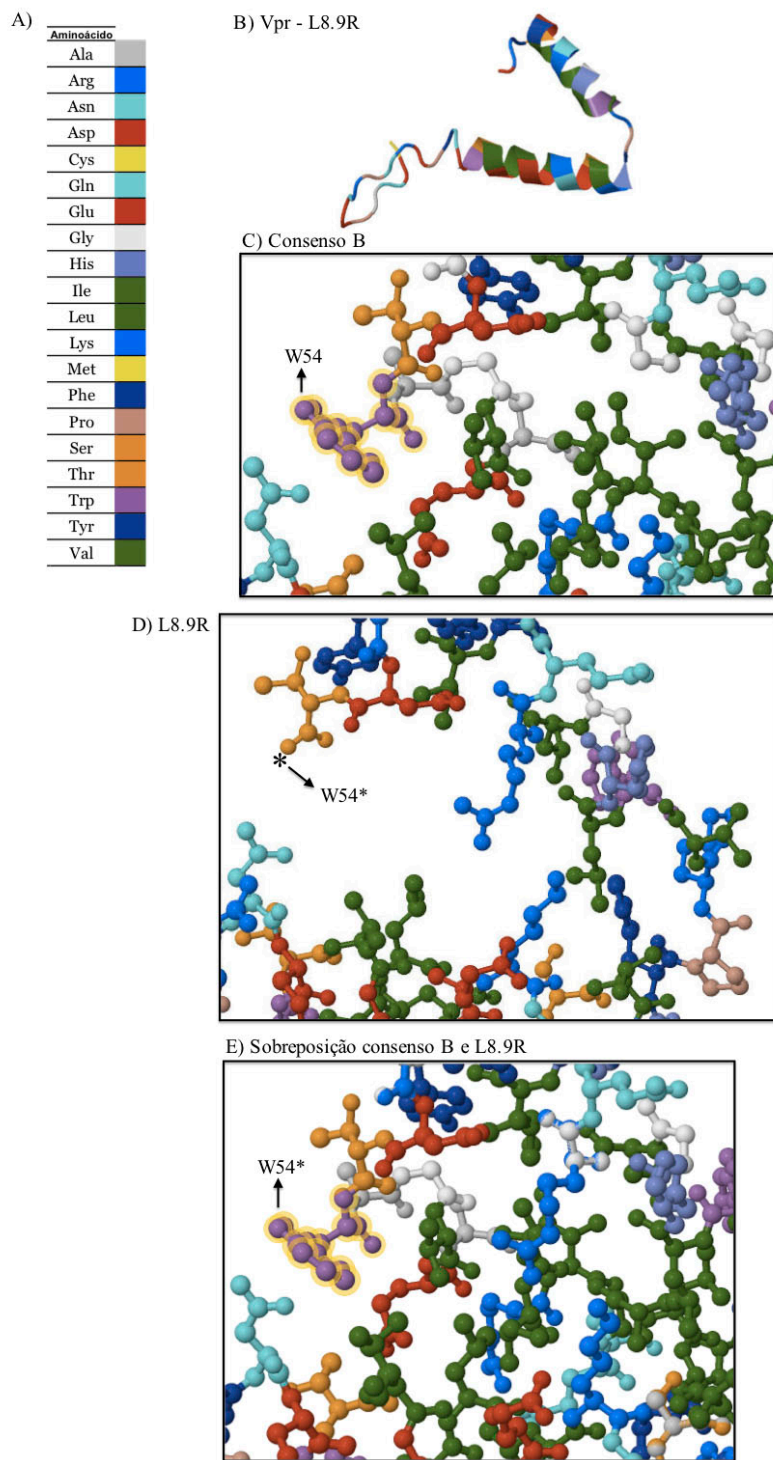


Figura 4.9.8. Comparação entre os modelos computacionais das estruturas terciárias da proteína Vpr. **A)** Correspondência entre os aminoácidos e as cores **B)** Estrutura terciária do alelo L8.9R de Vpr. **C)** Detalhe da região na proteína no consenso do subtipo B onde está localizado o aminoácido W54. **D)** Detalhe da região na proteína de L8.9R onde está localizado o *stop codon* (representado por um asterisco) na posição 54 (W54*). **E)** Detalhe da sobreposição das proteínas C) e D), com destaque para a posição W54 indicada por uma seta (jmol, 2011).

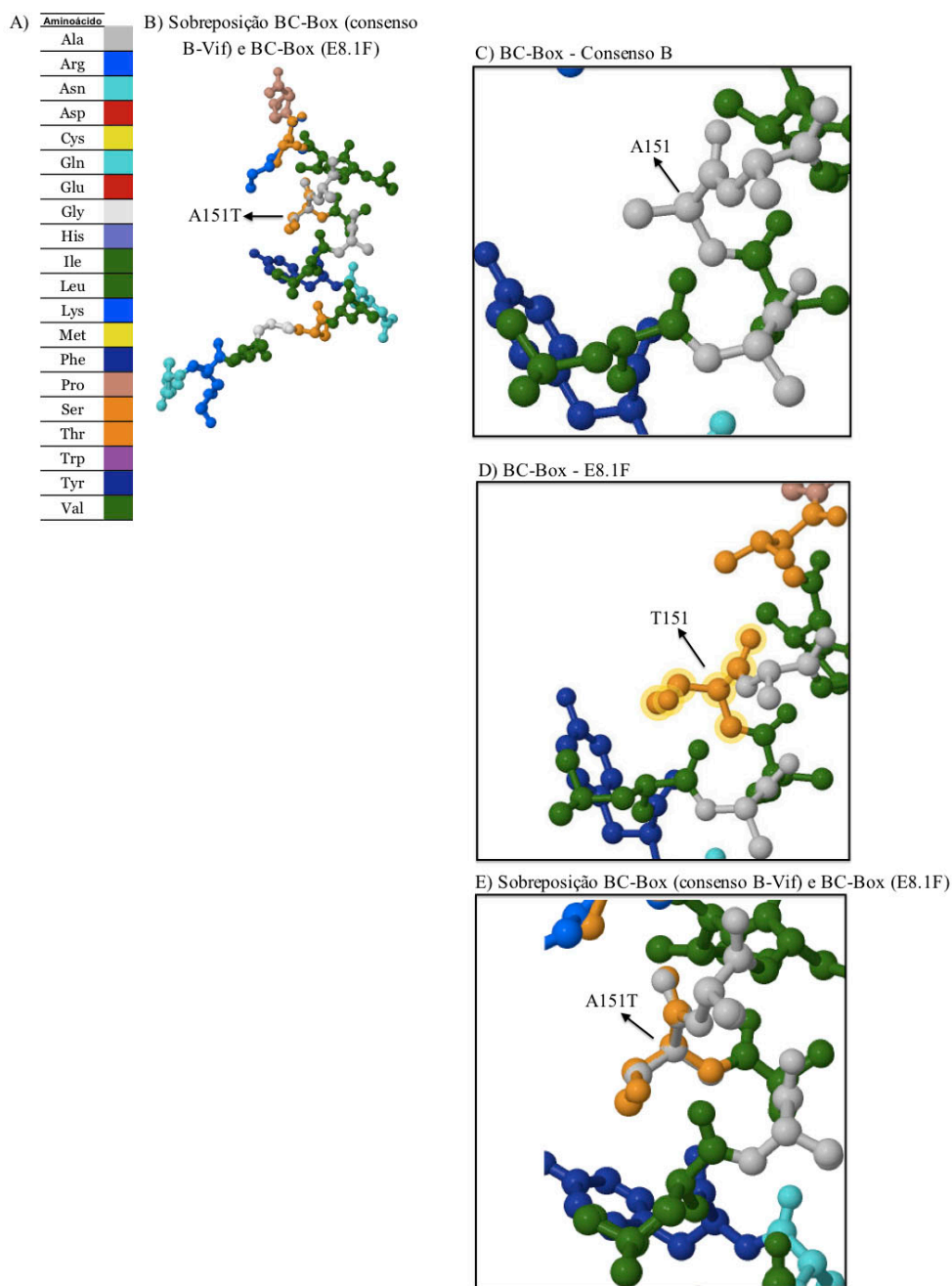
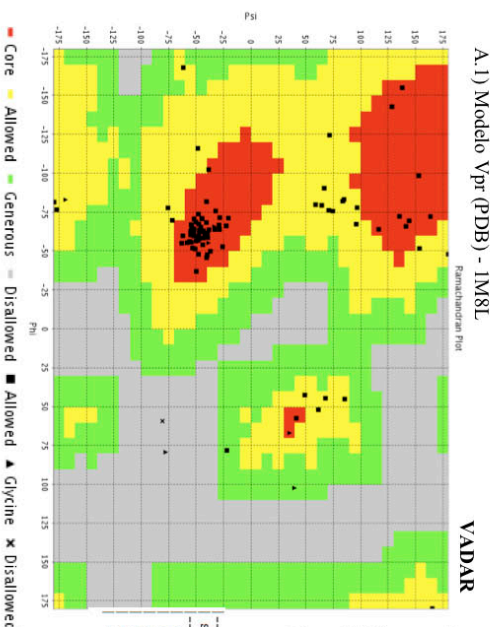
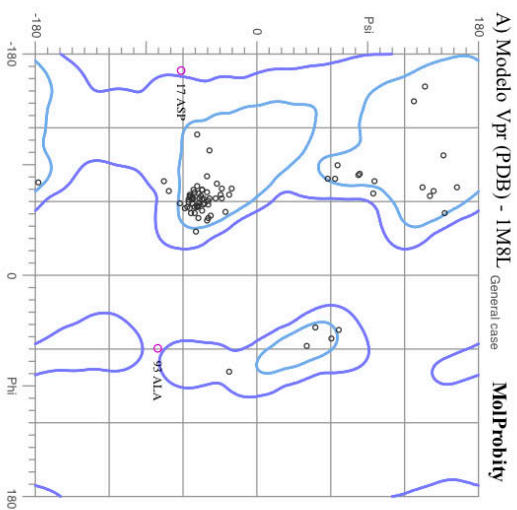


Figura 4.9.9. Comparação entre os modelos computacionais das estruturas terciárias da proteína Vif. **A)** Correspondência entre os aminoácidos e as cores **B)** Sobreposição da estrutura terciária de Vif do clone E8.1F (domínio *BC-Box* 140 – 155) e o consenso do subtipo B do domínio *BC-Box* destaque para a mudança A151T em E8.1F. **C)** Destaque para o aminoácido presente na região *BC-Box* (A151) no consenso do subtipo B. **D)** Detalhe do aminoácido (T151) presente em E8.1F. **E)** Sobreposição dos domínios *BC-Box* das proteínas C) e D) e a consequente sobreposição dos aminoácidos detalhados e indicados por uma seta (A151T) (jmol, 2011).



