

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA



Janaína Bacellar Acioli Lins

**DIVERSIDADE GENOTÍPICA DO HIV-1 EM MÃES HIV⁺/AIDS E EM
CRIANÇAS/ADOLESCENTES HIV⁺/AIDS DE GOIÂNIA-GO**

Orientadora:
Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Dissertação de Mestrado

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAM DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRIPICAL



Janaína Bacellar Acioli Lins

DIVERSIDADE GENOTÍPICA DO HIV-1 EM MÃES HIV⁺/AIDS E EM
CRIANÇAS/ADOLESCENTES HIV⁺/AIDS DE GOIÂNIA-GO

Orientadora:
Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Dissertação submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre na área de concentração de Imunologia.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do CNPq, processo nº 400183/1999-4.

I - INTRODUÇÃO

Aspectos Históricos

O vírus da imunodeficiência humana – HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) – agente etiológico da aids, ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA, foi primeiramente descrito em 1983. O trabalho do grupo francês liderado por Luc Montaigner relatou o isolamento e a identificação de um novo retrovírus em pacientes com aids, pertencente à família dos vírus com tropismo para linfócitos T humanos (HTLV - vírus da leucemia de células T humanas), diferente dos já identificados HTLV-I e HTLV-II (Barré-Sinoussi et al. 1983). Logo em seguida, em 1984, o grupo do norte-americano Robert Gallo relatou a detecção freqüente de um novo retrovírus, HTLV-III, em pacientes com aids, relacionando o patógeno a doença. O grupo de Gallo descreveu as características morfológicas, biológicas e antigênicas do novo patógeno, apontando a infecção preferencial da subpopulação de linfócitos T auxiliares pelo agente (Schüpbach et al. 1984).

Aspectos Clínicos

A infecção pelo HIV apresenta uma fase inicial aguda, também chamada síndrome da infecção retroviral aguda ou infecção primária, geralmente assintomática e com maciça produção viral. Em alguns casos, pode ser acompanhada de uma síndrome viral inespecífica, a qual é autolimitada, se resolvendo, em média, em 14 dias. Em seguida, o indivíduo entra numa fase de latência clínica, que dura em média 10 anos, representada por

progressiva queda no número de linfócitos T CD4⁺ e mantida replicação viral, principalmente nos órgãos linfóides periféricos. A doença evolui então para a fase sintomática, aids, caracterizada por imunodeficiência severa e infecções oportunistas variadas, as quais acabam finalmente provocando a morte do paciente (Pantaleo et al. 1993, Cao & Walker 2000).

Estrutura e Características Genômica e Protéica do HIV

O HIV é um retrovírus complexo, membro da subfamília *Lentivirinae*, e existe sob duas formas genéticas bastante diferentes, o HIV tipo 1 e o HIV tipo 2. O vírion, a partícula viral infecciosa do HIV, é esférico, possuindo aproximadamente 80-100 nm de diâmetro, e compreende: um envelope viral, composto de uma membrana bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro contendo glicoproteínas codificadas pelo vírus (gp120/gp41); uma matriz protéica, composta da proteína p17; o capsídeo viral, de forma cilíndrica e composto da proteína principal p24; nucleocapsídeo composto das proteínas p7/p9; duas fitas simples de RNA genômico e três enzimas virais, transcriptase reversa, integrase e protease (Barré-Sinoussi 1996, Brooks et al. 2000).

O HIV possui um genoma diplóide, composto de duas fitas de RNA de filamento simples, ambas de sentido positivo, com 9,2 Kb de extensão e composto de genes estruturais e genes regulatórios. Os genes estruturais são partilhados por todos os retrovírus: *gag* codifica as proteínas do capsídeo e nucleocapsídeo viral; *pol* codifica as enzimas virais; *env* codifica a glicoproteína precursora gp160, clivada por proteases celulares em gp120 e gp41. Os genes

regulatórios são *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu* (HIV-1) ou *vpx* (HIV-2), e eles regulam ou auxiliam os vários processos biológicos virais: transcrição do RNA viral em DNA pró-viral, integração do DNA pró-viral ao DNA do hospedeiro, tradução de proteínas virais, maturação da partícula viral e infectividade. Os genes do HIV-1 diferem na sua potencial variabilidade estrutural. Os genes *gag* e *pol* são mais conservados que *env*. Na região do gene *env* foram descritos segmentos constantes (C) e variáveis (V), os quais codificam importantes epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes e por linfócitos T citotóxicos (Barré-Sinoussi 1996, Brooks et al. 2000).

A transcriptase reversa é uma enzima característica dos retrovírus e tem a função de transcrever o RNA genômico viral em DNA dupla fita (DNA proviral), o qual poderá então ser integrado ao genoma da célula hospedeira pela integrase, dando continuidade ao ciclo de replicação viral. O DNA proviral integrado serve de molde para a geração de novos RNAs genômicos e mensageiros, mediada por RNA-polimerases do hospedeiro, que por sua vez serão traduzidos nas proteínas estruturais e acessórias/regulatórias do vírus. A protease viral cliva as proteínas do vírus, codificadas pelo gene *gag* e sintetizadas como macromoléculas precursoras (Cao & Walker 2000, Abbas et al. 2003).

A entrada do HIV na célula-alvo é mediada por interações entre as glicoproteínas do envelope viral, gp120 e gp41, e moléculas constitutivas da célula do hospedeiro. A molécula de CD4 é o receptor primário para o HIV e identifica as populações celulares vulneráveis a esta infecção. Gp120 e gp41 são subunidades funcionais da precursora gp160 e apresentam-se associadas não-covalentemente, dispostas na forma de trímeros sobre o envelope viral. A gp120 projeta-se externamente em relação à superfície do vírus, enquanto

a gp41 permanece ancorada no envelope, possuindo uma porção externa, uma região transmembrana e um domínio interno. O sítio de ligação ao CD4 é representado pelos domínios variáveis da gp120, as chamadas alças V1, V2 e V3. A interação com CD4 promove modificações conformacionais na molécula da gp120, permitindo sua adicional ligação a co-receptores. Os principais co-receptores descritos para o HIV-1 são os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4. Os isolados virais parecem usar preferencialmente um ou outro co-receptor e são classificados de acordo com o uso do co-receptor em cepas R5 e cepas X4, embora isolados com duplo tropismo (R5X4) já tenham sido descritos. Outros co-receptores para o HIV-1 já foram descritos: CCR1, CCR2b, CCR3, CCR8, dentre outros. A ligação aos co-receptores induz a ativação da gp41, que se insere na bicamada lipídica da célula-alvo, promove a fusão do envelope viral com a membrana celular e injeta o cerne viral no citoplasma da célula (Levy 1996, Cilliers & Morris 2002).

Origem da Aids e Diversificação do HIV

Na família dos lentivírus de primatas, além dos tipos 1 e 2 do HIV, estão descritos também os vários tipos de vírus da imunodeficiência símia (SIV), os quais infectam uma variedade de espécies de primatas não-humanos. A análise da filogenia das cepas indica que provavelmente HIVs e SIVs derivam de um ancestral comum, o qual se foi diversificando ao longo do tempo, até constituir as atuais classes ou tipos desses patógenos. HIV-1 e HIV-2 se relacionam muito proximamente com tipos de SIVs isolados de diferentes espécies de primatas não-humanos: o HIV-1 se relaciona com o SIVcpz isolado de chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) e o HIV-2 com o SIVsm isolado de macacos Sooty mangabeys

(*Cercocebus atys*). Estas descobertas, apoiadas por outras informações virológicas e epidemiológicas, sugerem que as referidas espécies de primatas não-humanos sejam os respectivos reservatórios naturais para o HIV-1 e 2. Provavelmente, HIV-1 e 2 se diversificaram em seus hospedeiros naturais e em algum momento romperam a barreira entre as espécies, chegando ao homem por meio de diferentes eventos de transmissão zoonótica. As espécies animais consideradas reservatórios para o HIV habitam principalmente a África Central, sendo esta apontada como o provável berço da epidemia da aids (Barré-Sinoussi 1996, Sharp et al. 2000). Uma investigação desenvolvida na República Democrática do Congo descreve a alta complexidade das formas genéticas virais naquela região, com a circulação no local de praticamente todos os subtipos do HIV-1 e HIV-2, o que confirma a epidemia antiga existente na África Central e finalmente reforça a hipótese da origem da aids (Vidal et al. 2000).

Vários estudos têm sido desenvolvidos se propondo a explicar o modo pelo qual o HIV se diversificou, até compor o atual panorama da pandemia da aids. A abordagem mais utilizada emprega o sequenciamento e a análise filogenética de segmentos de genes virais. Estes estudos se concentram principalmente no HIV-1 do grupo M, por causa da grande implicação destas cepas na composição da epidemia. Em linhas gerais, os pesquisadores utilizam-se de comparações entre sequências de DNA de isolados virais datados de diferentes períodos, verificando a ocorrência de mutações em cada sítio das sequências ao longo dos intervalos de tempo que separam os isolados. Determinam, assim, as frequências ou taxas anuais de mutações das cepas do HIV-1. Assumindo que estas taxas são constantes, transformam este dado em tempo de diversificação, criando uma espécie de relógio molecular para a evolução do HIV (Li et al. 1988, Korber et al. 2000).

Li e colaboradores (1988) encontraram uma taxa média de mutação para o HIV-1 de $5,9 \times 10^{-3}$ nucleotídeos por sítio por ano, uma taxa que é cerca de 10^6 vezes mais rápida que a de outros microrganismos com genoma DNA, mas similar a de outros retrovírus. Os autores trabalharam com isolados norte-americanos, haitianos e africanos. Levando em conta a filogenia dos isolados e a velocidade de evolução do HIV-1 (representada pela frequência anual de mutações), Li e colaboradores propõem que a aids já existia na África central antes de 1960 e disseminou-se para o Haiti e depois América do Norte em meados de 1970.