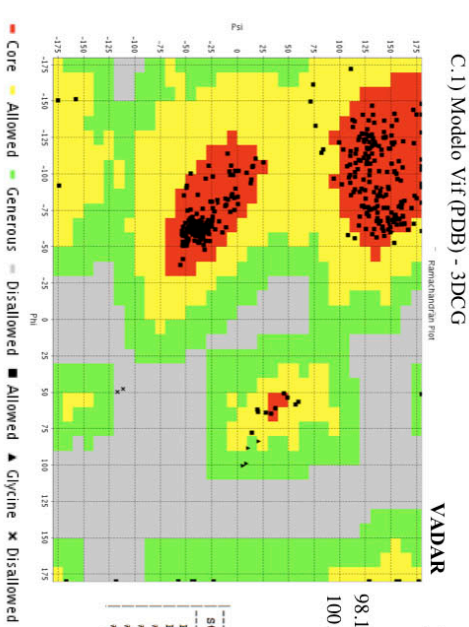
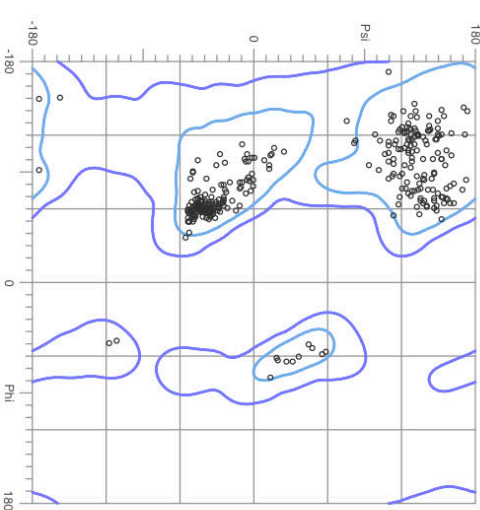
B) Modelo Vpr (PDB) - 1M8L

MolProbity

88.3% (83/94) of all residues were in favored (98%) regions.
 97.9% (92/94) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.
 17 ASP (-167.8, -61.7)
 93 ALA (59.3, -80.7)

VADAR		Expected	
Statistic	Observed	Observed	Expected
Resolution			
R Value	73 (768)	86 (908)	-
# res in phipld core	21 (218)	7 (74)	-
# res in phipld allowed	1 (18)	1 (18)	-
# res in phipld generous	0 (0)	0 (0)	-
# res in phipld outside	0 (0)	0 (0)	-

C) Modelo Vif (PDB) - 3DCG



D) Modelo Vif (PDB) - 3DCG

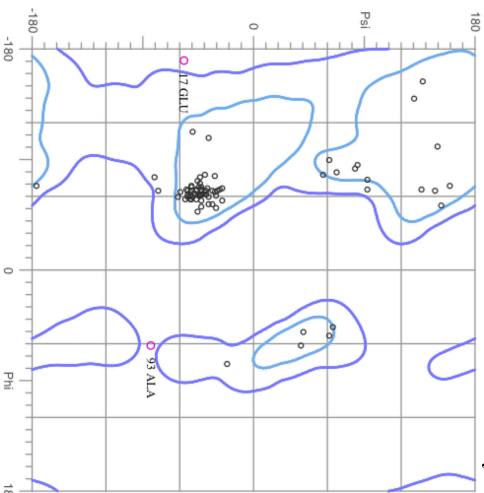
MolProbity

98.1% (370/377) of all residues were in favored (98%) regions.
 100.0% (377/377) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

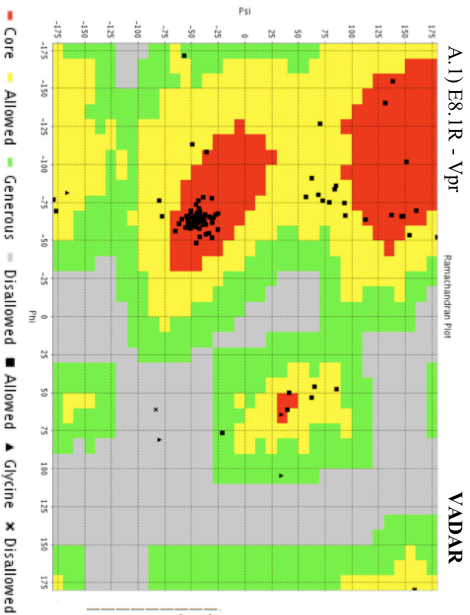
VADAR		Expected	
Statistic	Observed	Observed	Expected
Resolution			
R Value	377 (948)	359 (908)	-
# res in phipld core	20 (58)	28 (74)	-
# res in phipld allowed	0 (0)	4 (18)	-
# res in phipld generous	0 (0)	0 (0)	-
# res in phipld outside	0 (0)	0 (0)	-

Figura 4.9.9.1. Gráficos de Ramachandran (Ramachandran Plot) as porcentagens dos resíduos de 1M8L e 3DCG em cada região. A) e C) Gráfico gerado para os modelos 1M8L e 3DCG utilizando o programa MolProbity. Delimitado em azul claro encontra-se a região do "core" e em azul escuro a região "allowed". As demais áreas brancas representam as regiões "generous" e "disallowed". Pequenos círculos pretos representam os resíduos de aminoácidos. A.1) e C.1) Gráfico gerado para os modelos 1M8L e 3DCG utilizando o programa VADAR. A região vermelha corresponde ao "core" e a região amarela a região "allowed". A área amarela e a região cinza representam as regiões "generous" e "disallowed". Pequenos pontos pretos representam os resíduos de aminoácidos. C) e D) são as porcentagens dos resíduos de 1M8L e 3DCG em cada região

A) E8. IR - Vpr General case MolProbity



A.1) E8. IR - Vpr

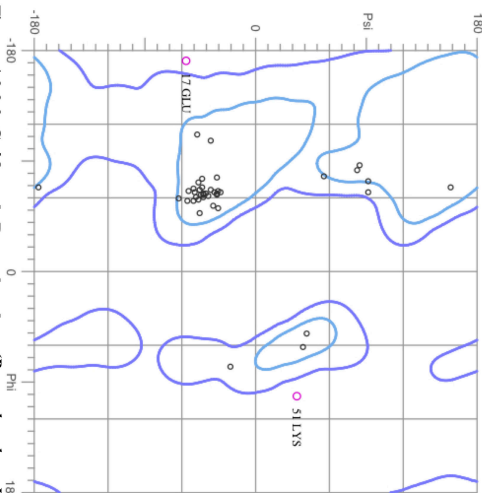


B) E8. IR - Vpr
MolProbity
 88.3% (83/94) of all residues were in favored (98%) regions.
 97.9% (92/94) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.
 17 GLU (-171.6, -56.9)
 93 ALA (61.2, -83.6)

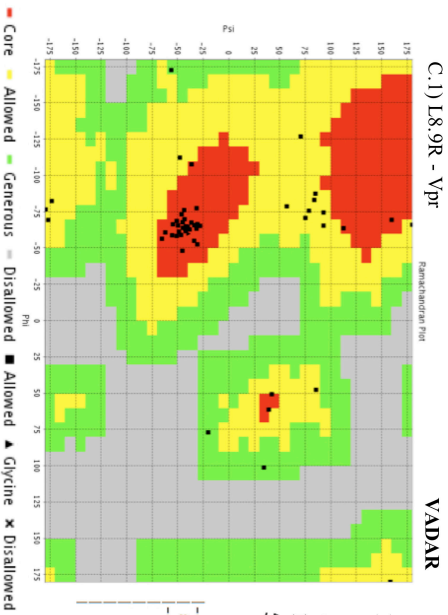
VADAR

Statistic	Observed	Expected
Resolution		
R Value	74 (77%)	86 (90%)
# res in phipsi core	19 (19%)	7 (7%)
# res in phipsi allowed	2 (2%)	1 (1%)
# res in phipsi generous	0 (0%)	0 (0%)
# res in phipsi outside		

C) L8.9R - Vpr General case MolProbity



C.1) L8.9R - Vpr



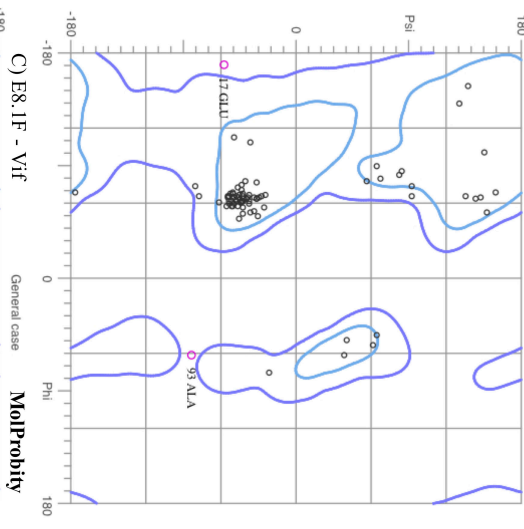
D) L8.9R - Vpr
MolProbity
 84.3% (43/51) of all residues were in favored (98%) regions.
 96.1% (49/51) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.
 17 GLU (-172.5, -56.3)
 51 LYS (101.2, 34.6)

VADAR

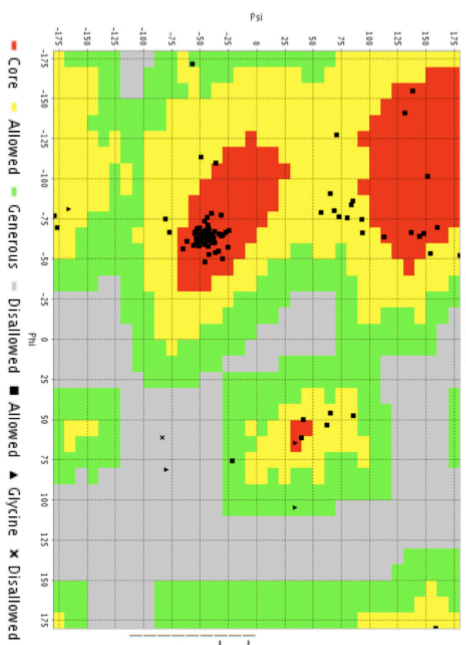
Statistic	Observed	Expected
Resolution		
R Value	37 (69%)	48 (90%)
# res in phipsi core	13 (24%)	4 (7%)
# res in phipsi allowed	3 (5%)	1 (1%)
# res in phipsi generous	0 (0%)	0 (0%)
# res in phipsi outside		

Figura 4.9.9.2. Gráficos de Ramachandran (*Ramachandran Plot*) e as porcentagens dos resíduos de E8.1R e L8.9R em cada região. A) e C) Gráfico gerado para os modelos E8.1R e L8.9R utilizando o programa MolProbity. Delimitado em azul claro encontra-se a região do "core" e em azul escuro a região "allowed". As demais áreas brancas representam as regiões "generous" e "disallowed". Pequenos círculos pretos representam os resíduos de aminoácidos. A.1) e C.1) Gráfico gerado para os modelos E8.1R e L8.9R utilizando o programa VADAR. A região vermelha corresponde ao "core" e a região amarela e a região cinza representam as regiões "generous" e "disallowed". Pequenos pontos pretos representam os resíduos de aminoácidos. C) e D) são as porcentagens dos resíduos de E8.1R e L8.9R em cada região

A) Consenso B Vpr



A.1) Consenso B Vpr



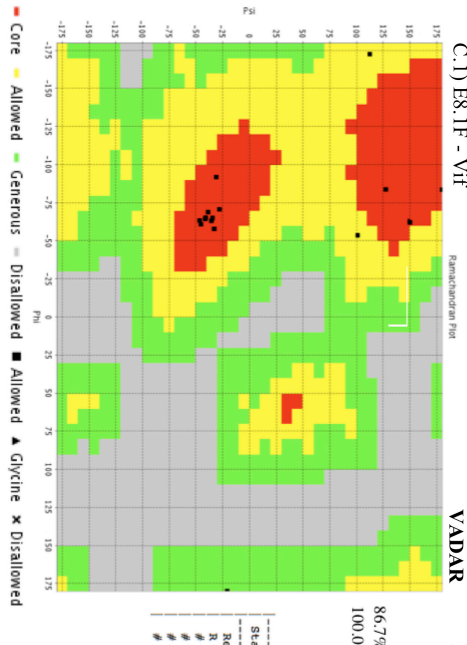
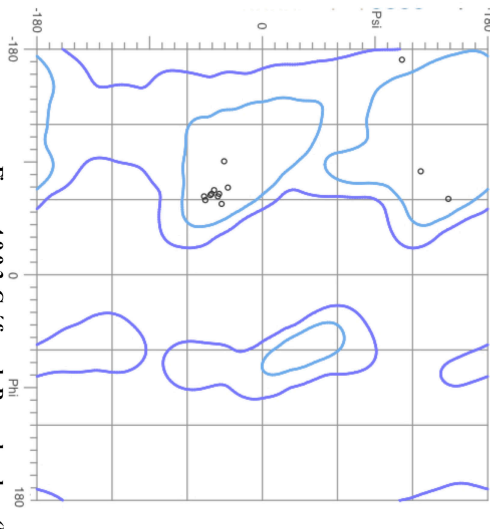
B) Consenso B Vpr

MolProbity
 88.3% (83/94) of all residues were in favored (98%) regions
 97.9% (92/94) of all residues were in allowed (>99.8%) regions
 17 GLU (-171.6, -57.0)
 93 ALA (61.2, -83.5)

VADAR

Statistic	Observed	Expected
Resolution		
R Value	74 (77%)	86 (90%)
# res in phiplai core	19 (19%)	7 (7%)
# res in phiplai allowed	7 (7%)	1 (1%)
# res in phiplai generous	2 (2%)	0 (0%)
# res in phiplai outside	0 (0%)	0 (0%)

C.1) E8.1F - Vif



D) E8.1F - Vif

MolProbity
 86.7% (13/15) of all residues were in favored (98%) regions
 100.0% (15/15) of all residues were in allowed (>99.8%) regions

VADAR

Statistic	Observed	Expected
Resolution		
R Value	15 (88%)	15 (90%)
# res in phiplai core	2 (13%)	1 (7%)
# res in phiplai allowed	0 (0%)	0 (0%)
# res in phiplai generous	0 (0%)	0 (0%)
# res in phiplai outside	0 (0%)	0 (0%)

Figura 4.9.3. Gráficos de Ramachandran (Ramachandran Plot) e as porcentagens dos resíduos de E8.1F e consenso B Vpr em cada região. A) e C) Gráfico gerado para os modelos E8.1F e consenso B Vpr utilizando o programa MolProbity. Delimitado em azul claro encontrase a região do "core" e em azul escuro a região "allowed". As demais áreas brancas representam as regiões "generous" e "disallowed". Pequenos círculos pretos representam os resíduos de aminoácidos: A.1) e C.1) Gráfico gerado para os modelos E8.1F e consenso B Vpr utilizando o programa VADAR. A região vermelha corresponde ao "core" e a região amarela a região "allowed". A área cinza representam as regiões "generous" e "disallowed". Pequenos pontos pretos representam os resíduos de aminoácidos. C) e D) são as porcentagens dos resíduos de E8.1F e consenso B Vpr em cada região.

4.7. Resumo da Discussão

Neste trabalho de pesquisa, foram caracterizadas as sequências do *pool* de alelos correspondentes as proteínas Vif e Vpr presentes em dois diferentes momentos de infecção em indivíduos HIV-1 positivos, livres de tratamento. Além dessa caracterização, foi realizado ainda o estudo filogenético das sequências correspondentes as proteínas Vif e Vpr, o estudo da correlação entre as alterações presentes nos alelos de Vpr e Vif e os diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1 e a análise da estrutura terciária de alguns alelos de Vif e Vpr. É importante ressaltar que na realização de um estudo com amostras biológicas de pacientes, existe sempre a influência de diversas variáveis, como por exemplo o "background" genético de cada hospedeiro, observado no polimorfismo de moléculas envolvidas na imunidade inata ou adquirida como são as moléculas do CPH Complexo maior de Histocompatibilidade), e que se reflete diretamente na capacidade intrínseca do sistema imune de controlar a infecção. Estas variáveis podem vir a mascarar o verdadeira relevância fisiológica do parâmetro em estudo por se tratar de uma amostra extraída do corpo de um indivíduo. Uma outra variável a ser considerada, é o tempo entre as coletas das amostras, o qual por não ser maior poderia, em alguns casos não refletir a evolução/mudança viral ao longo da infecção. Entretanto, dois panoramas gerais foram observados após análise das proteínas Vpr e Vif nos oito pacientes HIV positivos. Mudanças encontradas nas sequências do estágio inicial de Vpr foram associadas em geral a alguns impactos negativos para essa proteína. Dentre as alterações pode-se destacar: L5P e S10P (região N-terminal, redução na interação entre Vpr e cicloilina A); R73G, R85P e R87K (C-terminal, resíduos de argininas envolvidos na capacidade de transdução e de atravessar a bicamada lipídica) e V57A, G75K, G75R (na segunda alfa hélice, poderiam mudar a localização nuclear de Vpr).

Todas essas mudanças podem provocar efeitos deletérios nas principais funções desempenhadas por Vpr (indução de parada no ciclo celular em G2, apoptose e transativação do promotor vital LTR). Curiosamente dois pacientes E8/L8 e E9/L9 apresentaram dentre suas sequências, independente do período, um número semelhante de mudanças negativas para o vírus (S94G, F72L, W54 por *stop codon*). De maneira semelhante ao que ocorreu com Vpr, foram encontradas mais mudanças desfavoráveis ao vírus, nas sequências de Vif do período inicial (W38L, W21 por *stop codon*, W38 por *stop codon*; capazes de interferir na interação entre Vif e seu alvo celular, APOBEC). No entanto a exemplo do que ocorreu com

Vpr, a presença de uma alteração no resíduo de aminoácido de número 101 (D101G e D101N), descrito como essencial para ligação com APOBEC, foi detectada nos dois estágios analisados (inicial e tardio).

Todavia, mais dados são requeridos para que seja possível ter um panorama mais preciso a respeito do comportamento viral no que diz respeito às mudanças nessas duas proteínas ao longo do tempo.

Os alelos das proteínas Vif e Vpr do mesmo paciente em diferentes períodos, tendem a se agrupar na árvore filogenética. Mesmo com a presença de alguns alelos do paciente E2/L2 interpostos dentre os demais, é possível detectar ramos entre sequências do estágio inicial e tardio do mesmo paciente, com valores de *bootstrap* superiores a 50% (E2.4F/L2.1R [55%] ; E9.9F/L9.9F [99%] em Vif e E2.4R/L2.6R [53%] ; E8.2R/L8.2R [83%] em Vpr). Isto pode ser um indício de uma possível evolução viral, onde as populações virais presentes no período final se originariam a partir das presentes no estágio inicial por um processo de modificações em suas sequências, decorrente de pressões geradas por mudanças no ambiente da célula hospedeira.

A análise da correlação entre as alterações presentes nos alelos de Vpr e Vif e os diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1, revelou que as alterações detectadas em ambas as proteínas estariam de alguma forma relacionadas aos níveis de LT-CD4+. É possível notar uma tendência no gráfico de regressão, onde quanto maior é o *score*, menor é o número de células CD4+. Existe portanto, uma forte correlação entre as mudanças nas proteínas acessórias Vpr (*score*) e Vif (*score* 2) e a diminuição das células CD4+. Essa correlação foi corroborada pelos valores de *r* encontrados ($r = -0,826$ [Vpr] e $r = -0,840$ [Vif]). Entretanto não foi possível traçar uma correlação significativa entre os *scores* e a carga viral dos pacientes nos dois momentos da infecção, o que em certa forma viria a confirmar relatos da literatura no sentido da falta de correlação entre infectividade viral e a queda de linfócitos CD4+ e a conseqüente deterioração do sistema imunológico (Rodríguez *et al.*, 2009)(Wu *et al.*, 2009).

Por último, foram gerados modelos da estrutura terciária a partir de algumas sequências de Vif e Vpr (E8.1R, E8.1F e L8.9R). Entretanto, para os alelos analisados, observou-se grande similaridade estrutural, quando comparados com a estrutura do consenso

do subtipo B. As mudanças presentes nessas sequências, possivelmente não seriam capazes de impedir o correto funcionamento das proteínas virais.

É importante salientar que a relevância fisiológica das mutações detectadas nos alelos de Vpr e Vif presentes nos pacientes HIV-1 positivos, só poderá ser determinada por testes *in vitro*, mediante a expressão desses alelos em linhagens de células T, seja a partir de vetores de expressão ou de provírus, onde o genes vif e vpr do tipo selvagem NL4.3 são substituídos pelos alelos presentes nos diferentes estágios clínicos da infecção. Dessa forma, as principais propriedades funcionais de cada proteína, como a capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G2 e apoptose celular (no caso de Vpr) e a capacidade de Vif de interagir e bloquear a proteína celular APOBEC, poderão ser avaliadas comparando os alelos iniciais e tardios em relação ao tipo selvagem.

Capítulo 5. Conclusões

- Os alelos de vif e vpr foram amplificados, clonados e sequenciados em dois diferentes momentos de infecção em indivíduos HIV-1 positivos.
- A frequência de alterações deletérias para o vírus, encontradas nos alelos de vpr do estágio inicial é ligeiramente superior ao estágio tardio.
- Os alelos de vif do estágio inicial também apresentaram um maior número de alterações deletérias. Principalmente com a presença de códons de parada (*stop codons*) em triptofanos conservados (W).
- Os alelos de vif do estágio inicial podem ter sido alvos de hipermutação, por meio da ação de APOBEC3G, que tem como característica a introdução de alterações que levam a perda da função da proteína viral acessória. Isso ocorre com a introdução de *stop codons* em fase de leitura, preferencialmente nos triptofanos das posições 21, 70, 174.
- A menor frequência de alterações deletérias no estágio tardio é um indício de aumento de infectividade viral nesse estágio.
- Foi encontrado uma forte correlação negativa entre os níveis dos LT CD4+ e o *score* das proteínas Vif e Vpr (representa as alterações).
- A ausência de alterações deletérias para as proteínas virais Vif e Vpr nos alelos do estágio tardio, podem estar relacionadas com a queda de LT-CD4+ e consequentemente com a deteriorização do sistema imune do paciente.
- Os alelos das proteínas Vif e Vpr dos pacientes 8 e 9 nos dois diferentes períodos, encontraram-se agrupados na árvore filogenética.
- Foram detectados ramos com valores de *bootstrap* superiores a 50% entre sequências do estágio inicial e tardio do mesmo paciente. Isso pode ser um indício de uma possível co-evolução viral
- Foi encontrada uma grande similaridade entre as estruturas terciárias dos alelos analisados de Vif e Vpr em relação ao consenso dessas proteínas. As alterações presentes nos alelos possivelmente não ocasionam mudanças funcionais nas proteínas

5.1 Perspectivas

Em base aos dados obtidos neste trabalho a respeito da caracterização das sequências de aminoácidos dos alelos de vif e vpr, presentes em diferentes períodos de infecção, propomos como principais objetivos:

1. Clonar e expressar os diferentes alelos de vpr em linhagens de células T e linfócitos de sangue periférico, com objetivo de analisar comparativamente a capacidade de induzir parada do ciclo celular na fase G2 e de provocar apoptose (morte celular), entre os alelos presentes nos estágios inicial e tardio da infecção. Usar a técnica de citometria de fluxo para estabelecer a quantidade de células em G2 e quantas células sofreram processo de apoptose, quando comparamos alelos presentes nos estágios inicial e tardio da infecção, com o tipo selvagem.
2. Clonar e expressar os diferentes alelos de vif em linhagens de células T e linfócitos de sangue periférico, com objetivo de analisar comparativamente a capacidade de interagir e bloquear o seu alvo celular, as proteínas da família APOBEC3 (A3G e A3F), entre os alelos presentes nos estágios inicial e tardio da infecção.
3. Clonar e expressar os diferentes alelos de vpr em vetores lentivirais com objetivo de analisar sua capacidade de promover a apoptose e parada do ciclo da célula em G2, no contexto da infecção viral.
4. Clonar e expressar os diferentes alelos de vif em conjunto com os alelos de vpr em vetores lentivirais, com objetivo de analisar sua capacidade de bloquear a proteína celular APOBEC (o que pode afetar a produção do DNA viral) e assim interferir na capacidade desses vírus em promover a apoptose e bloqueio do ciclo da célula em G2, no contexto da infecção viral.

6. Referências Bibliográficas

Agostini I, Navarro JM, Bouhamdan M *et al.* 1999. The HIV-1 Vpr co-activator induces a conformational change in TFIIB. *FEBS Lett* 450:235–239

Albini *et al.* Identification of a novel domain of HIV tat involved in monocyte chemotaxis. *J Biol Chem.* 1998. vol. 273 (26) pp. 15895-900

Amini, S., M. Saunders, *et al.* (2004). "Interplay between HIV-1 Vpr and Sp1 modulates p21(WAF1) gene expression in human astrocytes." *J Biol Chem* 279(44): 46046-56.

Andersen JL, Le Rouzic E, Planelles V. 2008. HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 85:2–10

Andersen JL, Dehart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Kim B, *et al.* 2006. HIV-1 Vpr-Induced Apoptosis Is Cell Cycle Dependent and Requires Bax but Not ANT. *PLoS Pathog* 2: e127.

Andersen JL, Planelles V. 2005. The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* 3:43–51

Arganaraz, E. R., M. Schindler, *et al.* Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *The Journal of biological chemistry*, v.278, n.36, p.33912-9. 2003.

Baltimore D. 1970. RNA- dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226, 1209-1211.