Zhu e colaboradores (1998) contribuíram muito para os estudos sobre a origem do HIV-1, relatando o isolamento de material genético viral em uma amostra de plasma humano datada de 1959. A amostra era de um homem africano, procedente do Zaire (atualmente República Democrática do Congo) na África Central, e foi agrupada na árvore filogenética dos subtipos do grupo M muito próxima ao nó ancestral de B, D e F. Os autores propuseram que os vírus do grupo M devem ter compartilhado um ancestral comum nos anos 40 ou início dos 50, o qual foi introduzido na população africana por volta de 1959 e a partir daí se diversificou. Os pesquisadores apontam como prováveis fatores facilitadores da disseminação inicial do HIV-1 na África as modificações sociais experimentadas pelas populações nas primeiras décadas do século passado, tais como acesso mais fácil a transporte, aumento na densidade populacional e contatos sexuais mais freqüentes, embora considere relevante também o papel das campanhas de vacinação em massa, talvez com o uso de seringas contaminadas.

Korber e colaboradores (2000) desenvolveram um importante trabalho sobre a origem do HIV-1. Os autores trabalharam com um grande número de isolados, sequenciando o gene *env* em toda a sua extensão e fragmentos do gene *gag*. Analisaram seus dados sob modelos evolucionários sofisticados criados pelos pesquisadores, baseados na hipótese do relógio molecular. Na validação do seu modelo, empregaram “cepas históricas” do HIV-1, isolados virais com datas de isolamento bem documentadas, como o de Zhu e colaboradores e cepas CRF01_AE (“Circulating Recombinant Form”; Forma Recombinante Circulante). A CRF01_AE foi utilizada porque existem muitos dados epidemiológicos e da filogenia do grupo que permitem definir com precisão a data do seu ancestral. Assim, chegaram à data de 1931, sendo esta reconhecida como a mais provável data de existência do ancestral comum dos subtipos do HIV-1 do grupo M.

A Variabilidade Genética do HIV-1

1. Classificação do HIV-1

Estudos de sequenciamento e análise filogenética de fragmentos gênicos do HIV-1, primeiramente no gene *env* e depois nos genes *gag* e *pol*, realizados em diferentes regiões geográficas do planeta, revelaram que os isolados podiam ser agrupados em subtipos ou classes filogeneticamente definidas, as quais eram aproximadamente eqüidistantes umas das outras – os subtipos do HIV-1 podem diferir em até 35% nas posições dos aminoácidos da proteína do envelope (UNAIDS 1997a e b, Robertson et al. 2000, Gaschen et al. 2002).

Atualmente, os isolados do HIV-1 são classificados em três grupos: M (*main*), O (*outlier*) e N (*new* ou *non-M/non-O*). O grupo M é constituído de nove subtipos virais, designados por

letras: A – D, F – H, J e K, e quatro sub-subtipos, chamados A1 e A2, F1 e F2. Os vírus do grupo M do HIV-1 são os responsáveis pela epidemia global da aids. Vírus dos grupos O e N infectam pessoas vivendo na África Central (principalmente Camarões e países vizinhos) ou aparecem como casos esporádicos em países da Europa e Américas, em indivíduos com vínculo epidemiológico com a África (UNAIDS 1997a e b, Robertson et al. 2000).

Com o aperfeiçoamento das metodologias de Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” - PCR), seqüenciamento e análise filogenética, obteve-se uma visão mais apurada da complexa diversidade genética viral. Alguns isolados do HIV-1 apresentavam perfis genotípicos discordantes, quando duas ou mais regiões do seu genoma eram analisadas (Robertson et al. 2000). Este achado levou à proposição de que tais vírus seriam produtos de eventos de recombinação genética intersubtipos. Cornelissen e colaboradores (1996) analisando segmentos dos genes *gag* e *env* de isolados virais recolhidos em diversos países (Brasil, Tailândia, Ruanda, Uganda) encontraram alta frequência de vírus recombinantes, indicando que provavelmente a circulação de diferentes subtipos numa mesma região geográfica favoreça a recombinação entre as cepas.

Foram então definidas as formas recombinantes circulantes ou CRFs (*Circulating Recombinant Forms*), produtos de um mesmo evento de recombinação genética intersubtipos e identificadas em pelo menos três indivíduos sem vínculo epidemiológico. Assim, cada CRF é considerada como uma classe filogenética de HIV-1 bem definida, contribuindo efetivamente para a disseminação da epidemia da aids em diversas regiões do mundo. As CRFs são designadas por um número, segundo a sua ordem de isolamento, seguido do nome dos subtipos parentais (ex: CRF01_AE foi a primeira CRF identificada,

produto da recombinação entre o subtipo A e a forma E, não encontrada como um subtipo puro). Atualmente existem dezesseis CRFs descritas. Se o recombinante envolve mais de três subtipos, a CRF passa a receber a notação cpx (*complex*, complexa) para facilitar a sua designação (ex: CRF04_cpx, representa a forma recombinante entre subtipos A/G/H/K e regiões não classificadas) (Robertson et al. 2000, Nájera et al. 2002).

Estudos posteriores apontaram ainda a existência de formas recombinantes únicas – URFs (*Unique Recombinant Forms*), vírus recombinantes que não constituem classe ou grupo filogenético definido, identificados em apenas um indivíduo ou em um grupo de indivíduos com vínculo epidemiológico. O avanço das pesquisas sobre a epidemiologia molecular da infecção pelo HIV em todo o mundo, com amostragens em áreas antes não investigadas ou pouco amostradas, análises filogenéticas mais freqüentes de vários segmentos do genoma viral e o aumento do número de genomas completos analisados, têm permitido avaliar a importância da diversidade viral na construção e delineamento das tendências da pandemia (Robertson et al. 2000, Nájera et al. 2002, Los Alamos 2005).

A diversidade genotípica do HIV-1 no mundo está refletida numa heterogênea distribuição geográfica dos isolados virais. Diferentes níveis de prevalência e perfis diferenciados de formas genotípicas do HIV-1 têm sido observados em diferentes regiões do mundo. Os relatórios da UNAIDS (1997a e 1997b), órgão da Organização Mundial da Saúde responsável por pesquisas e políticas relativas à aids no mundo, apresentam a complexidade desta distribuição. O continente africano representa um verdadeiro “caldeirão” de tipos, grupos, subtipos e formas recombinantes do HIV. A epidemia asiática, mais recente, apresenta epidemiologia molecular menos diversa, com prevalência da CRF01_AE e

subtipo B, embora a presença de outros subtipos (C, A e D) já tenha sido apontada em alguns países, indicando o crescimento da epidemia. Nas Américas e na Europa há prevalência do subtipo B, com presença do subtipo F e de alguns recombinantes.

2. Mecanismos Geradores da Diversidade

Goodenow e colaboradores (1989) demonstraram “in vitro” o surgimento de polimorfismo genético em isolados do HIV-1, a partir da análise de fragmentos dos genes *env* e *gag* de isolados virais cultivados por curto período em células mononucleares periféricas. Esta característica do HIV-1 tem sido demonstrada também em indivíduos recentemente infectados, com o surgimento de diversidade viral em curto tempo após a infecção (Cichutek et al. 1992). São considerados mecanismos geradores da diversidade genética do HIV-1, uma alta taxa de mutação viral, elevada capacidade replicativa do vírus e a capacidade destes patógenos de recombinar o seu material genético (Domingo et al. 1985, Temin 1993, Nájera et al. 2002)

Segundo Domingo e colaboradores (1985), alguns vírus com genoma de RNA aparecem nos indivíduos infectados não como uma espécie de genoma único, mas como populações geneticamente heterogêneas, compostas de variantes virais relacionadas. Para designar este tipo de população foi adotado o conceito de *quasispecies*, indicando que aproximadamente cada partícula viral apresenta um genoma que é diferente dos demais.

A elevada capacidade replicativa do HIV-1 foi melhor descrita a partir do trabalho de Ho e colaboradores (1995). Uma taxa de produção viral da ordem de 10^9 vírions por dia foi demonstrada em indivíduos infectados. Esta notável capacidade produtiva tem grande impacto no sistema imune do hospedeiro, com taxas de destruição e renovação de linfócitos

T CD4⁺ (LTCD4⁺) também muito altas ($\sim 10^9$ células/dia). Coffin (1995) destaca o papel fundamental desta dinâmica, mantida durante anos de infecção, na depleção dos LTCD4⁺ nas fases mais avançadas da doença e patogênese da aids. A fase de latência clínica, considerada até então como uma fase de baixa produção viral, foi redefinida como um período de elevada atividade viral e destruição celular, ilustrada pelo curto tempo de vida-média de uma célula T CD4⁺ infectada, de 1-2 dias, e uma taxa de replicação anual de 300 ou mais ciclos/genoma (Coffin 1995, Ho et al. 1995).

A alta frequência de mutação retroviral parece ser consequência do seu próprio ciclo biológico, envolvendo a ação da enzima transcriptase reversa, à qual é atribuída alta taxa de erro (substituições de bases, deleções, inserções, recombinação genética), muito provavelmente por não dispor de proteínas acessórias e atividade de nuclease para a correção dos erros. Mutações por substituição de base envolvem deslocamento mutagênico ou incorporação incorreta de base no ponto de crescimento da fita nascente, seguido de polimerização a partir do ponto de troca. Após a substituição, a sequência circunvizinha determina se há ou não polimerização com a base adjacente, assim mantendo a estrutura de leitura, ou se transfere (salta) para outra posição no molde, formando uma deleção ou inserção (saltos sobre uma mesma fita) ou ainda uma recombinação (salto entre as fitas de RNA). Quanto maior a capacidade replicativa, mais frequentemente estes eventos irão ocorrer (Temin 1993, Nájera et al. 2002). Devido à cinética de replicação do HIV-1 e o tamanho destas populações “in vivo”, toda e qualquer mutação de ponto devem ocorrer na ordem de 10^4 a 10^5 vezes por dia em um indivíduo infectado (Ho et al. 1995, Coffin 1995).

A natureza diplóide do genoma retroviral reflete uma vantagem evolutiva, permitindo o reparo de defeitos ou quebras na sequência do RNA viral mediante a ocorrência da recombinação genética. A recombinação genética requer a infecção de uma única célula por dois vírions, e parece ocorrer preferencialmente durante os eventos iniciais da transcrição reversa. Estes eventos envolvem saltos da transcriptase reversa entre moléculas heterólogas de RNA genômico, saltos que podem ser forçados ou aleatórios, com a conseqüente geração de genomas híbridos. É proposta uma taxa de recombinação de 2 a 3 cruzamentos ou saltos por ciclo de replicação em todo o genoma viral (Temin 1993, Jetzt et al. 2000).