Belzile *et al.* HIV-1 Vpr Induces the K48-Linked Polyubiquitination and Proteasomal Degradation of Target Cellular Proteins To Activate ATR and Promote G2 Arrest. *Journal of Virology.* 2010. vol. 84 (7) pp. 3320-3330

Belzile JP, Duisit G, Rougeau N *et al.* 2007. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1- CUL4A(VPRBP) E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* 3:e85

Barraud *et al.* Advances in the structural understanding of Vif proteins. *Curr HIV Res* (2008) vol. 6 (2) pp. 91-9

Bernardi R, Pandolfi PP. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12):1006–1016

Billich A *et al.* 1995. Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J Virol* 69(4):2451–2461

Bioedit versão 7.0.9: *site:* <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> ; acessado em 05/12/2010

Bishop KN *et al.* 2008. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 4(12):e1000231

Bolton DL, Lenardo MJ. 2007. Vpr cytopathicity independent of G2/M cell cycle arrest in human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ T cells. *J Virol* 81:8878–8890

Bogerd HP *et al.* 2004. A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (11):3770–3774

Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T *et al.* 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 77:3939–3949

Bruns K, Fossen T, Wray V *et al.* 2003. Structural characterization of the HIV-1 Vpr N terminus: evidence of cis/trans-proline isomerism. *J Biol Chem* 278:43188–43201

Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. 1994. *AIDS* 8: 1123-1128.

Burdo *et al.* High-Affinity Interaction between HIV-1 Vpr and Specific Sequences That Span the C/EBP and Adjacent NF- κ B Sites within the HIV-1 LTR Correlate with HIV-1-Associated Dementia. *DNA and Cell Biology*. 2004. 23(4): 261-269.

Caly L, Saksena NK, Piller SC, Jans DA. 2008. Impaired nuclear import and viral incorporation of Vpr derived from a HIV long-term non-progressor. *Retrovirology* 5: 67.

Cann AJ. 2005. *Principles of Molecular Virology* 4th ed. Elsevier, Oxford, Inglaterra

Carl, S., T. C. Greenough, *et al.* Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *Journal of Virology*, v.75, n.8, p.3657-65. 2001.

Carter JB, Saunders VA. 2007. *Virology : principles and applications*. John Wiley & Sons Ltd, Cichester, Inglaterra

Chen, H., S. Q. Wei, *et al.* Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human immunodeficiency virus type I intasome. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.24, p.17358-64. 1999.

Chiu YL, Greene WC. 2008. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* 26:317–353

Chiu, Y.L., and Greene, W.C. 2009. APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 689–703.

Clapham, P.R., McKnight, A., 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 83, 1809–1829.

Cohen, E. A., G. Dehni, *et al.* 1990. "Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein." *J Virol* 64(6): 3097-9.

Coeytaux E, Coulaud D, Le Cam E *et al.* 2003. The cationic amphipathic alpha-helix of HIV-1 viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *J Biol Chem* 278:18110–18116

Connor, R. I., B. K. Chen, *et al.* 1995. "Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes." *Virology* 206(2): 935-44.

Conticello SG, Harris RS, Neuberger MS. 2003. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* 13(22):2009–2013

Conticello SG *et al.* 2005. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 22(2):367–377

Davis *et al.* MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research* 35:W375-W383. 2007

de Noronha C, Takaori-Kondo A, Mc Entee M, Greene W. 1993. The HIV- encoded protein Vpr associates with PP2A via the A subunit. *Mol Biol Cell* abstract nu 7355a.

de Noronha CM, Sherman MP, Lin HW *et al.* 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294:1105–1108

DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O *et al.* 2007. HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virol J* 4:57

DeHart JL, Planelles V. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 vpr links proteasomal degradation and checkpoint activation. *J Virol* 82:1066–1072

Dehart *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Induces Cell Cycle Delay via Recruitment of the Same E3 Ubiquitin Ligase Complex That Targets APOBEC3 Proteins for Degradation. *J Virol.* 2008. vol. 82 (18) pp. 9265-9272

Depienne C, Roques P, Creminon C *et al.* 2000. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp Cell Res* 260:387–395

Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. 2007. *Introduction to modern virology*. 6^a ed. Blackwell Publishing, Malden, EUA

Di Marzio P, Choe S, Ebright M *et al.* 1995. Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 69:7909–7916

Elder R.T., Yu M., Chen M., Zhu X., Yanagida M., Zhao Y. HIV-1 Vpr induces cell cycle G2 arrest in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) through a pathway involving regulatory and catalytic subunits of PP2A and acting on both Wee1 and Cdc25. 2001. *Virology*, 287 (2), pp. 359-370.

Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A.J., Heidmann, T., and Schwartz, O. 2005. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 433, 430–433.

Fackler OT, Luo W, Geyer M, Alberts AS, Peterlin BM. Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and down- stream effector functions. *Mol Cell* 1999, 3:729 – 739.

Felzien LK, Woffendin C, Hottiger MO *et al.* 1998. HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5281–5286

Feng, Y., C. C. Broder, *et al.* HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, v.272, n.5263, p.872-7. 1996.

Fletcher TM 3 rd, Brichacek B, Sharova N *et al.* 1996. Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). *EMBO J* 15:6155–6165

Flint, SJ, Enquist, LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. 2004. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. Ed. AMS Press, p-627.

Fouchier, R.A.M. 1995. Simple determination of Human Immunodeficiency Virus type 1 syncytium-inducing V3 genotype by PCR. *Journal of Microbiology*, vol 44, n°3, p-906-911.

Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH *et al.* 1998. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol* 72:6004–6013

Franke, EK, Yuan, HEH e Lubajan, J (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions, *Nature*, 372, 359-362.

Fritz JV, Didier P, Clamme JP *et al.* 2008. Direct Vpr-Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging. *Retrovirology* 5:87

Gallo RC. 2002. The early years of HIV/AIDS. *Science*, 298, 1728-1730.

- Gallo RC & Montagnier L. 2002. Prospects for the Future. *Science*, 298, 1730-1731.
- Gartner S, Markovits P, Markovitz DM *et al.* 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233:215–219
- Guyader M, Emerman M, Montagnier L, Peden K. 1989. VPX mutants of HIV-2 are infectious in established cell lines but display a severe defect in peripheral blood lymphocytes. *EMBO J* 8:1169–1175
- Godet *et al.* PP2A1 Binding, Cell Transducing and Apoptotic Properties of Vpr77–92: A New Functional Domain of HIV-1 Vpr Proteins. *PLoS ONE*. 2010. vol. 5 (11) pp. e13760
- Goh, W. C., M. E. Rogel, *et al.* 1998. "HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo." *Nat Med* 4(1): 65-71.
- Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM *et al.* 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* 4:65–71
- Goh WC, Manel N, Emerman M. 2004. The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology* 318:337–349
- Ghorpade A, Nukuna A, Che M *et al.* 1998. Human immunodeficiency virus neurotropism: an analysis of viral replication and cytopathicity for divergent strains in monocytes and microglia. *J Virol* 72:3340–3350
- Göttlinger HG. 2001. HIV-1 Gag: a Molecular Machine Driving Viral Particle Assembly and Release. pp. 2-28 in *HIV Sequence Compendium 2001*. Edited by: Kuiken C, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, Korber B. Published by: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, LA-UR 02-2877.
- Gorry PR, Churchill M, Crowe SM *et al.* 2005. Pathogenesis of macrophage tropic HIV-1. *Curr HIV Res* 3:53–60
- Groux, H., G. Torpier, *et al.* 1992. "Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals." *J Exp Med* 175(2): 331-40.
- Harrington, P. R., D. W. Haas, *et al.* 2005. "Compartmentalized human immunodeficiency virus type 1 present in cerebrospinal fluid is produced by short-lived cells." *J Virol* 79(13): 7959-66.
- Hassaine G *et al.* 2001. The tyrosine kinase Hck is an inhibitor of HIV-1 replication counteracted by the viral vif protein. *J Biol Chem* 276(20):16885–16893
- Hattori N, Michaels F, Fagnoli K *et al.* 1990. The human immunodeficiency virus type 2

vpr gene is essential for productive infection of human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8080–8084

He J, Choe S, Walker R *et al.* 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* 69:6705–6711

He Z *et al.* 2008. Characterization of conserved motifs in HIV-1 Vif required for APOBEC3G and APOBEC3F interaction. *J Mol Biol* 381(4):1000–1011

Henriksson P, Bosch V. Inhibition of cellular glycoprotein incorporation into human immunodeficiency virus-like particles by coexpression of additional cellular interaction partner. *Virology*. 1998. Nov 10;251(1):16-21.

Hermeking H, Benzinger A. 2006. 14–3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* 16:183–192

Hiebenthal-Millow *et al.* Alterations in HIV-1 LTR promoter activity during AIDS progression. *Virology*. 2003. vol. 317 (1) pp. 109-18

Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I: Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:6476-6480.

Holmes, R.K., Koning, F.A., Bishop, K.N., and Malim, M.H. 2007. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* 282, 2587–2595.

Hogan, P.G. *et al.* (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205–2232

Hrecka K, Gierszewska M, Srivastava S *et al.* 2007. Lentiviral Vpr usurps Cul4-DDB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11778–11783

Hrimech M, Yao XJ, Bachand F *et al.* (1999) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J Virol* 73:4101–4109
Iordanskiy, S., R. Berro, *et al.* .2006. "Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin." *Retrovirology* 3: 4.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2004. *Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença.* 6° ed., Artmed, São Paulo.

Jacquot G, Le Rouzic E, David A *et al.* 2007. Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology* 4:84

- Jenkins Y, McEntee M, Weis K, Greene WC. 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* 143:875–885
- Jenkins Y, Pornillos O, Rich RL *et al.* 2001. Biochemical analyses of the interactions between human immunodeficiency virus type 1 Vpr and p6(Gag). *J Virol* 75:10537–10542
- Jern, P., Stoye, J.P., and Coffin, J.M. 2007. Role of APOBEC3 in genetic diversity among endogenous murine leukemia viruses. *PLoS Genet.* 3, 2014– 2022.
- Jowett JB, Planelles V, Poon B *et al.* 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2+M phase of the cell cycle. *J Virol* 69:6304–6313
- Kamata M, Aida Y. 2000. Two putative alpha-helical domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediate nuclear localization by at least two mechanisms. *J Virol* 74:7179–7186
- Kamata M, Nitahara-Kasahara Y, Miyamoto Y *et al.* 2005. Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 79:3557–3564
- Kamata M, Watanabe N, Nagaoka Y, Chen IS. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr binds to the N lobe of the Wee1 kinase domain and enhances kinase activity for CDC2. *J Virol* 82:5672–5682
- Kedzierska K, Crowe SM. 2002. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem* 9:1893–1903
- Kino T, Gragerov A, Valentin A *et al.* 2005. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14–3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *J Virol* 79:2780–2787
- Kino T, Gragerov A, Slobodskaya O *et al.* 2002. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol* 76:9724–9734
- Kino T, Gragerov A, Kopp JB *et al.* 1999. The HIV-1 virion-associated protein vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor. *J Exp Med* 189:51–62
- Kirchhoff. Immune Evasion and Counteraction of Restriction Factors by HIV-1 and Other Primate Lentiviruses. *Cell Host & Microbe.* 2010. vol. 8 (1) pp. 55-67
- Kirchhoff, F., P. J. Easterbrook, *et al.* Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. *Journal of Virology*, v.73, n.7, p.5497-508. 1999.

- Kichler A, Pages JC, Leborgne C *et al.* 2000. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J Virol* 74:5424–5431
- Klarmann GJ, Chen X, North TW, Preston BD .2003. Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription. *J Biol Chem* 278:7902–7909
- Kobayashi M *et al.* 2005. Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem* 280(19):18573–18578
- Larder B, Richman D; Vella S. 2001. HIV Resistance and Implications for Therapy, 2nd ed., MediCom Inc., Atlanta.
- Jarmuz A *et al.* 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79(3):285–296
- Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C *et al.* 2002. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* 277:45091–45098
- Le Rouzic E, Benichou S. 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2:11
- Le Rouzic E, Belaidouni N, Estrabaud E *et al.* 2007. HIV1 Vpr Arrests the Cell Cycle by Recruiting DCAF1/VprBP, a Receptor of the Cul4-DDB1 Ubiquitin Ligase. *Cell Cycle* 6:182–188
- Levy, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological Reviews*, v.57, n.1, p.183-289. 1993.
- Levy, J.A. 1998. *HIV and the pathogenesis of AIDS*. Washington, DC. 588pp.
- Lodish, H.; Berk, A.; Maturaid, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L. & Darnell, J. 2005. *Molecular Cell Biology*. 6th ed. New York; WH Freeman and Company, 973 pp.
- Liu B *et al.* 2004. Influence of primate lentiviral Vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 virion packaging of APOBEC3G. *J Virol* 78(4):2072–2081
- Liu *et al.* Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. vol. 96 (8) pp. 4581-5
- Lu YL, Spearman P, Ratner L. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* 67:6542–6550

Lum JJ *et al.* Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2003. vol. 111 (10) pp. 1547-1554

Luo K *et al.* 2005. Primate lentiviral virion infectivity factors are substrate receptors that assemble with cullin 5–E3 ligase through a HCCH motif to suppress APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(32):11444–11449

Madani N *et al.* 2002. Implication of the lymphocyte-specific nuclear body protein Sp140 in an innate response to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 76(21):11133–11138

Mahalingam S, Ayyavoo V, Patel M *et al.* 1997. Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 71:6339–6347

Malim MH. 2009. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 364: 675–687.

Malim MH, Emerman M. HIV-1 accessory proteins ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*. 2008 ;3(6):388-98.

Mansky LM .1996. The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology* 222:391–400

Mansky LM, Temin HM .1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 69:5087–5094

Mangeat B *et al.* 2004. A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action. *J Biol Chem* 279(15):14481–14483

Margottin, F., S. P. Bour, *et al.* A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Molecular Cell*, v.1, n.4, p.565-74. 1998.

Mariani R *et al.* 2003. Species-Specific Exclusion of APOBEC3G from HIV-1 Virions by Vif. *Cell* 114(1):21–31

Marin M *et al.* 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9(11):1398–1403

Masuda *et al.* Genetic studies with the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* suggest involvement of wee1, ppa2, and rad24 in induction of cell cycle arrest by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol*. 2000. vol. 74 (6) pp. 2636-46

McGowan CH, Russell P. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16:629–633

Mehle A *et al.* 2004. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif- Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev* 18(23):2861–2866

Mehle A *et al.* 2006. A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J Biol Chem* 281(25):17259–17265

Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 2002, 296:1439 – 1443.

Moore JP, Doms RW. 2003. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *PNAS* 100(19), 10508-10602.

Montagnier L. 2002. A history of HIV discovery. *Science*, 298, 1727-1728.

Montagnier L, Chermann JC, Barré-Sinoussi F, Chamaret S, Gruest J, Nugeyre M, Rey F, Dauguet C, Axler-Blin C, Brun-Vezinet F, Rouzi-oux C, Saimot GA, Rozenbaum W, Gluckman JC, Klatzman D, Vilmer E, Griscelli C, Foyer-Gazengel C, Brunet JB: *A new human T-lympho- tropic retrovirus: Characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1984.

Morellet N., Bouaziz S., Petitjean P. and Roques B. P. NMR Structure of the HIV-1 Regulatory Protein VPR. *Journal of Molecular Biology*. 215-227. 2003

Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008.

Morgado MG, Guimarães ML, Neves Jr, *et al.*1998. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Brazil: Polymorphism of the Antigenically Distinct HIV-1 B Subtype Stains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (3), 383-386.

Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM.1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, **12**, 345-364.

Miller RJ, Cairns JS, Bridges S, Sarver N. 2000. Human Immunodeficiency Virus and AIDS: Insights from Animals Lentiviruses. *J Virol* 74(16), 7187-7195.

Milich L, Margolin B, Swanstrom R.1993. V3 Loop of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env Protein: Interpreting Sequence Variability. *J Virol* 67(9): 5623- 5634.

Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* 71:5382–

5390.

Miyagi E *et al.* 2007. Enzymatically active APOBEC3G is required for efficient inhibition of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 81(24):13346–13353

Muthumani K, Hwang DS, Desai BM *et al.* 2002. HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 277:37820–37831

Neil, S. J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425–430.

Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T *et al.* 2007. Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macro- phages. *J Virol* 81:5284–5293

Niewiadomska, A. M, Yu X. F. 2009. Host Restriction of HIV-1 by APOBEC3 and Viral Evasion Through Vif. *In: Spearman P, Freed E O. HIV Interactions with Host Cell Proteins, Nova Iorque, p.1-26.*

Ohagen, A. e D. Gabuzda. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *Journal of Virology*, v.74, n.23, p.11055-66. 2000.

Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T *et al.* 1989. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *J Virol* 63:4110–4114

Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. 1997. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 276:1857–1861

Pancio HA, Vander Heyden N, Ratner L. 2000. The C-terminal proline-rich tail of human immunodeficiency virus type 2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells. *J Virol* 74:6162–6167

Philippon, V., Z. Matsuda, *et al.* 1999. "Transactivation is a conserved function among primate lentivirus Vpr proteins but is not shared by Vpx." *J Hum Virol* 2(3): 167-74.

Planelles V, Benichou S. 2009. Vpr and Its Interactions with Cellular Proteins. *In: Spearman P, Freed E O. HIV Interactions with Host Cell Proteins, Nova Iorque, p.177-200.*

Pickart CM. 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116(2):181–190

Poon *et al.* Vpr is required for efficient Nef expression from unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA. *J Virol.* 2007. vol. 81 (19) pp. 10515-23

Poon and Chen. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr enhances expression from unintegrated HIV-1 DNA. *J Virol.* 2003. vol. 77 (7) pp. 3962-72

Poon B, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 vpr gene induces phenotypic effects similar to those of the DNA alkylating agent, nitrogen mustard. *J Virol* .1997. ;71:3961–3971. [PubMed: 9094673]

Poon *et al.* Cell Cycle Arrest by Vpr in HIV-1 Virions and Insensitivity to Antiretroviral Agents. *Science*. July. 1998 : 266-269.

Popov S, Rexach M, Ratner L *et al.* 1998. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 273:13347–13352

Powell, D. M., M. C. Amaral, *et al.* HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.94, n.3, p.973-8. 1997.

Pornillos, O., D. S. Higginson, *et al.* HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *The Journal of Cell Biology*, v.162, n.3, p.425-34. 2003.

Pulkkinen, K., G. H. Renkema, *et al.* Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts. *Journal of Virology*, v.78, n.23, Dec, p.12773-80. 2004.

Price, D. A., U. C. Meier, *et al.* The influence of antigenic variation on cytotoxic T lymphocyte responses in HIV-1 infection. *Journal Molecular Biology*, v.76, n.10, p.699-708. 1998.

Prusiner SR. 2002. Discovering the Cause of AIDS. *Science* 298, 1726-1727.

Re F, Braaten D, Franke EK, Luban J. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* 69:6859–6864

Refaeli Y, Levy DN, Weiner DB. 1995. The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 vpr gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3621–3625

Rodríguez *et al.* Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA*. 2006. vol. 296 (12) pp. 1498-506

Roshal M, Kim B, Zhu Y *et al.* 2003. Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. *J Biol Chem* 278:25879–25886

Russell RA, Pathak VK. Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol*. 2007. 81:8201–8210.17522216

Sabbah, E. N., S. Druillennec, *et al.* 2006. "Interaction between the HIV-1 protein Vpr and the adenine nucleotide translocator." *Chem Biol Drug Des* 67(2): 145-54.

Sawaya, B. E., K. Khalili, *et al.* 2000. "Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome." *J Biol Chem* 275(45): 35209-14.

Sambrook J., Fritsch E.E. and Maniatis T., 2001, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sakai, K., J. Dimas, *et al.* 2006. "The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9): 3369-74.

Schaeffer, E., R. Geleziunas, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *Journal of Virology*, v.75, n.6, p.2993-3000. 2001.

Schubert, U., L. A. V. Ferrer-Montie, *et al.* Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS letters*, v.398, n.1, p.12-8. 1996.

Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN. 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* 183:677–686

Schuler W, Wecker K, de Rocquigny H *et al.* 1999. NMR structure of the (52–96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J Mol Biol* 285:2105–2117

Schrofelbauer B *et al.* 2005. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J Virol* 79(17):10978–10987

Schrofelbauer B, Hakata Y, Landau NR. 2007. HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4130–4135

Schrofelbauer B, Chen D, Landau NR. 2004. A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (11):3927–3932

Schrofelbauer B *et al.* 2006. Mutational alteration of human immunodeficiency virus type 1 Vif allows for functional interaction with nonhuman primate APOBEC3G. *J Virol* 80(12):5984–5991

Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9(11):1404–1407

Sheehy AM *et al.* 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418(6898):646–650

Sherman MP, de Noronha CM, Heusch MI *et al.* 2001. Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 75:1522–1532

Sherman MP, de Noronha CM, Eckstein LA *et al.* 2003. Nuclear export of Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in tissue macrophages. *J Virol* 77:7582–7589

Sherman MP, de Noronha CM, Pearce D, Greene WC. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains two leucine-rich helices that mediate glucocorticoid receptor coactivation independently of its effects on G(2) cell cycle arrest. *J Virol* 74:8159–8165

Sherman MP, Schubert U, Williams SA *et al.* 2002. HIV-1 Vpr displays natural protein-transducing properties: implications for viral pathogenesis. *Virology* 302:95–105

Shirakawa K *et al.* 2008. Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol* 15(11):1184–1191

Soros, V.B., Yonemoto, W., and Greene, W.C. (2007). Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog.* 3, e15.

Somasundaran, M., M. Sharkey, *et al.* 2002. "Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9503-8. vol. 327 (1) pp. 215-227

Simon V, Zennou V, Murray D, *et al.* Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/ 3F and a potential role in HIV- 1 diversification. *PLoS Patho.* 2005. 1:e6.16201018

Stanley BJ *et al.* 2008. Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *J Virol* 82(17):8656–8663

Stewart SA *et al.* 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J Virol* 71(7):5579–5592

Stopak K *et al.* 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* 12(3):591–601

Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J (2004) The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys.

Nature 427 (6977):848–853

Srinivasan *et al.* A comprehensive analysis of the naturally occurring polymorphisms in HIV-1 Vpr: Potential impact on CTL epitopes. *Virology*. 2008. vol. 5 (1) pp. 99

Site Los Alamos; Sequence Locator :

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/LOCATE/locate.html> acessado em 26/11/2010

Site Los Alamos – Figura genôma HXB2

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html> acessado em 14/12/2009

Site Los Alamos – Consenso do Subtipo B

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/Consensus.html> acessado em 15/07/2010

Site SWISSPROT – SWISS MODEL workspace :

http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=workspace_modelling&userid=mi.kaellemos@gmail.com&token=TOKEN&key=49a315ecb1554eb36c5f0359461ca81d&prjid=P000001, acessado em 15/04/2011

Site Los Alamos – Gene cutter

http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GENE_CUTTER/cutter.html , acessado em 03/02/2011

Site PDB: Calculate Structure Alignment: <http://www.pdbx.org/jfatcatserver/>, acessado em 25/01/2011

Site PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Site jmol: <http://jmol.sourceforge.net/>, acessado em 30/02/2011

Tan L, Ehrlich E, Yu XF. 2007. DDB1 and Cul4A are required for human immunodeficiency virus type 1 Vpr-induced G2 arrest. *J Virol* 81:10822–10830

Takadori-Kondo A, de Noronha C, Mc Entee M, Greene W .1996. Identification of a molecular mechanism for HIV-1 Vpr-induced G2 cell cycle arrest. *Int Conf AIDS* 11: 22 (abstract no LB.A.6004).

Temin HM, Mizutani S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.

Tian C *et al.* 2006. Differential requirement for conserved tryptophans in human immunodeficiency virus type 1 Vif for the selective suppression of APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* 80(6):3112–3115

Tungaturthi PK, Sawaya BE, Singh SP *et al.* 2003. Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr. *Biomed Pharmacother* 57:20–24

UNAIDS. 2009. *Global Report: December 2009*

Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J.C.. 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3, 1–8.

van Regenmortel MHV, *et al.* 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego; Academic Press, p-1162.

Varin *et al.* Synthetic Vpr protein activates activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and NF-kappaB and stimulates HIV-1 transcription in promonocytic cells and primary macrophages. *J Biol Chem.* 2005. vol. 280 (52) pp. 42557-67

Varthakavi V, Smith RM, Bour SP, Strebel K, Spearman P. 2003. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15154–15159

V. Zennou, C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, P. Charneau, HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap, *Cell* 101 (2000) 173–185.

Vodicka MA, Koepp DM, Silver PA, Emerman M. 1998. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 12:175–185

Votteler J and Schubert U. 2008. *Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology In: Mahy BJW, van Regenmortel MHV. Desk Encyclopedia of General Virology. Academic Press, San Diego, EUA.* p. 474-481.