No HIV-1, a recombinação pode ocorrer entre diferentes cepas do mesmo subtipo (intrasubtipo), entre diferentes subtipos (intersubtipo) ou, mais raramente, entre diferentes grupos (intergrupo). Estudos “in vitro” demonstram infecções múltiplas com cepas do HIV-1 em células mononucleares periféricas, com a extensão da superinfecção crescendo ao longo do tempo. Em humanos, relatos de co-infecção com diferentes subtipos têm sido descritos, principalmente entre usuários de drogas injetáveis e pessoas praticando sexo desprotegido. Infecções envolvendo mais de um tipo de vírus podem ocorrer simultânea (co-infecção) ou seqüencialmente (re-infecção). Superinfecção tem sido empregado para designar infecções seqüenciais, envolvendo pelo menos dois eventos de transmissão. A ocorrência de infecção dupla é o primeiro passo para a recombinação viral, e explica as altas taxas de genomas recombinantes em áreas onde vários subtipos co-circulam (Nájera et al. 2002).

Métodos para Avaliação da Diversidade Genotípica do HIV-1

São considerados como métodos de referência para a avaliação da diversidade genética do HIV-1, o sequenciamento e a análise filogenética. Estes são métodos extremamente precisos, mas são também muito caros e laboriosos, exigindo um arsenal de equipamentos, reagentes e de pessoal altamente treinado para a sua execução. A necessidade cada vez maior de investigações em larga escala, realizadas nas diversas partes do globo, tornava premente a criação de ensaios alternativos, mais acessíveis, para a análise da diversidade genética viral. Alguns estudos têm chamado a atenção para a relevância da diversidade viral na eficácia dos testes comerciais para o HIV-1. Os testes para diagnóstico da infecção pelo HIV-1 foram desenvolvidos e testados nos Estados Unidos e Europa, onde a maioria das infecções é causada por cepas do subtipo B. Estudos empregando cepas não-B têm sido recomendados para validar a aplicabilidade destes testes em regiões onde várias formas genéticas do HIV co-circulam (Thomson et al. 2002b).

O ensaio da Análise da Mobilidade de Heteroduplex – HMA, idealizado por Delwart e colaboradores (1993), trouxe grande contribuição para os estudos de diversidade viral do HIV-1, pois representa um ensaio de triagem molecular capaz de estimar o grau de similaridade genética entre isolados do HIV-1 sem a necessidade dos sofisticados equipamentos e elevado grau de capacitação técnica exigidos pelas técnicas até então em uso. A HMA se baseia na verificação da mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida de híbridos de DNA, os heteroduplex, gerados a partir do pareamento de cepas de referência (subtipo conhecido) com amostras-testes, ambas na forma de curtas seqüências de nucleotídeos do gene *env*, geradas por PCR.

Empregando a HMA *env* na análise de isolados do HIV-1 de indivíduos provenientes de diferentes países, Delwart e colaboradores (1993) demonstraram rápida e confiável determinação do subtipo viral nos isolados testados, alcançando alta correlação com a técnica de seqüenciamento. Os autores apontaram ainda que a mobilidade eletroforética dos híbridos no gel de poliacrilamida é proporcional à distância genética entre os isolados, quando esta diferença se situa entre 3 e 20%. Assim, observou-se graus de divergência da ordem de 8% entre seqüências do gene *env* de um mesmo indivíduo, sendo que em alguns esta distância chegava a ser maior que a observada entre indivíduos sem vínculo epidemiológico. Entre amostras de diferentes subtipos foi encontrada distância genética de mais de 20%. Foi demonstrada correlação entre diversidade genética do HIV-1 e tempo transcorrido desde a introdução do vírus na população, quanto maior o tempo de disseminação da epidemia na região maior a complexidade genotípica viral local. Os autores da técnica apontam como principais limitações da HMA a possibilidade de contaminações, principalmente na etapa de amplificação das amostras – PCR, e a necessidade de contínua revisão e adaptação dos reagentes e cepas de referência às populações locais (Delwart et al. 1997).

Heyndrickx e colaboradores (2000) estenderam a análise da diversidade viral, antes restrita ao gene *env*, para o gene *gag*. A combinação da HMA *gag* com a HMA *env* representa um acréscimo no poder investigativo da técnica, permitindo a identificação de genomas híbridos na população, apresentando subtipos diferentes em *gag* e em *env*. Este achado representa forte indício de recombinação genética intersubtipos, embora a possibilidade de infecções duplas, envolvendo diferentes subtipos, deva ser considerada. Torna-se necessário

o mapeamento do genoma viral, com a identificação do sítio de recombinação, para definir a presença de um vírus recombinante (Nájera et al. 2002, Thomson et al. 2002).

A HMA representa uma ferramenta valiosa, muito útil na investigação da diversidade viral e no monitoramento da evolução da epidemia, sendo aplicável em larga escala. Embora apresente alta correlação com a técnica de referência (seqüenciamento), deve-se destacar que a HMA é um método de triagem, adequado para propostas de vigilância epidemiológica, mas conclusões sobre isolados individuais devem envolver o uso de técnicas definitivas. HMA env e HMA gag têm sido introduzidas pela UNAIDS em vários países em desenvolvimento, para o monitoramento da distribuição dos subtipos virais. Estudos mais recentes têm apontado a utilidade da HMA mesmo em regiões onde a epidemia apresenta elevada complexidade genotípica (UNAIDS 1997a e b, Heyndrickx et al. 1998, Sawadogo et al. 2003).

Diversidade Genética Viral X Patogênese e Transmissão do HIV-1

Muitos estudos têm tentado demonstrar a relevância da elevada diversidade genética viral para processos como transmissão e patogênese da infecção pelo HIV-1. Diferenças na frequência de transmissão e na taxa de progressão para doença em relação ao subtipo viral infectante têm sido relatadas. Vírus do subtipo A têm sido considerados menos patogênicos que a maioria dos outros subtipos (Kanki et al. 1999, Kaleebu et al. 2002). Dois estudos com pares de mães HIV⁺/aids e filhos infectados pela via vertical apontam resultados discordantes: um aponta o subtipo D sendo mais transmitido que o subtipo A (Yang et al.

2003) e o outro aponta o D sendo menos transmitido entre vários outros subtipos, inclusive A (Renjifo et al. 2001). Vários outros estudos não encontraram correlação entre subtipo viral e os processos em questão, transmissão e patogênese do HIV-1 (Murray et al. 2000, Eshleman et al. 2001, Tàpia et al. 2003).

Nesta linha de investigação, alguns estudos apontam a dificuldade em se estabelecer correlação entre genótipo e transmissão/patogênese do HIV-1. Destaca-se que estes são processos complexos, multifatoriais, abrangendo aspectos de natureza viral, genéticos e imunológicos do hospedeiro e ainda outras variáveis sócio-econômicas e ambientais (UNAIDS 1997a e b, Hu et al. 1999). Até o momento, exemplo bem documentado e incontestado de diferença na transmissão e patogênese pode ser atribuído ao HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é considerado menos eficiente na transmissão e menos patogênico que o tipo 1. Entre os diferentes subtipos do HIV-1, a polêmica ainda é grande (UNAIDS 1997a, Hu et al. 1999).

Diversidade Genotípica do HIV-1 no Brasil

Os estudos de diversidade genotípica do HIV-1 no Brasil indicam uma epidemia complexa, com algum grau de diversidade. A maioria dos estudos é representativa de pacientes da região sudeste do país, onde se concentra grande parte dos pacientes HIV⁺/aids. Estes estudos indicam a prevalência de cepas do subtipo B (~88,5%), seguido do subtipo F (~8,9%) e pequena proporção de infecções com subtipo C (~1,7%) e B/F (~0,9%) (Galvão-Castro et al. 1996, Sabino et al. 1996, Bongertz et al. 2000). O primeiro relato de infecção por vírus recombinante B/F no Brasil é procedente da região sudeste (Sabino et al. 1994).

Relatos de infecção com HIV-1 dos subtipos A e D, menos freqüentes, são provenientes também desta região (Morgado et al. 1998, Tanuri et al. 1999, Caride et al. 2000, Guimarães et al. 2002a).

Em Manaus-AM, observou-se a presença de HIV-1 dos subtipos B, F, B/C e uma elevada proporção de recombinantes B/F. Os autores testaram a distribuição dos vários subtipos encontrados em relação às variáveis: grupo de risco (heterossexual, homossexual, bissexual, transfusão), condição clínica (HIV⁺ ou aids), contagem de LTCD4⁺ e carga viral plasmática. Nenhuma correlação foi encontrada (Vicente et al. 2000). Diversidade genética marcante, com presença de subtipos B (45%), F (12%), B/D (1,5%), B/F (1,5%) e elevada freqüência de infecções pelo subtipo C (40%), foi observada na cidade de Porto Alegre, na região sul do país (Soares et al. 2003a).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos no estado de Goiás, apresentando uma diversidade de subtipos do HIV-1 considerável. Num dos primeiros trabalhos sobre a diversidade genotípica do HIV-1 em crianças infectadas, Álvares Júnior (1999) relatou presença de cepas do subtipo B em todas as amostras investigadas. Um outro estudo desenvolvido com gestantes HIV⁺/aids, apontou a predominância de vírus do subtipo B, com presença de subtipo C e recombinante B/A entre as pacientes (Stefani et al. 2000). Ainda, estudando a transmissão vertical do HIV-1, Alcântara (2003) encontrou 86,1% de subtipo B e 13,9% de HIV-1 com perfil genotípico B/F entre as mães HIV⁺/aids.

Análises mais abrangentes da distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 nas diferentes regiões geográficas do Brasil são necessários. Estas pesquisas são importantes para o

monitoramento da evolução da epidemia no país e também para o planejamento e condução de ensaios com possíveis candidatos a vacinas anti-HIV. O desenvolvimento de vacinas efetivas contra o HIV-1 depende do conhecimento das características locais da epidemia, características virológicas, epidemiológicas e imunológicas (Morgado et al. 2002). Neste sentido, o emprego de técnicas menos dispendiosas para a verificação da diversidade genética viral, que possam ser amplamente aplicadas, é uma das recomendações mais consistentes da UNAIDS (UNAIDS 1997b).

II – JUSTIFICATIVA

Vários estudos apontam a importância da contínua investigação da diversidade viral local no monitoramento da dinâmica da distribuição, introdução e disseminação das diferentes formas genéticas do HIV-1. O conhecimento sobre as variantes genéticas do HIV-1 é importante para garantir que os testes comerciais de diagnóstico e de avaliação da carga viral sejam sensíveis e específicos para todos os subtipos do HIV-1.

O Brasil é um país de dimensões continentais, apresentando características sociais, culturais e econômicas distintas entre as suas cinco regiões geográficas. Estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 no país têm apontado uma considerável heterogeneidade nos perfis de distribuição dos subtipos virais pelas diferentes regiões geográficas (Morgado et al. 2002).

Uma revisão da literatura sobre a diversidade genotípica do HIV-1 no Brasil indica concentração de dados provenientes de pacientes das regiões sudeste e sul, revelando uma escassez de dados sobre amostras de pacientes de outras regiões do país, como a região

centro-oeste. Este trabalho se propõe a contribuir para o conhecimento da diversidade genotípica do HIV-1 no estado de Goiás, seguindo a linha de pesquisa do nosso grupo, que vem estudando a diversidade genética viral no centro-oeste desde 1997. Nosso estudo enfoca a diversidade viral do HIV-1 em dois subgrupos populacionais particularmente importantes, mulheres HIV⁺/aids e crianças, a grande maioria infectada pela via vertical.

III - OBJETIVO

Caracterizar a diversidade genotípica do HIV-1 nas regiões *env* e *gag* do genoma viral em mães HIV⁺/aids e em crianças e adolescentes HIV⁺/aids, atendidos no centro de referência para diagnóstico e tratamento da infecção pelo HIV-1 – Hospital Dr. Anuar Auad/HDT/SUS, Goiânia-GO. No intuito de contextualizar as informações sobre a diversidade do HIV-1, as principais características epidemiológicas, imunológicas (contagem de LTCD4⁺), virais (carga viral plasmática) e clínicas dos pacientes envolvidos no estudo são apresentadas.

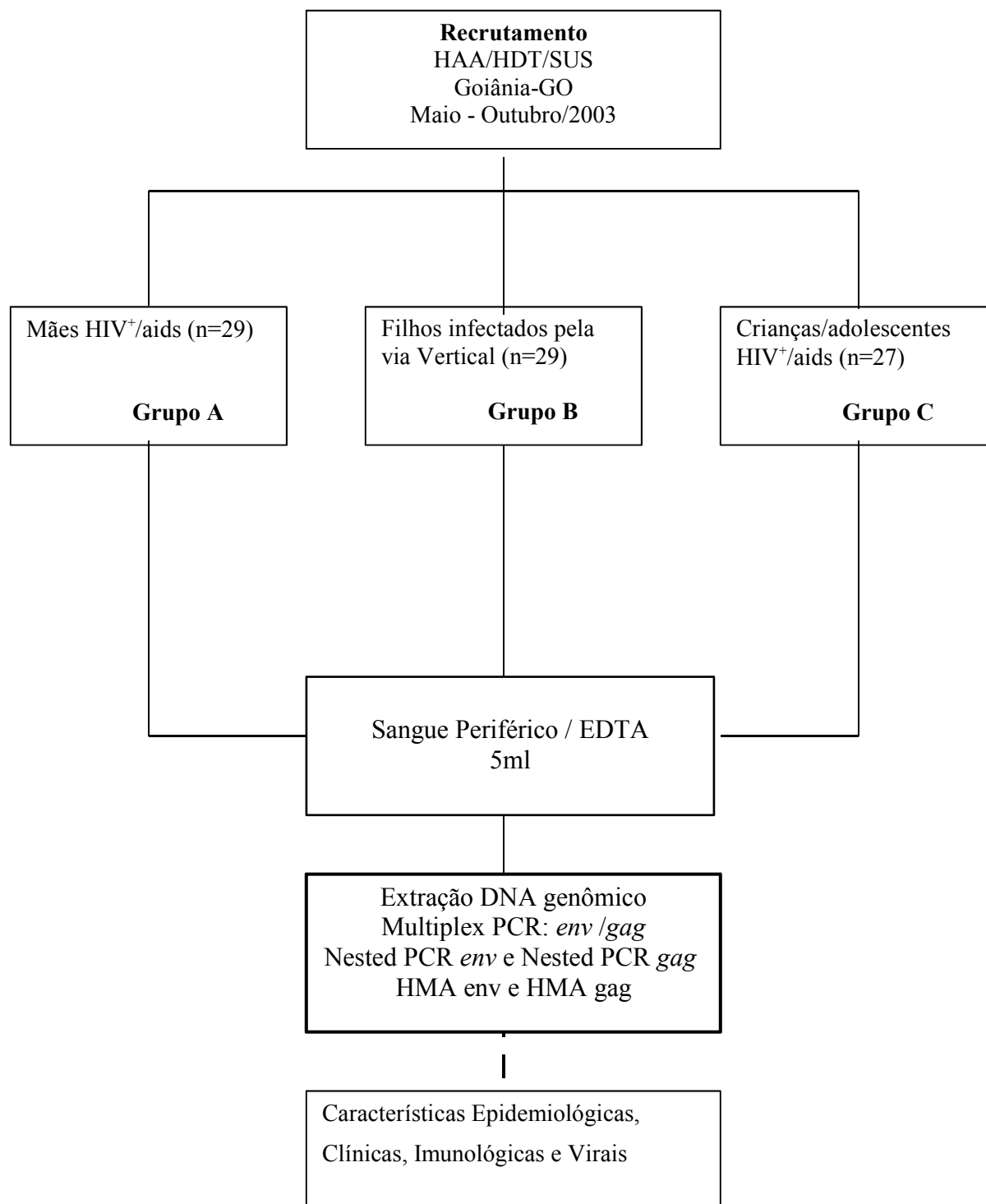
IV - PACIENTES E MÉTODOS

A. Grupo de Estudo

Este é um estudo descritivo de corte transversal para caracterizar a diversidade genotípica do HIV-1 em mulheres/mães HIV⁺/aids e em crianças e adolescentes infectados, no estado de Goiás. O grupo de estudo consistiu de 85 pacientes, representados por 29 pares de mães HIV⁺/aids e filhos infectados pela via vertical e 27 crianças/adolescentes HIV⁺/aids, na maioria órfãos de mães que faleceram de causas relacionadas a aids. A fim de avaliar a diversidade genotípica do HIV-1 no caso index (mãe) e no filho, estes pacientes foram divididos em três grupos. O primeiro grupo foi composto das 29 mães HIV⁺/aids (Grupo A). As crianças e adolescentes HIV⁺/aids (n=56) foram distribuídos nos Grupos B e C, indicando o grupo dos filhos das mães incluídas no estudo (n=29) e o grupo das crianças/adolescentes analisadas isoladamente (n=27), respectivamente. O Fluxograma 1 representa um resumo da metodologia empregada em nosso estudo.

Os pacientes foram recrutados no período entre Maio e Outubro de 2003, com base na demanda espontânea do serviço de atendimento médico ambulatorial do Hospital Dr. Anuar Auad/Hospital de Doenças Tropicais/SUS (HAA/HDT/SUS) de Goiânia-GO, centro de referência do centro-oeste no tratamento da infecção pelo HIV/aids. Todos os pacientes tinham diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV-1 e estavam sob acompanhamento clínico e laboratorial na referida Unidade de saúde.

Fluxograma 1: Desenho experimental do estudo da diversidade genética do HIV-1 em mães HIV⁺/aids e crianças/adolescentes infectados.



Os principais critérios de inclusão foram: mães e crianças/adolescentes com diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV-1. O diagnóstico da infecção pelo HIV-1 nas mães e crianças acima de 2 anos de idade foi realizado por meio de teste sorológico (ELISA - “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) para HIV-1/2, conforme recomendado por portaria nº488/98 do Ministério da Saúde. As crianças menores de 2 anos foram diagnosticadas mediante a realização de testes de quantificação do RNA viral plasmático (PCR, NASBA, b-DNA). Os testes de diagnóstico da infecção pelo HIV-1 nos pacientes eram realizados no Laboratório Central do estado de Goiás (LACEN-GO), em Goiânia-GO. No grupo de crianças/adolescentes foram incluídos pacientes de 1 a 13 anos de idade.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelas mães ou responsáveis legais, foram colhidos 5ml de sangue venoso periférico em tubo vacutainer-EDTA (*Becton & Dickinson, San Jose –CA, USA*). As amostras eram imediatamente divididas em duas alíquotas (1mL) de sangue total e uma de plasma (1mL) e estocadas a –70°C no “Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase”, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do HDT/HAA/SUS (Anexo A).

B. Dados Epidemiológicos e Clínicos

Os dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes envolvidos no estudo foram obtidos mediante revisão sistemática dos prontuários médicos arquivados no HAA/HDT/SUS. Foram incluídos dados sobre origem (naturalidade e procedência), características sócio-econômicas, via de infecção pelo HIV-1, gestação/parto. Dados relativos a comportamentos

de risco das mães e de seus parceiros sexuais, tais como multiplicidade de parceiros, história de uso de drogas injetáveis, existência de parceiro sabidamente infectado pelo HIV-1, dentre outros, foram compilados. Foram registradas também as principais manifestações clínicas associadas à infecção pelo HIV-1. Os pacientes foram classificados pelos clínicos responsáveis em sintomáticos (aids) ou assintomáticos (infectados pelo HIV), de acordo com os critérios adotados pelo Ministério da Saúde (FUNASA 2002). A fim de tentar relacionar diversidade genética do HIV-1 com a área geográfica da qual o paciente era proveniente, ênfase especial foi dada à origem dos participantes. O Anexo B apresenta o modelo do questionário utilizado para a coleta dos dados dos pacientes.

Os dados laboratoriais dos pacientes, representados pelas contagens de linfócitos T CD4⁺ (LTCD4⁺) e quantificações da carga viral plasmática, foram obtidos nos prontuários médicos no HAA/HDT/SUS. A contagem dos LTCD4⁺ no sangue periférico dos pacientes foi realizada por citometria de fluxo (*FACSCount; Becton & Dickinson, San Jose, CA*). Diferentes metodologias foram empregadas para a quantificação da carga viral plasmática: PCR em transcrito reverso do RNA viral ou “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction” - RT-PCR (*Amplicor HIV-1 monitor assay; Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ*), NASBA ou “Nucleic Acid Sequence Based Amplification Assay” (*NASBA; Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands*) e b-DNA ou “branched-DNA” (*Teste Versant HIV 3.0 bDNA – Bayer Health Care*). Tanto as contagens de LTCD4⁺ quanto as quantificações da viremia plasmática foram realizados no LACEN-GO.