Wang L, Mukherjee S, Narayan O, Zhao LJ. 1996. Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 178:7–13

Wang J *et al.* 2007. The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells. *Virology* 359(2):243–252

Wecker *et al.* NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H₂O/trifluoroethanol. Comparison with the Vpr N-terminal (1-51) and C-terminal (52-96) domains. *Eur J Biochem.* 2002. vol. 269 (15) pp. 3779-3788

Wen X, Duus KM, Friedrich TD, de Noronha CM. 2007. The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor. *J Biol Chem* 282:27046–27057

- Weiss RA: How does HIV causes AIDS? Science 260:1273. 1993
- Wigg MD. 2002. Vírus da imunodeficiência humana. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.183-197.
- Willard L. *et al* "VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality" Nucleic Acids Res. 2003 ; 31 (13): 3316-3319
- Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. J Virol 66:226–234
- Wong-Staal F, Chanda PK, Ghayeb J. 1987. Human immunodeficiency virus: the eighth gene. AIDS Res Hum Retroviruses 3:33–39
- Wu. The co-receptor signaling model of HIV-1 pathogenesis in peripheral CD4 T cells. Retrovirology. 2009. vol. 6 (1) pp. 41
- Xiao Z, Xiong Y, Zhang W, *et al*. Characterization of a novel Cullin5 binding domain in HIV-1 Vif. J Mol Biol 2007. 373:541–550.17869271
- Xiao Z, Ehrlich E, Luo K, Xiong Y, Yu XF. Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G. FASEB J 2007. 21:217–222.17135358
- Xu H *et al*. 2004. A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. Proc Natl Acad Sci USA 101(15):5652–5657
- Yang, Z. *et al*. 2001. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. Nature 414, 317–322
- Yang X, Goncalves J, Gabuzda D . 1996. Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. J Biol Chem 271(17):10121–10129
- Yang B *et al*. 2007. Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/aprimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. J Biol Chem 282(16):11667–11675
- Yang X, Gabuzda D. 1998. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. J Biol Chem 273(45):29879–29887
- Yedavalli, V. S., H. M. Shih, *et al*. 2005. "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1." J Virol 79(21): 13735-46.
- Yuan H, Xie YM, Chen IS. 2003. Depletion of Wee-1 kinase is necessary for both human

immunodeficiency virus type 1 Vpr- and gamma irradiation-induced apoptosis. *J Virol* 77:2063–2070

Yuan H, Kamata M, Xie YM, Chen IS. 2004. Increased levels of Wee-1 kinase in G(2) are necessary for Vpr- and gamma irradiation-induced G(2) arrest. *J Virol* 78:8183–8190

Yu X *et al.* 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5- SCF complex. *Science* 302(5647):1056–1060

Yu Y *et al.* 2004b. Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes*

Yu Q *et al.* 2004a. APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem* 279(51):53379–53386

Yu XF, Yu QC, Essex M, Lee TH. 1991. The vpx gene of simian immunodeficiency virus facilitates efficient viral replication in fresh lymphocytes and macrophage. *J Virol.* 65:5088–5091

Zander K, Sherman MP, Tessmer U, *et al.*: Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *J Biol Chem* 2003;278:43202–43213.

Zimmerman ES, Sherman MP, Blackett JL *et al.* 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces DNA replication stress in vitro and in vivo. *J Virol* 80:10407–10418 *Dev* 18(23):2867–2872

Zhang W *et al.* 2008. Distinct determinants in HIV-1 Vif and human APOBEC3 proteins are required for the suppression of diverse host anti-viral proteins. *PLoS ONE* 3(12):e3963

Zhang, S., Feng, Y., Narayan, O., Zhao, L.J., 2001. Cytoplasmic retention of HIV-1 regulatory protein Vpr by protein-protein interaction with a novel human cytoplasmic protein VprBP. *Gene* 263, 131–140.

Zhao LJ, Mukherjee S, Narayan O. 1994. Biochemical mechanism of HIV-I Vpr function. Specific interaction with a cellular protein. *J Biol Chem* 269:15577–15582

Zhu Y, Gelbard HA, Roshal M *et al.* 2001. Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 vpr genes. *J Virol* 75:3791–3801

7. Anexo

7.1. Sequências vif - Estágio Inicial

> Paciente E2 - clone E2.1F

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> Paciente E2 - clone E2.2F

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAAGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> Paciente E2 - clone E2.4F

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAGCATGGAAGAGTTTAGTAAAACA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCATACAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAGAACAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTACATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGGCTAGCAGACCAACTAAT
TCATACATATTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCCATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAGCAGGACATAGCAAGGTAGGATCCCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAGTAACACCAAAAAAGACAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TTCAATGAATGGACACTAG

> Paciente E2 - clone E2.7F2

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTCTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTGATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGACTATTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTCACTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAACAACCAAAAAAGGAGAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGACACTAG

> Paciente E3 - clone E3.4F

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> Paciente E5 - clone E5.1F

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACCTGGAAGAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATATCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTCTCATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCACTAGGGGAAGGTGAATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT

TTGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGAAAAAGGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTAACTTAGCAGACCATCTAAT
CCATCTGTATTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCGGCTATAAGAAAAGCCATAGTAGGACGTTTAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTGATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTTCGAAAAGTACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGTTGAATGGACACTAG

> **Paciente E5 – clone E5.2F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAATACCTGGAAGAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATATCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTCCTCATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGAAGGTGAATTGGTAATAATAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGAAAAAGGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTAACTTAGCAGACCATCTAAT
CCATCTGTATTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCGGCTATAAGAAAAGCCATAGTAGGACGTTTAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTGATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTTCGAAAAGTACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGTTGAATGGACACTAG

> **Paciente E5 – clone E5.7F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAATACCTGGAAGAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATATCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTCCTCATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGAAGGTGAATTGGTAATAATAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGAAAAAGGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTAACTTAGCAGACCATCTAAT
CCATCTGTATTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCGGCTATAAGAAAAGCCATAGTAGGACGTTTAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTGATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTTCGAAAAGTACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGTTGAATGGACACTAG

> **Paciente E5 – clone E5.8F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAATACCTGGAAGAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATATCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTCCTCATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGAAGGTGAATTGGTAATAATAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGAAAAAGGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTAACTTAGCAGACCATCTAAT
CCATCTGTATTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCGGCTATAAGAAAAGCCATAGTAGGACGTTTAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTGATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTTCGAAAAGTACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGTTGAATGGACACTAG

> **Paciente E5 – clone E5.9F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAATACCTGGAAGAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATATCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTCCTCATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGAAGGTGAATTGGTAATAATAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGAAAAAGGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTAACTTAGCAGACCATCTAAT
CCATCTGTATTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCGGCTATAAGAAAAGCCATAGTAGGACGTTTAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTGATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTTCGAAAAGTACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGTTGAATGGACACTAG

> **Paciente E6 – clone E6.1F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAAGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGAAAAAGGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCCTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAAAGTACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente E6 – clone E6.6F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAAGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT

TTGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente E6 – clone E6.8F**

ATGGAATAAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAACA
CCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente E7 – clone E7.2F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAGAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCGTCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGAAATGGCAT
CTGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E7 – clone E7.3F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAGAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCGTCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGAAATGGCAT
CTGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E7 – clone E7.4F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAGAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCGTCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGAAATGGCAT
CTGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E7 – clone E7.5F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAGAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCGTCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGAAATGGCAT
CTGGTTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E7 – clone E7.9R**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAGAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCGTCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGAAATGGCAT

CTGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACGATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E8 - clone E8.1F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAATGGCAT
CTGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E8 - clone E8.2F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGAGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAATGGCAT
CTGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGATCCCACTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E8 - clone E8.4F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAATGGCAT
CTGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E8 - clone E8.5F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAATGGCAT
CTGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTAG

> **Paciente E8 - clone E8.6F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAATGGCAT
CTGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCAAGACCAAGGGTTCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGAGGACACTAG

> **Paciente E8 - clone E8.7F**

ATGGAACACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGAGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAATGGCAT

CTGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACTAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAAGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAA
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAAGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTG

> **Paciente E8 - clone E8.9F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTGACAGGATGAGGATTAGAACCTAGAAAAGTTTAGTAAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTACGAGATGCAAGATTAGTAATAACAACATATTGAGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAATGGCAT
CTAAGTCAAGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAAGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAA
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAAGATAGATAGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAAGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTG

> **Paciente E9 - clone E9.1F**

ATGGAAAACAGATGGTAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGCACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTATTTGATTGTTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTTGGATCTCTACAATACTTGGCCTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGACACTG

> **Paciente E9 - clone E9.2F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACGCATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTATTTGATTGTTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTTAGATCTCTACAATACTTGGCCTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGACACTG

> **Paciente E9 - clone E9.3F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAGAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTATTTGATTGTTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTTAGATCTCTACAATACTTGGCCTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGACACTG

> **Paciente E9 - clone E9.5F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGGCTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCACTAAT
TCATCTGTACTATTTGATTGTTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTTAGATCTCTACAATACTTGGCCTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGACACTG

> **Paciente E9 - clone E9.6F**

ATGGAAAACAAATGGCAGGTAATAATTGTGTGGCAAGTAGACAGAATGAGAATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATAGGTTTATAAACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT

TTGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACGCAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTGATTGTTTTTCAAGAACTGCTATAAGAAACGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATTTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTCAACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente E9 – clone E9.7F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATCAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGGAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAGAGAGCTACAGCGACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTGATTGTTTCTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTCAACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente E9 – clone E9.8F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACGTGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCAGCATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTGATTGTTTTTCAAGAACTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAAAGTTAGTCCTAGTTGTA
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTCAACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACACCG

> **Paciente E9 – clone E9.9F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTGATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTGATTGTTTTTCAAGAACTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAACACCAAGAAGGAGAAA
CCACCTTTGCCTAGTGTCAACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACACTAG

7.2. Sequências vif – Estágio Tardio

> **Paciente L2 – clone L2.1R**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAGCATGGAAGAGTTTAGTAAAACA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCATACAGACATCACTATGAAAGCACTAATCCGAGAACAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTACATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAAGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGAGATATAACACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATACATATTACTTTGATTGTTTTTCAAGAACTGCCATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCACGAGGACATAGCAAGGTAGGATCCCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAGTAACACCAAAAAGGACAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACGAAACTGACAGAGGATAGATGGAACGAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAAACCA
TTCAATGAATGGACACTAG

> **Paciente L2 – clone L2.3F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAAATGGCAT
CTGGGTCAAGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGAGATATAACACACAAAAGTAGACCCCACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAAGAACTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGGACAAG
CCGCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTAG

> **Paciente L2 – clone L2.6F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAGCATGGAAGAGTTTAGTAAAACA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTCATACAGACATCACTATGAAAGCACTAATCCAAGAACAAGTTCAG
AAGTACACATCCCATTAGGGGATGCTACATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGAGATATAGCACACAAATAGACCCTGGCTAGCAGACCAACTAAT
TCATACATATACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCCATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCACGCAGGACATAGTAAGGTAGGATCCCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAGTAACACCAAAAAGACAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACGAAACTGACAGAGGATAGATGGAACGAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAACCA
TTCAATGGATGGACACTAG

> **Paciente L2 – clone L2.8F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGCTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente L2 – clone L2.9F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGACTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
CATCTGTACTATTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGCACTAG

> **Paciente L8 – clone L8.1F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAGAATTTAGTGAACA
CCATATGTATGTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAAATGGCAT
CTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAAGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTAG

> **Paciente L8 – clone L8.2F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAGAATTTAGTAAAACA
CCATATGTATGTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACGGGAGAAAAGAGAAATGGCAT
CTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGACAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente L8 – clone L8.4F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAAGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAAGAGAAATGGCAT
CTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGSAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCACTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGACAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente L8 – clone L8.5F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGCCGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAGAATTTAGTAAAACA

CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGGATGGTTCTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGAAATGGCAT
CTGGGTCAAGGAGTCTCCATAGAAATGGAGGAAAAGGAGATATAACACACAAATAGACCCCACTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCCATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGCAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACAATAG

> **Paciente L8 – clone L8.6F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAAGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAAGGAGTCTCCATAGAAATGGAGGAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente L8 – clone L8.8F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGCTGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAGAACCTGGAAAAGTTTAGTAAAACA
CCATATGTATGTTTCAAAGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGCCCTCATCCAAGAATAAGTTCAG
GAGTACACATCCCCTAGGAGATGCAAGATTGGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
CTGGGTCAAGGAGTCTCCATAGAAATGGAGGAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTACTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACACTAG

> **Paciente L8 – clone L8.9F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAAGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGGATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAAGGAGTCTCCATAGAAATGGAGGAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACGTATAGGTAGACCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTTTACAGTACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGACAAAG
CCGCCTTTGCCTAGTGTACAAAGCTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAGTGGACAATAG

> **Paciente L9 – clone L9.1F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTTATAGACATCACTACCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGAACACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAAGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGATACAGCACACAAGTAGACCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATCAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.2F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGCAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAGGACTGGCAT
TTGGGCCAAGGAGTCTCCGTAGAATGGAGGAAAAGAGATACAGCACACAAGTAGACCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATCAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.3F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA

CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAAATGGGGAAAGAGAGATACAGTACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.4F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGAGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACACAAATAGACCCTGGCTTAGCAGACCGACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.5F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTAAATAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCCAAATTGATAATGACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCGGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.6F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTACCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGAACACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTGGCCTAGCAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.7F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAAATGGAGGAAAGAGAGCTACAGCACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCCTATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.8F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA
CCATATGCATATTTCAAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTAATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTACTATTTTATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTGGCCTAACAGCATTAAATAACACCAAAAAGGAGAAAG
CCACCTTTCCTAGTGTACAACACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
ACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L9 – clone L9.9F**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGTTTAGTAAAATA

CCATATGCATATTTCAAGAAAGCTAAGAAATGGGTTTATAGACATCACTATCAAAGTACTGATCCAAGAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTGATAATAACAACATATTTGGGGTCTGCACACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGCCAGGGAGTCTCCGTAGAAATGGAGGAAAGAGAGATACAGCACACAAGTAGACCCTGGCTTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGTAATTTTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATATTAGGACATAGAGTTAGTCCTAGTTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAACACCAAGAAGGAGAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTACAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
CACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L10 – clone L10.3R2**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTATTAATCCAAAAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L10 – clone L10.8R**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAG
GAAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCA
TTTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAA
TTCATCTGCACTATTTTATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
GAATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
GCCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCC
ATACAATGAATGGACTAG

> **Paciente L10 – clone L10.9R**

ATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACA
CCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAG
AAGTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAAT
TCATCTGCACTATTTTATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTG
AATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTAGGAAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCA
TACAATGAATGGACTAG

7.3. Sequências vpr – Estágio Inicial

> **Paciente E2 – clone E2.1R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAAACTTACGGGGATACTT
GGCAGGAGTGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTAGAAATTTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCGTTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E2 – clone E2.2R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAAACTTACGGGGATACTT
GGCAGGAGTGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTAGAAATTTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCGTTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E2 – clone E2.4R**

ATGGAACAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAAACCATTCAATGAATGGACTAGAGCTCTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAAGCTGTTAGACTTTTCTAGGGTCTGGCTCCATGGCTTAGGGCAACATATTTATGAAACTTATGGGGATACTT
GGGAAGGAGCGCAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTAGAAATTTGGGTGCCAACATAGCAGG
ATAGGTACTCTCGACAGAGGAGAAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAA

> **Paciente E2 – clone E2.7R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACTAGAGCATTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAAACTTGTGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGCTAGATCCTAG

> **Paciente E3 – clone E3.4R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAAACTTACGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCCTTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E5 – clone E5.1R**

ATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGTTGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAAAGAAAT
GAAGCTGTTAGACACTTTTCTAGGATTTGGCTCCATGGATTAGGACAATATATCTATGAAACTTATGGGGATACTTGGGCAGGA
GTGGAAGCCCTAATAAGTATGCTGCAACAACCTGCTGTTTATTTCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGAATAGGCATTACC
CCACGGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E5 – clone E5.2F**

ATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGTTGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAAGCTGTTAGACTTTTCTAGGATTTGGCTCCATGGATTAGGACAATATATCTATGAAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCCTAATAAGTATGCTGCAACAACCTGCTGTTTATTTCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACCCACGGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E5 – clone E5.7R**

ATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGTTGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAAGCTGTTAGACTTTTCTAGGATTTGGCTCCATGGATTAGGACAATATATCTATGAAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCCTAATAAGTATGCTGCAACAACCTGCTGTTTATTTCATTTTCAGAATTGGGTATCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACCCACGGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E5 – clone E5.8R**

ATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGTTGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAAGCTGTTAGACTTTTCTAGGATTTGGCTCCATGGATTAGGACAATATATCTATGAAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCCTAATAAGTATGCTGCAACAACCTGCTGTTTATTTCATTTTCAGAATTGGGTATCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACCCACGGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E5 – clone E5.9R**

ATGGAACAAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGTTGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAAGCTGTTAGACTTTTCTAGGATTTGGCTCCATGGATTAGGACAATATATCTATGAAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCCTAATAAGTATGCTGCAACAACCTGCTGTTTATTTCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACCCACGGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E6 – clone E6.1R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAAACTTACGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCCTTACTCGACAGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E6 – clone E6.2R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAAACTTACGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCCTTACTCGACAGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E6 – clone E6.6R2**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAAACTTACGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCCTTACTCGACAGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E6 – clone E6.8R2**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTATAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATACTTAGGACAACATATCTATGAACTTACGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCCAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCGTTACTCCACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E7 – clone E7.2R**

ATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGATGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGAGGATACTT
AGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTAAAGTGTCAACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAAGAGAACAAGAAATAGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E7 – clone E7.3R**

ATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGATGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGAGGATACTT
AGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTAAAGTGTCAACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAAGAGAACAAGAAATAGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E7 – clone E7.4R**

ATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGATGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGAGGATACTT
AGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTAAAGTGTCAACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAAGAGAACAAGAAATAGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E7 – clone E7.5F**

ATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGATGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGAGGATACTT
AGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTAAAGTGTCAACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAAGAGAACAAGAAATAGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E7 – clone E7.9R**

ATGGAACAAGCCCTAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACGATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGATGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGAGGATACTT
AGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTAAAGTGTCAACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAAGAGAACAAGAAATAGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E8 – clone E8.1R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGGTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATCTCAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E8 – clone E8.2R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAAGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAGTCTGTTAGGCATTTCCCTAAGGTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTAGGTGCCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E8 – clone E8.4R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGGCTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E8 – clone E8.5R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGGTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCCAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E8 – clone E8.6R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAAGACCAAGGGTCACAGAGGGAGCCATACAATGAGAGGACACTAGAACTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGGTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTCCAGACTTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E8 – clone E8.7R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAAGACCAAGGGCCACAGAAGGAGCCATACAATGAGTGGACACTTGAACCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAAGGTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTCCAGAAATTAGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E8 – clone E8.9R**

ATAGAACAAGCCCCAGAAAGACCAAGGGCCACAGAAGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACTTTTAGAAGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTCCCTAGGATGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGAGGATACTT
AGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTCCAGAAATTAGGTGTCACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAAGAGAACAAGAAATAGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 – clone E9.1F**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTCCGAAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 – clone E9.2R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTCCAGAAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 – clone E9.3R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGATCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACGGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTCCAGAAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 – clone E9.5R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCACGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTCCAGAAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 – clone E9.6R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGGAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTCCGAAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGAAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 – clone E9.7R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGGAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTCCAGAAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 – clone E9.8R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACCAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGGAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTCCAGAAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente E9 - clone E9.9R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAAGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

7.4. Sequências vpr - Estágio tardio

> **Paciente L2 - clone L2.1R**

ATGGAACGAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAAACCATTCAATGAATGGACACTAGAGCTCTTAGAGGAGCTTAA
AAATGAAGCTGTTAGACACTTTTCTAGGGTCTGGCTCCATGGCTTAGGGCAACATATTTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGAAGGAGTGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAAGATTGGGTGCCAACATAGCAGG
ATAGGTATCACTCGACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAA

> **Paciente L2 - clone L2.3R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACCTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTTCTAGGGTGTGGCTCCATGGCTTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAAGATTGGGCGTGCACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L2 - clone L2.6R**

ATGGAACGAGCCCCGGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAAACCATTCAATGGATGGACACTAGAGCTCTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAAGCTGTTAGACACTTTTCTAGGGTCTGGCTCCATGGCTTAGGGCAACATATTTATGAACTTATGGGGATACTT
GGGAAGGAGTGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAAGATTGGGTGCCAACATAGCAGG
ATAGGTATCACTCGACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAA

> **Paciente L2 - clone L2.8R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCAAGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L2 - clone L2.9R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGGCACTAGAGCTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGCCATGGCTTCATGGCTTAGGACTACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGGGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAAGATTGGGTGTCACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L8 - clone L8.1R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTTAGGCATTTTCTAGGGTGTGGCTCCAAGGCTTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L8 - clone L8.2R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAAGGAGCCATACAATGAGTGGACACTAGAACTTTTATAGAGGAGCTTAA
GAATGAGTCTGTTAGGCATTTTCTAAGGTGTGGCTCCATGGCTTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAAGATTAGGTGCCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L8 - clone L8.4R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTATAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAACTTACGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAAGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCGACAGAGGAGAGCAAGAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L8 – clone L8.5R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACAATAGAACTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTAGGCAATTTCCCTAGGGTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L8 – clone L8.6R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAACTTACGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L8 – clone L8.8R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACTAGAACTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAGTCCGTAGGCAATTTCCCTAGGGTGTGGCTCCATGGCTAGGGCAATATATCTATGAACTTATGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAAACAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L8 – clone L8.9R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAGTGGACAATAGAACTTTTAGAGGAGCTTAA
GAATGAATCTGTAGGCAATTTCCCTAAGGTGTGGCTCCATGGCTAAGGCAATATATCTATGAACTTATAAGGATACTT
AGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATTCATTTTCAGAATTAGGTGTCGACATAGCAA
ATAGGCATTACTCCACAGAGGAGAAACAAGAAATAGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.1R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATCTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.2R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGGCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTAGACATTTTCCAGACCATGGCTCCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.3R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.4R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTAGACATTTTCTAGACCATGGTTTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAGCAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.5R**

ATGGAGCAAACCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATTTTCAGGATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.6R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTAGACATTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATCCATCTCAGAATTGGGTGTCGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACGAGGAGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.7R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACACTTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACACTGCTGTTTACCCATTTCAGAATTGGGTGTCAACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAA

> **Paciente L9 – clone L9.8R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACACTGCTGTTTATCCATTTTCCAGATTGGGTGTGACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAAAGGAGAGCAAGGAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAG

> **Paciente L9 – clone L9.9R**

ATGGAACAAGCCCCAGAGGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCACACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAGCTTAA
GAGAGAAGCTGTTAGACATTTCTAGACCATGGCTTCATGGCTTAGGACAACATATCTATGAACTTATGGAGATACTT
GGACAGGAGTGGAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACACTGCTGTTTATCCATTTTCCAGATTGGGTGTCAACATAGCAGA
ATAGGCATTGTTTCGACAGAGGAGCAAGAAGAGATGGAGCCGGTAGATCCTAA

> **Paciente L10 – clone L10.3R2**

ATGGAACAAGCCCCAGAAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAACTTACGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACACTGCTGTTTATCCATTTTCCAGATTGGGTGTGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L10 – clone L10.8R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAACTTACGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACACTGCTGTTTATCCATTTTCCAGATTGGGTGTGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

> **Paciente L10 – clone L10.9R**

ATGGAACAAGCCCCAGAAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAA
GAGTGAAGCTGTTAGACATTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATGAACTTACGGGGATACTT
GGCAGGAGTGGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACACTGCTGTTTATCCATTTTCCAGATTGGGTGTGACATAGCAGA
ATAGGCATTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAG

7.5. Outros alinhamentos de Vif e Vpr

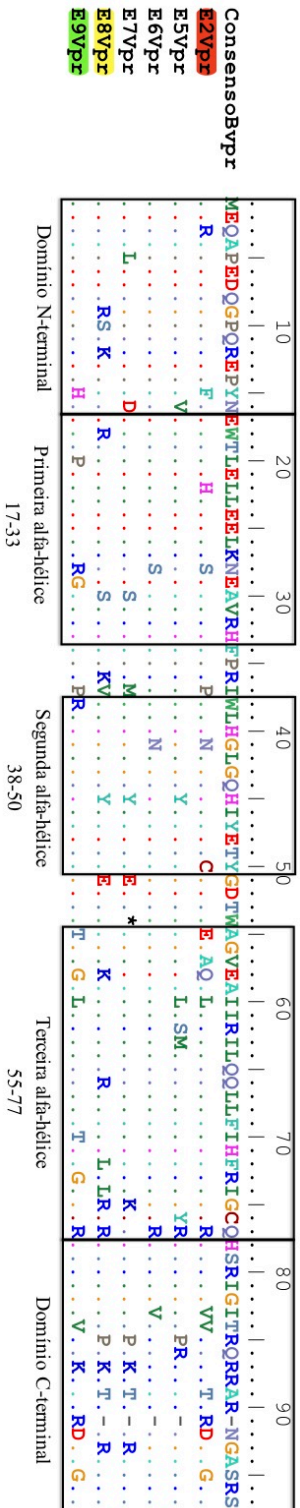


Figura 7.1. Alinhamento das sequências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vpr no estágio inicial da infecção, para cada paciente, independente da frequência em que aparecem dentro os alelos, com a sequência de referência de consenso do subtipo B do HIV-1.

Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos, as alterações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vpr encontram-se delimitados por meio de retângulos pretos (Morellet et al., 2003).

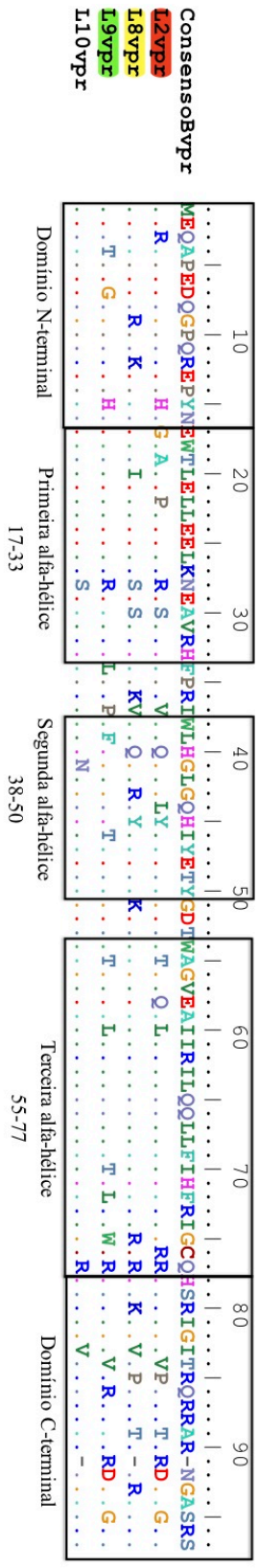


Figura 7.2. Alinhamento das sequências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vpr no estágio tardio da infecção, para cada paciente, independente da frequência em que aparecem dentro os alelos , com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1.

Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos, as alterações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vpr encontram-se delimitados por meio de retângulos pretos (Morellet et al., 2003).

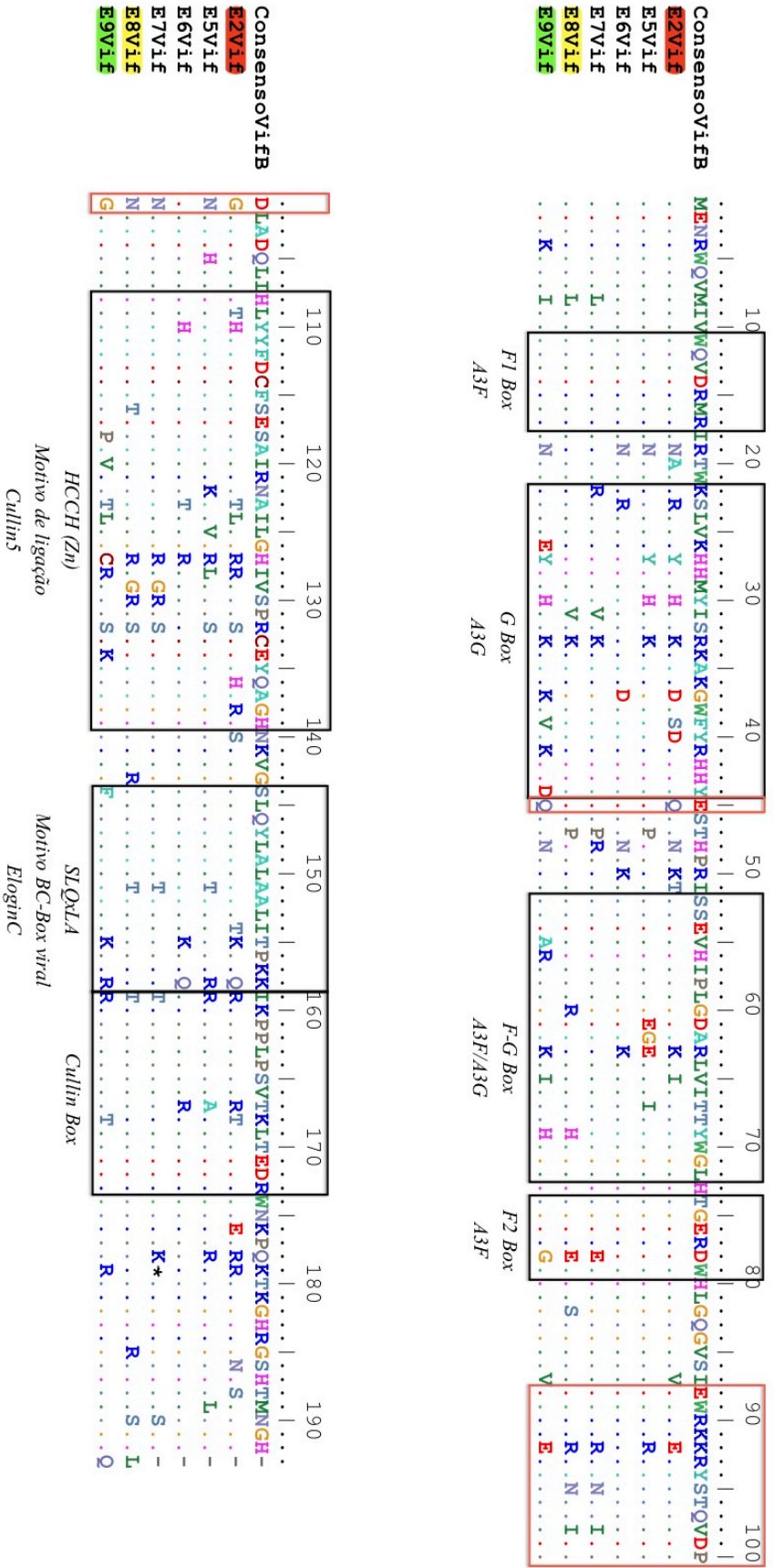


Figura 7.3. Alinhamento das sequências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vif no estágio inicial da infecção, para cada paciente, independente da frequência em que aparecem dentre os alelos, com a sequência de referência consenso do subtipo B do HIV-1. Os pontos indicam similaridade na sequência de aminoácidos, as alterações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vif encontram-se delimitados por meio de retângulos pretos e os vermelhas delimitam resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Niewiadomska et al., 2009).

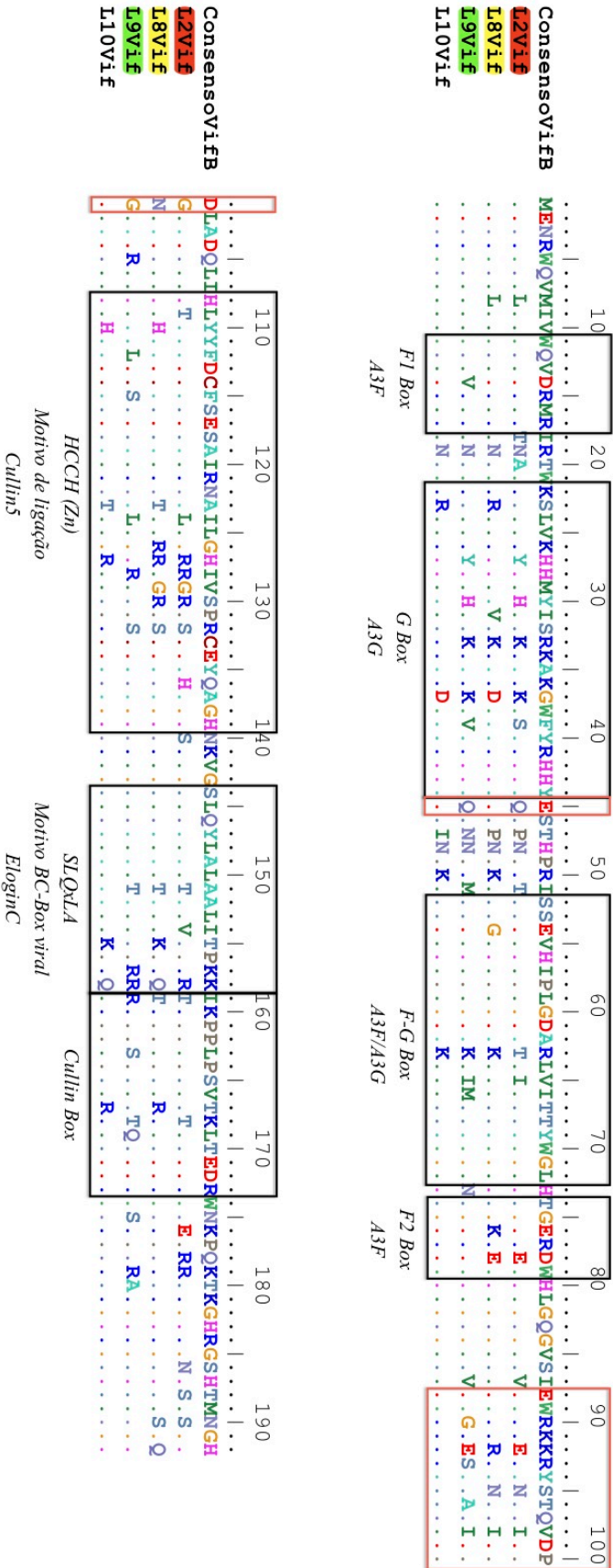


Figura 7.4. Alinhamento das seqüências contendo todas as alterações presentes nos alelos de vif no estágio tardio da infecção, para cada paciente, independente da frequência em que aparecem dentre os alelos, com a seqüência de referência consenso do subtipo B do HIV-1. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos, as alterações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido, as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço e os códons de parada são indicados por um asterisco. Os domínios de Vif encontram-se delimitados por meio de retângulos pretos e os vermelhas delimitam resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com APOBEC (Niewiadomska et al., 2009).

7.6. Lista de Siglas e Abreviaturas

APOBEC - lipoproteína APO "B"
ARV - AIDS - *Associated Retrovirus*
AZT- zidovidina
CA - capsídeo
CCR5 - co-receptor
CDC - "*Centers for Disease Control and Prevention*"
CD4 - proteína de superfície celular
CPH-1 - Complexo Principal de Histocompatibilidade
CRFs - *Circulant Recombinat Forms*
CXCR4 - co-receptor
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTP - deoxinucleotídeo trifosfato
gp120 - glicoproteína 120
M - metionina
μL - microlitros
μM – micromolar
ml – mililitros
NL4.3 - cepa tipo "B" selvagem
nm – nanômetro
O - *outlier*
pb - pares de base
PBMC - células mononucleares de sangue periférico
PIC - *Pre-Integration Complex*
PR - protease
RBD - *RNA Binding Domain*
RER - retículo endoplasmático rugoso
RNA - ácido ribonucléico
RNA-BP - *RNA Binding Protein*
HAART - *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*
HTLV - *Human T-Lymphotropic Virus*
ICTV - "*International Committee on Taxonomy of Viruses*"
IN - integrase
IFN- γ - interferon-γ
Kb - kilobases
kDa - kilodalton
LAV- *LymphadenopathyAssociatedVirus*
LTc - Linfócito T Citotóxico
LTRs - *Long Terminal Repeat Sequences*
RRE - *Rev Responsive Element*
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HIV-2 - Vírus da Imunodeficiência Humanatipo2
TM- proteína transmembrana