Contagens de LTCD4⁺ foram utilizadas para a avaliação da condição imunológica dos pacientes no momento do nosso estudo. Foram considerados valores normais de LTCD4⁺: $\geq$

500 células/ μ L para adultos e crianças com idade superior a 6 anos; ≥ 1.000 células/ μ L para crianças com idade entre 1 e 5 anos e >1.500 células/ μ L para crianças com menos de 1 ano de idade. Alteração imunológica grave, compatível com imunodeficiência grave, foi definida de acordo com a faixa etária: adultos e crianças acima de 6 anos de idade contagens de LTCD4⁺ < 200 células/ μ L; crianças de 1 a 5 anos de idade contagens de LTCD4⁺ < 500 células/ μ L; crianças menores de 1 ano de idade contagens de LTCD4⁺ < 750 células/ μ L, segundo estabelecido nas “Recomendações para Terapia Anti-Retroviral em Adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV-1 – 2002/2003” (MS 2002/2003) e no “Guia de Tratamento da Infecção pelo HIV em Criança – 2004” (MS 2004). Os pacientes foram analisados quanto ao uso de anti-retrovirais no momento do estudo, e os esquemas terapêuticos foram categorizados como monoterapia com AZT e terapia combinada, definida como a combinação de dois, três ou mais anti-retrovirais (ARVs).

C. Caracterização Genotípica do HIV-1

A determinação do subtipo genético do HIV-1 nas regiões *env* e *gag* do genoma viral foi realizada empregando-se a técnica de “Análise da Mobilidade de Heteroduplex” ou HMA (*Heteroduplex Mobility Analysis*) (Delwart et al. 1993, Heyndrickx et al. 2000). A identificação do subtipo do HIV-1 foi realizada segundo protocolos do “AIDS Reagent Program”: “Heteroduplex Mobility Analysis – HIV-1 *env* Subtyping Kit Protocol version 5” (Mullins 1995) e “HIV-1 group M *gag* Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) Subtyping Kit” (Heyndrickx et al. 2002). A técnica foi desenvolvida utilizando-se iniciadores e plasmídeos contendo DNA de cepas de referência fornecidos pelo “AIDS Reagent

Program” do “National Institutes of Health (NIH)/AIDS Research and Reference Reagent Program, USA”.

Resumidamente, a técnica de HMA consiste de três etapas: extração do DNA genômico de Células Mononucleares Periféricas (CMP); amplificação do DNA proviral; hibridização de DNA, eletroforese em gel de poliacrilamida e identificação do subtipo do HIV-1 na amostra-teste.

C. 1. Extração, Purificação e Quantificação do DNA genômico de CMP

Sangue total (500µL) foi tratado com solução de lise de hemácias (solução A: sucrose 1M, Tris HCl 1M, MgCl₂ 1M e Triton-X 100). A mistura foi centrifugada a 4000rpm por 15 minutos e as CMP foram lisadas com 1mL de DNAzol (*Molecular Research Center Inc. Cincinatti, Ohio, USA*), uma solução detergente a base de guanidina.

O DNA genômico foi precipitado com etanol 100%, resfriado a -70°C durante 1 hora e centrifugado a 14.000 rpm em temperatura ambiente durante 25 minutos. O precipitado foi, então, lavado duas vezes com etanol 80%, secado a 60°C por 30 minutos e solubilizado em tampão de Tris-EDTA 1X (Tris HCl 1 M pH 8,0 e EDTA 0,1M).

Para a quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA genômico extraído foi determinada a absorbância em comprimento de onda de 260/280nm (*GeneQuant RNA/DNA Calculator - Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England*) em amostra diluída 1:20 em água ultrapura (Milli-Q® - *Milli-Q Academic, Gradient, Biocel Synthesis, São Paulo*,

Brasil). De acordo com as recomendações do protocolo para HMA, foi utilizada uma concentração mínima de 1µg de DNA genômico por reação de amplificação.

C. 2. Amplificação do DNA proviral

Na etapa de amplificação do DNA proviral foi utilizada inicialmente a modalidade “Multiplex-PCR”, na qual fragmentos da região *env* e *gag* são gerados simultaneamente mediante PCR que emprega pares de iniciadores para ambas as regiões. Nesta primeira etapa da amplificação são utilizados pares de iniciadores que amplificam uma região do DNA proviral mais extensa. Em seguida, para gerar quantidade suficiente de cópias do DNA proviral de cada região, realiza-se uma segunda etapa de PCR (“Nested PCR”). Nesta segunda etapa, realizamos amplificação separadamente para a região *env* e para *gag*, utilizando pares de iniciadores que amplificam uma região menor de DNA, localizada internamente em relação à primeira. Os plasmídeos contendo as cepas de referência são amplificados somente uma vez, com os pares de iniciadores empregados na “Nested PCR”. Desta forma, a etapa de hibridização de DNA (amostra-teste + cepa de referência) para a identificação do subtipo do HIV-1 emprega fragmentos de comprimentos semelhantes.

C. 2. 1 – “Multiplex-PCR”

Consiste na realização da primeira etapa de amplificação das regiões *env* e *gag*, simultaneamente, segundo descrito a seguir:

Água Milli-Q® 31,1µL

Tampão de PCR 10X com MgCl₂ 15mM 5,0µL

Mistura de dNTPs 25mM..... 0,4µL

ED5 5pmol.....	2,0µL
ED12 5pmol	2,0µL
H1P202 5pmol	2,0µL
H1G777 5pmol	2,0µL
Taq DNA polimerase 5U	0,5µL
Amostra	5µL
Volume final	50µL

A mistura de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato) continha 25mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Na primeira PCR para a região *env*, foram empregados os iniciadores ED5 (5'-ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG-3') e ED12 (5'-AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG-3'), que amplificam um segmento de DNA de aproximadamente 1,25 Kb, correspondente à região V1-V5 da gp120 (coordenadas em relação ao genoma do HIV-1_{HXB2} - *Genebank accession number* K03455).

Na primeira PCR para a região *gag*, foi empregado o par de iniciadores H1P202 (5'-CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT-3') e H1G777 (5'-TCACCTAGAACTTTGAAT GCATGGG-3'), amplificando um fragmento de 1,1Kb, compreendendo a região que codifica desde o aminoácido 16 da p24 até o aminoácido 33 da protease, em relação ao isolado ELI do HIV-1 do grupo M (*Genebank accession number* K03454). A PCR foi realizada em termociclador (*Perkin Elmer - GeneAmp PCR Systems 2.400, Connecticut, USA*) utilizando o seguinte programa: 1 ciclo 94°C 2 minutos; 35 ciclos

94°C 15 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 60 segundos; 1 ciclo 72°C 7 minutos; 4°C indeterminado.

C. 2. 2 – “Nested PCR” para a região *Env*

A segunda etapa de amplificação do gene *env* empregou:

Água Milli-Q®	79,3µL
Tampão de PCR 10X c/ MgCl ₂ 15mM	6,7µL
Mistura de dNTPs 25mM	0,5µL
ED31 5pmol	4,0µL
ED33 5pmol	4,0µL
Taq DNA polimerase 5U	0,5µL
Produto da 1ª etapa de amplificação	5,0µL
Volume final	100µL

O par de iniciadores ED31 (5'-CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG-3') e ED33 (5'-TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC-3') amplificam um fragmento de aproximadamente 500pb compreendendo a região variável V3 e as adjacentes C2 e C3 da gp120. Quando não houve amplificação, foi utilizado o par de iniciadores ES7 (5'-TGTAACGACGGCCAGTCTGTAAATGGCAGTCTAGC-3') e ES8 (5'-CAGGAA ACAGCTATGACCCACTTCTCCAATTGTCCCTCA-3') (protocolo *NIH/AIDS Research and Reference Reagent Program – HMA env*). Utilizou-se o seguinte programa de amplificação: 3 ciclos 97°C 1 min., 55°C 1 min., 72°C 2 min.; 32 ciclos 94°C 45 seg., 55°C 1 min., 72°C 2 min.; 1 ciclo 72°C 10 min.; 4°C indeterminado.

C. 2. 3 – “Nested PCR” para a região *Gag*

A segunda etapa de amplificação do gene *gag* empregou:

Água Milli-Q®	68,5µL
Tampão de PCR 10X c/ MgCl ₂ 15mM	16,7µL
Mistura de dNTPs 25mM	0,8µL
H1Gag1584 10 pmol	4,0µL
g17 10pmol	4,0µL
Taq DNA polimerase 5U	1,0µL
Produto da 1ª etapa de amplificação	5,0µL
Volume final	100µL

Os iniciadores H1Gag1584 (5'-AAAGATGGATAATCCTGGG-3') e g17 (5'-TCCACATT TCCAACAGCCCTTTTT-3') amplificam um fragmento de cerca de 460pb correspondente à região que codifica desde o aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7, no genoma do isolado ELI. O par de iniciadores HGHMA822 (5'-GCTTTCAGCCCAGAAGT AATACC-3') e g17 foi utilizado na segunda PCR quando a amostra não foi amplificada pelos iniciadores anteriormente descritos. A amplificação em termociclador foi realizada com a seguinte programação: 1 ciclo 94°C 2 min.; 35 ciclos 94°C 30 seg., 50°C 30 seg., 72°C 90 seg.; 1 ciclo 72°C 7 min.; 4°C indeterminado.

C. 2. 4 – PCR para Cepas de Referência / Plasmídeos

As seqüências de referência (*env* e *gag*) inseridas em plasmídeos de DNA, na concentração de 10ng/µL em Tris HCl 10mM (pH 7,4) e EDTA 0,1mM (pH 8,0), foram amplificadas

com os iniciadores empregados na “Nested PCR”. Para a HMA env utilizamos cepas de referência representando os subtipos genéticos mais prevalentes no Brasil: B (B1, B2, B3), C (C1, C2), D (D1, D3) e F (F1, F2). Para a subtipagem do HIV-1 na região do gene *gag*, utilizamos as cepas de referência B (B1, B2, B3), C (C1, C2), D (D1, D2) e F (F1, F2).

C. 2. 5 – Eletroforese em gel de Agarose 1%

O produto da segunda etapa de amplificação das amostras-testes e da amplificação dos plasmídeos eram aplicados no gel de agarose 1% (*GIBCO – Life Technologies, USA*) em uma mistura contendo 5µL de material amplificado + 2µL do corante marcador da corrida (sacarose 40% e Xileno Cianol 0,2%) + 5µL de água Milli-Q®. Em cada gel, era utilizado um padrão de peso molecular (*100bp DNA Ladder, GIBCO – Life Technologies, USA*). A corrida eletroforética era realizada em cuba horizontal (*Horizon 11-14 and 25-25 Gel Electrophoresis Apparatus, GIBCO – Life Technologies, USA*) durante 1hora a 100V (*Bio-RAD Power Pac 300, USA*), em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA, *GIBCO – Life Technologies, USA*) com Brometo de Etídio 0,005% (50µL/L de tampão). O gel era analisado sob luz ultravioleta a 310nm de comprimento de onda (*FOTO/Prep I Preparative DNA Transilluminator – Fotodyne; Hartland, USA*) e a visualização de bandas fluorescentes, em torno de 500pb do padrão de peso molecular, era interpretada como resultado positivo na amplificação.

C. 3. Análise da Mobilidade de Heteroduplex (HMA)

A HMA é uma técnica de triagem molecular que permite a identificação do subtipo viral do HV-1 mediante análise da mobilidade eletroforética de híbridos de DNA em gel de

poliacrilamida 5%. Os híbridos são gerados a partir da mistura de seqüências de DNA do HIV-1 de amostras-testes com seqüências de DNA de cepas de referência (cepas de subtipo conhecido). Inicialmente a mistura é aquecida a 94°C, promovendo a desnaturação das duplas fitas de DNA, seguida de rápido resfriamento, que provoca o reanelamento das fitas. No reanelamento há a formação de “homoduplex”, representados pela recomposição das duplas fitas originais, e dos “heteroduplex” ou híbridos de DNA, formados pelo anelamento de fitas heterólogas. Quanto maior a homologia genética entre as seqüências de DNA reaneladas, maior a capacidade de migração no gel. Portanto os “homoduplex” exibem maior migração eletroforética que os “heteroduplex”. Os “heteroduplex” com maior homologia na seqüência de nucleotídeos exibem maior mobilidade eletroforética que aqueles geneticamente mais distantes. Assim, analisando-se as mobilidades eletroforéticas dos diferentes híbridos é possível identificar o subtipo do HIV-1 na amostra-teste.

C. 3. 1 – Hibridização

Alíquotas de 5µL da amostra + 1,1µL de tampão de anelamento 10X (NaCl 1M; Tris HCl 100mM pH 7,8; EDTA 20mM) eram dispensadas em tubos contendo as diferentes cepas de referência (5µL). Como controle da diversidade intrínseca de cada amostra, esta era analisada também individualmente. A mistura era aquecida a 94°C durante 2 minutos e imediatamente resfriada em banho de gelo por 10 minutos. A mistura era acrescida de 3µL do corante marcador da corrida e então aplicada no gel de poliacrilamida.

C. 3. 2 – Preparo do gel de Poliacrilamida 5%

Solução estoque de Acrilamida /Bisacrilamida	8,3ml
TBE 10X (Tris-Borato-EDTA 10X)	5,0ml

APS (Persulfato de Amônia)	50mg
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -TetraMethylEthyleneDiamine)	33µl
Água Milli-Q® qsp	50ml

A solução estoque de Acrilamida/Bisacrilamida era preparada a 30% em Acrilamida e 0,8% em Bisacrilamida, em água Milli-Q®. O TBE 10X concentrado era preparado a partir de ácido bórico 5,5%, Tris-base 10,8%, 40mL de EDTA 0,5M pH 8,0 e água Milli-Q® suficiente para 1000mL. Para a subtipagem genética em *gag*, o gel era preparado com Uréia 20% (*Invitrogen –Life Tech, CA, USA*). Amostras apresentando perfis de migração eletroforética com subtipos B e D semelhantes na HMA *gag* eram analisadas em gel de poliacrilamida a 30% em uréia. O gel era polimerizado durante 60 minutos em placas de vidro de 16cm de altura X 19,5cm de largura (placa anterior) e 19cm de altura X 19,5cm de largura (posterior), espaçadores de 1,5mm de espessura e pentes com 20 dentes.

C. 3. 3 – Identificação do Subtipo Viral

A eletroforese era realizada em cuba vertical (*VI6-2 Vertical Gel Apparatus, GIBCO – Life Technologies, USA*) durante 2,5 horas a 250V (*Bio-RAD Power Pac 300, USA*) em TBE 1X. Para HMA *gag* em gel de poliacrilamida com 30% em uréia e HMA *env* com amostras amplificadas com o par de iniciadores ES7/ES8 era desenvolvida corrida eletroforética durante 3 horas, a 250V. Na HMA *gag* era realizada uma pré-corrida de 15 minutos a 250V antes da aplicação das amostras, conforme orientação do protocolo. O gel era corado através da imersão em TBE 1X com Brometo de Etídio 0,005% (50µL/L), durante 20 minutos. A mobilidade dos heteroduplex era analisada sob luz ultravioleta a 310nm de

comprimento de onda (*FOTO/Prep I Preparative DNA Transilluminator – Fotodyne; Hartland, USA*). Os resultados das corridas eletroforéticas eram registrados com câmera digital (*DC 290 Zoom KODAK Digital Camera, Rochester, NY, USA*), as fotos eram analisadas com o programa – *ID Image Analyses Software Windows Limited Edition, version 3.5, NY, USA* e arquivadas no Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase, IPTSP/UFG.

D. Análise Estatística

O banco de dados do estudo foi construído com o programa EpiData 3.0 (*The EpiData Association, Odense, Dinamarca*). Foi utilizado o programa EPI Info 6.04 (*CDC Epidemiology Program Office, Atlanta, USA & WHO Global Programme on AIDS, Geneva, Switzerland*) para cálculos de frequências, médias e medianas das principais variáveis. Análise exploratória foi utilizada para os valores de contagens de LTCD4⁺ e carga viral plasmática no momento do estudo. Gráfico de caixas foi empregado para representar as distribuições dos valores de LTCD4⁺ e carga viral dos diferentes grupos de pacientes. Valores de carga viral acima ou abaixo do limite de detecção da técnica foram assumidos como os valores máximo ou mínimo, respectivamente, para fins de cálculos da mediana. O programa SPSS 8.0 (“Statistical Package for Social Sciences” - USA) foi utilizado nas análises.

V – RESULTADOS

Foram estudadas amostras do HIV-1 de 85 pacientes, divididos em três grupos: 29 pares de mães HIV⁺/aids - filhos infectados pela via vertical (Grupos A e B, respectivamente) e 27 crianças e adolescentes HIV⁺/aids, na maioria órfãos de mães que faleceram de causas relacionadas a aids (Grupo C).

A. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Grupo A - Mães HIV⁺/aids

Este grupo incluiu mulheres HIV⁺/aids diagnosticadas ainda jovens, a maioria delas, 19/23 (82,6%), com baixo nível de escolaridade (4-5 anos) e grande parte (67,9%) sem ocupação definida no mercado de trabalho. A grande maioria das mães (93,1%) foi diagnosticada tardiamente, após o parto do filho avaliado neste estudo. A Tabela I descreve as principais características deste grupo.

O contato heterossexual representou a via predominante de exposição ao HIV-1 para as pacientes. Em 6/28 casos foram observados relatos de outros fatores de risco para infecção pelo HIV-1, além do sexual: 1 caso de uso de drogas injetáveis e história de hemotransusão; 1 caso com relato de uso de drogas injetáveis e 4 casos com história de hemotransusão. Foram considerados comportamentos de risco para as mães: múltiplos parceiros, parceiro sexualmente promíscuo, parceiro HIV⁺/aids e parceiro usuário de drogas injetáveis. Para 58% das mães (17/29), a existência de parceiro sexual sabidamente

HIV⁺/aids foi o relato mais comum. Entre os 17 parceiros HIV⁺/aids, 11 (64,7%) eram usuários de drogas injetáveis. Grande parte das pacientes (51,7%) tinha parceiro fixo e 6,9% eram viúvas de parceiros que faleceram de aids.

Tabela I – Características epidemiológicas do grupo de mães HIV⁺/aids (n=29).

Mães (n=29)	n (%)
Idade atual em anos	
mediana (variação)	28 (20-41 anos)
Número de Gestações	
1	07 (24)
≥2	22 (76)
Quimioprofilaxia para TV*	
uso de AZT gestação/parto	02 (6,9)
sem profilaxia	27 (93,1)
Categoria de Exposição	
sexual	28 (96,6)
ignorado	01 (3,4)
Procedência	
Goiânia e cidades do entorno	16 (55,2)
interior de Goiás	13 (44,8)

* transmissão vertical

A maioria das pacientes (55,2%) era procedente da capital Goiânia ou cidades do entorno (Aparecida de Goiânia e Trindade) e o restante era proveniente de diferentes cidades do interior do Estado, dispersas pelas distintas regiões: Central (02 casos), Noroeste (02 casos), Sul (03 casos) e Sudoeste (06 casos).

Grupo B - Filhos de Mães HIV⁺/aids infectados pela via Vertical

Este grupo era composto de 29 crianças HIV⁺/aids com mediana de idade de 5 anos e predomínio do sexo masculino (Tabela II). Ao diagnóstico, a mediana da idade destas crianças era de 1 ano, variando de menos de 1 ano completo a 9 anos de idade. A maioria das crianças nasceu por parto normal e apenas três pacientes (10,3%) tinham relato de intercorrência durante o parto, representada por sangramento ou bolsa rota por tempo prolongado. O peso das crianças ao nascimento variou de 2.245 a 4.000 gramas, com mediana de 3.100 gramas. A grande maioria dos pacientes (93,1%) nasceu no Estado de Goiás; um paciente nasceu em Manaus-AM e outro nasceu em Sobradinho-DF.

Grupo C - Crianças/Adolescentes infectados pelo HIV-1

As crianças/adolescentes deste grupo (n=27) tinham mediana de idade de 8 anos. No momento do diagnóstico, apresentavam entre menos de 1 ano completo e 12 anos de idade (mediana de 2 anos). A maioria foi infectada por transmissão perinatal do HIV-1. Uma criança hemofílica foi infectada por sangue/hemoderivados contaminados pelo HIV-1, provavelmente em março de 1990 na cidade de Anápolis/GO. Um menina de 9 anos, filha de mãe soronegativa para o HIV-1 e sem história de hemotransfusão, não tinha categoria de exposição esclarecida. A maioria das crianças/adolescentes do grupo (85,2%) nasceu em Goiás. Quatro de 27 pacientes nasceram em diferentes Estados do país: 01 do Tocantins, 01 de São Paulo, 01 do Espírito Santo e 01 do Maranhão. Na Tabela II estão descritas as principais características epidemiológicas destes pacientes.

Tabela II – Características epidemiológicas das crianças/adolescentes HIV⁺/aids (n=56).

	Filhos de Mães HIV ⁺ /aids (n=29)		Crianças/Adolescentes HIV ⁺ /aids (n=27)		<i>p</i> [*]
	n	%	n	%	
Idade Atual em anos					
Mediana (variação)	5 (1-12)		8 (2-13)		
Sexo					
masculino	19	65,5	14	51,8	0,127
feminino	10	34,5	13	48,2	
Tipo de parto					
normal	14	53,8	13	59,1	0,211
cesariana	12	46,2	09	40,9	
AZT ao nascimento					
sim	02	6,9	02	7,4	0,211
não	27	93,1	25	92,6	
Aleitamento materno					
sim	20	87	16	94,1	0,329
não	03	13	01	5,9	
Exposição					
perinatal	29	100	25	96,2	0,473
parenteral	-	-	01	3,8	
ignorado	-	-	01	01	
Procedência					
Goiânia/entorno	14	48,3	15	55,6	0,146 ^a
interior de Goiás	13	44,8	08	29,6	0,219 ^b
outro Estado	02	6,9	04	14,8	

* Teste Exato de Fisher.

a – Valores de *p* para a comparação entre as variáveis Goiânia/entorno e interior de Goiás.

b – Valores de *p* para a comparação entre as variáveis Goiás (Goiânia/entorno+interior) e outro estado.

Embora muito semelhantes, os Grupos B e C foram mantidos assim discriminados a fim de permitir análises sobre a diversidade genotípica do HIV-1 nos pares de transmissão materno-infantil (Grupos A e B).

B. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, IMUNOLÓGICAS E VIRAIS

Grupo A - Mães HIV⁺/aids

No grupo de mães HIV⁺/aids, 23/29 (79,3%) eram casos de aids. As manifestações clínicas associadas à infecção pelo HIV-1 mais comuns neste grupo foram a monilíase oral e pneumopatias (pneumonia por *Pneumocystis carinii*, pneumonias bacterianas, tuberculose).

No momento do estudo, a mediana das contagens de LTCD4⁺ das pacientes era de 428 células/ μ L, variando entre 124 e 908 células/ μ L. Apenas 01/28 paciente apresentava contagens de CD4⁺ compatíveis com imunodepressão (LTCD4⁺ < 200 cels/ μ L). Duas de 29 pacientes (6,9%) não tinham nenhum registro de avaliação do número de LTCD4⁺. A Figura 1 apresenta a distribuição das contagens de LTCD4⁺ deste grupo de pacientes.

A mediana da viremia plasmática das pacientes era de 2,8 log₁₀ no momento do nosso estudo, variando de 1,7 a 5,2 log₁₀ (Figura 2). Para 04/29 pacientes (3,8%) não havia registros de carga viral disponíveis. A maioria das pacientes (69%) estava sob terapia anti-retroviral combinada no momento do estudo.

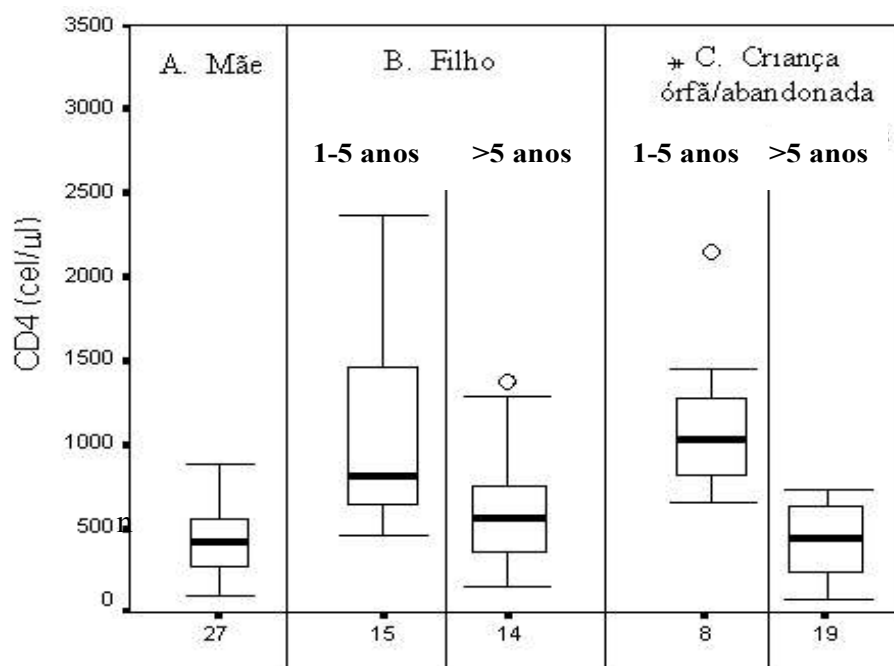


Figura 1 – Gráfico de caixas da distribuição das contagens de LTCD4⁺ segundo os grupos de pacientes analisados (n=83), no momento do estudo. Os traços horizontais superior e inferior correspondem, respectivamente, ao maior e menor valores da distribuição. As caixas representam o percentil 50 e as linhas atravessando as caixas correspondem às medianas. Os valores díspares são assinalados com círculos.

As crianças na faixa etária entre 1 e 5 anos de idade deste grupo (51,7%) apresentavam mediana das contagens de LTCD4⁺ de 900 células/μL (variação de 505 – 2.640 cels/μL), sendo que 53,3% apresentavam contagens de LTCD4⁺ abaixo do esperado para a faixa etária (valores de referência para esta faixa etária - LTCD4⁺ > 1.000 cels/μL). Entre as crianças maiores de 5 anos de idade, 35,7% apresentavam contagens de CD4⁺ abaixo do esperado (valores de referência – LTCD4⁺ > 500 cels/μL) e uma tinha contagem abaixo de 200 células/μL, valor este compatível com imunodepressão. A mediana da contagem de LTCD4⁺ destas crianças era de 622 células/ μL variando entre 176 e 2.355 células (Figura 1).

A mediana da carga viral plasmática das crianças com idade entre 1 e 5 anos de idade era de 4,2 $\log_{10}$ (variando de 1,7 a 5,7 $\log_{10}$) e entre as com 6 anos ou mais, 3,7 $\log_{10}$ (variando de 1,7 a 5,4 $\log_{10}$) (Figura 2). A grande maioria destes pacientes (96,6%) estava sob terapia anti-retroviral combinada e apenas uma criança não havia iniciado a terapia até o nosso estudo.

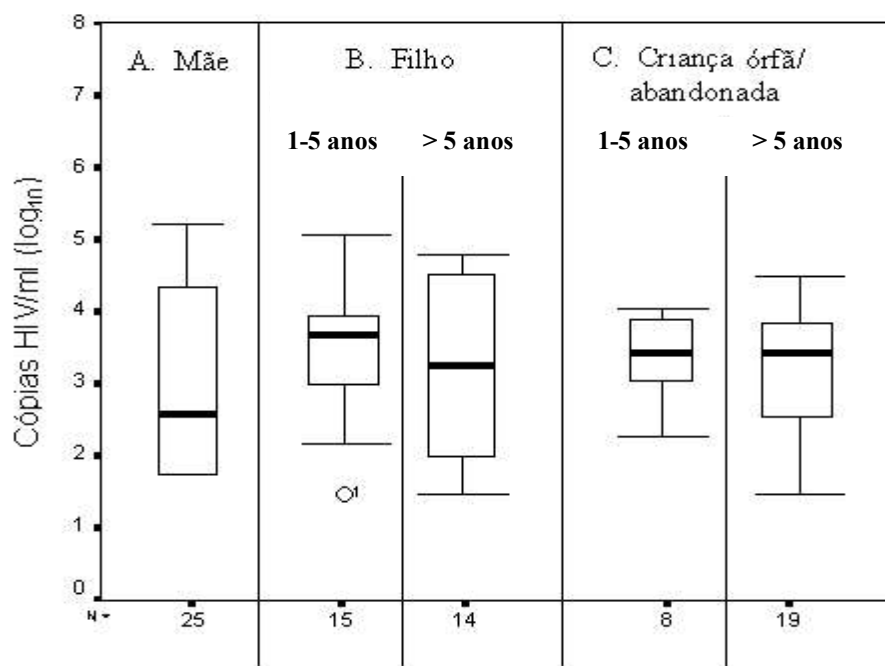


Figura 2 – Gráfico de caixas da distribuição dos valores de viremia plasmática segundo os grupos de pacientes analisados (n=81). Os traços horizontais superior e inferior correspondem, respectivamente, ao maior e menor valores da distribuição. As caixas representam o percentil 50 e as linhas atravessando as caixas correspondem às medianas.

Grupo C - Crianças/Adolescentes infectados pelo HIV-1

A maioria destes pacientes (85,2%) era caso de aids. As crianças na faixa etária entre 1 e 5 anos (29,6%) apresentavam contagens de LTCD4⁺ variando entre 775 e 2.395 células/ μ L, com mediana dentro dos valores normais (1.150 cels/ μ L). Três crianças (37,5%) apresentavam contagens de LTCD4⁺ abaixo do esperado para a faixa de idade. Entre as crianças maiores de 5 anos, embora a mediana da contagem de LTCD4⁺ fosse de 603 células/ μ L (variação de 82 – 1.160 cels/ μ L), considerado valor normal esperado para a faixa etária, 47% destas crianças tinham contagens abaixo deste valor e dois casos (7,4%) indicavam quadros de imunodepressão (LTCD4⁺ < 200 cels/ μ L) (Figura 1).

A mediana da viremia plasmática nos dois subgrupos de crianças era de 3,9 log₁₀, variando de 2,6 a 4,6 log₁₀, nos pacientes com idade entre 1-5 anos, e de 1,7 a 5,0 log₁₀, naqueles acima dos 5 anos (Figura 2). No momento do estudo, 25/27 (92,6%) estavam sob tratamento anti-retroviral em esquemas combinados.

Observamos que as pneumopatias, principalmente as pneumonias bacterianas de repetição, foram a manifestação clínica mais comum entre todas as crianças/adolescentes. Infecções

oportunistas graves também foram relatadas, como pneumonia por *P. carinii*, tuberculose pulmonar e extrapulmonar, toxoplasmose ocular e monilíase esofagiana.

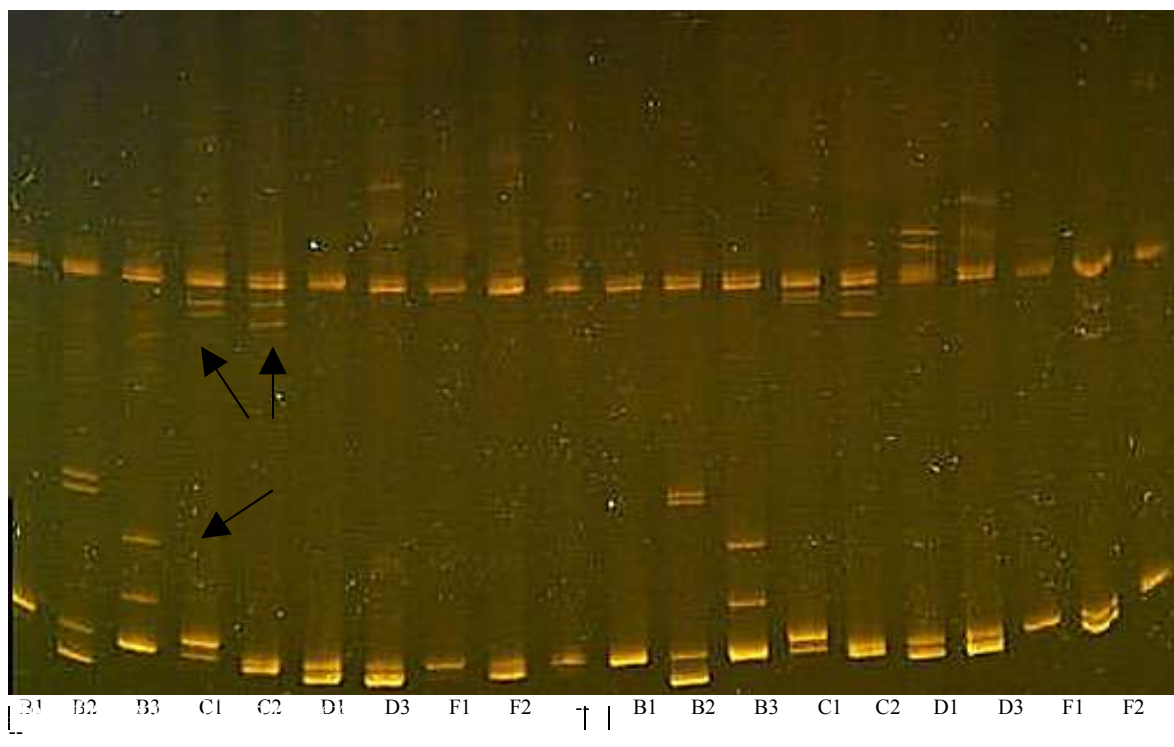
C. DIVERSIDADE GENOTÍPICA NO GENE *ENV* DO HIV-1

Foram analisadas 85 amostras de DNA proviral extraído de células mononucleares periféricas de pacientes infectados pelo HIV-1, para a verificação do subtipo viral na região C2-V3-C3 do gene *env* do HIV-1. Em 97,6% das amostras (83/85) foi possível amplificar a região do gene *env* empregando os pares de iniciadores ED5/ED12 e ED31/ED33. Para os casos negativos, foi possível amplificar uma das amostras com o par de iniciadores ES7/ES8, utilizados na segunda etapa de amplificação.

Identificamos o subtipo do HIV-1 na região *env* em 83/84 amostras testadas por HMA frente ao painel de cepas de referência. Em 01/84 das amostras analisadas, embora tenhamos obtido material amplificado na etapa de PCR, conforme visualização de banda após a eletroforese em gel de agarose, não foi possível determinar o subtipo do HIV-1 por HMA *env*. Todas as amostras identificadas (97,6%) pertenciam ao subtipo B do HIV-1.

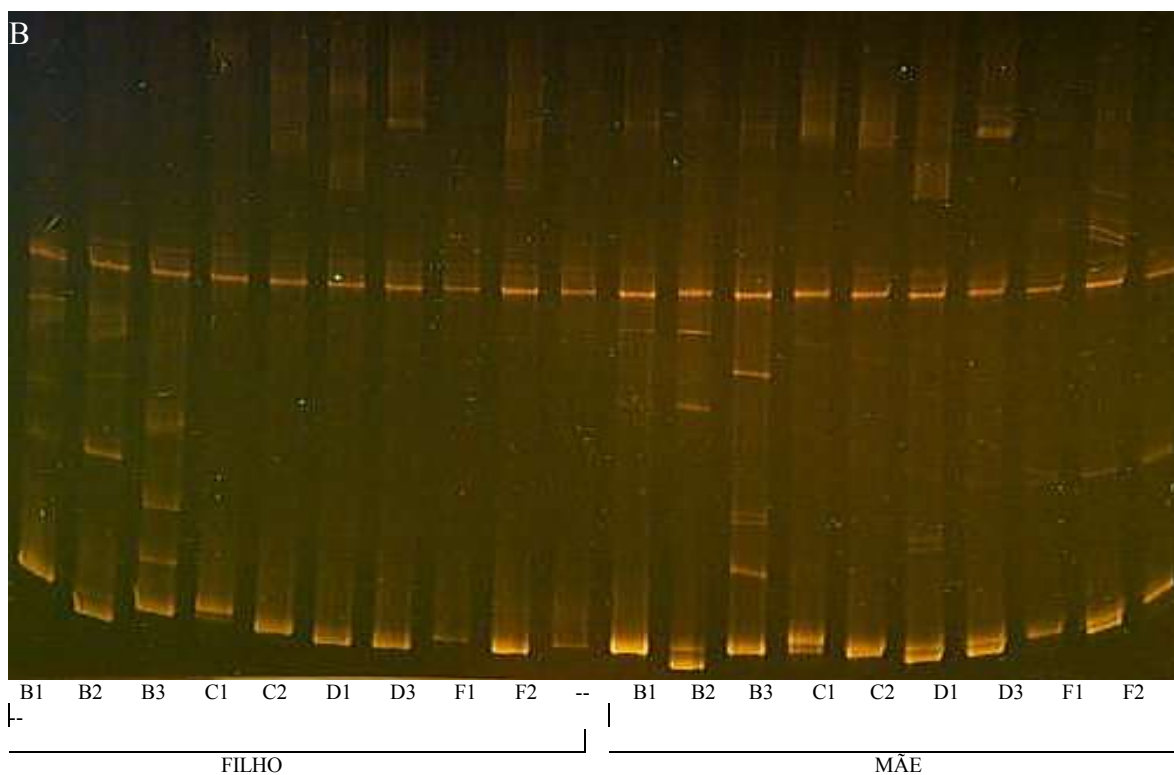
Nos pacientes dos grupos A e B (pares mães/filhos), comparamos os perfis eletroforéticos das amostras do HIV-1 em gel de poliacrilamida 5%. As amostras de mãe e filho foram aplicadas em uma mesma placa, permitindo comparação dos perfis de migração eletroforética. Grande parte das amostras de mães e filhos analisadas apresentou perfis

eletroforéticos semelhantes (52%), com mesmo subtipo do HIV-1 nos dois membros (Figura 3A). Entretanto, num subgrupo de pares mães/filhos, também com o mesmo subtipo do HIV-1, observamos perfis eletroforéticos distintos (48%) (Figura 3B). Em 23,8% das amostras foi necessária a realização de uma nova análise para a identificação do subtipo viral.



FILHO

MÃE



Figuras 3A e B – HMA env com amostras do HIV-1 de pares filho/mãe exibindo perfis de migração eletroforética semelhantes (A) e diferentes (B), em gel de poliacrilamida 5% corado com brometo de etídio. As bandas alinhadas na região próxima ao meio do gel são DNA de fita simples; as bandas alinhadas na extremidade inferior representam os homoduplex e as dispersas pelo gel são heteroduplex, gerados pelo pareamento de DNA da amostra-teste com as diferentes cepas de referência.

D. DIVERSIDADE GENOTÍPICA NO GENE *GAG* DO HIV-1

As 85 amostras analisadas quanto à diversidade genética do HIV-1 no gene *env* foram testadas também em *gag*, na região que codifica desde o aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7. Utilizando-se os pares de iniciadores H1P202/H1G777 e H1Gag1584/g17, obtivemos amplificação em 82/85 amostras (96,5%). Duas amostras foram amplificadas com os iniciadores alternativos (HGHMA822 e g17).

Na grande maioria das amostras (83/85; 97,6%) o subtipo do HIV-1 foi identificado na região de *gag*, indicando predominância do subtipo B (70/83; 84,3%). Outros subtipos do HIV-1 também foram encontrados na região de *gag*: 01 par mãe/filho (2,4%) com subtipo C (Figura 4) e 09 amostras (10,8%) (04 pares mães/filhos e 01 criança HIV⁺) com subtipo F (Figura 5). Seis de 84 amostras (7,1%) apresentaram perfil eletroforético compatível com B/D e foram testadas em gel de poliacrilamida a 30% em uréia, sendo que 02 amostras (mãe e filho) mantiveram o perfil B/D e 04 foram identificadas como subtipo B. Dezesesseis das 84 amostras (19%) que apresentaram resultado inconcluso por HMA tiveram que ser analisadas novamente, sendo que apenas 01/84 amostra permaneceu não identificada.

Nos pares mães e filhos com um mesmo subtipo do HIV-1 na região de *gag*, observamos perfis eletroforéticos semelhantes em 65,4% das amostras (Figura 6A) e 34,6% com perfis eletroforéticos diferentes (Figura 6B).

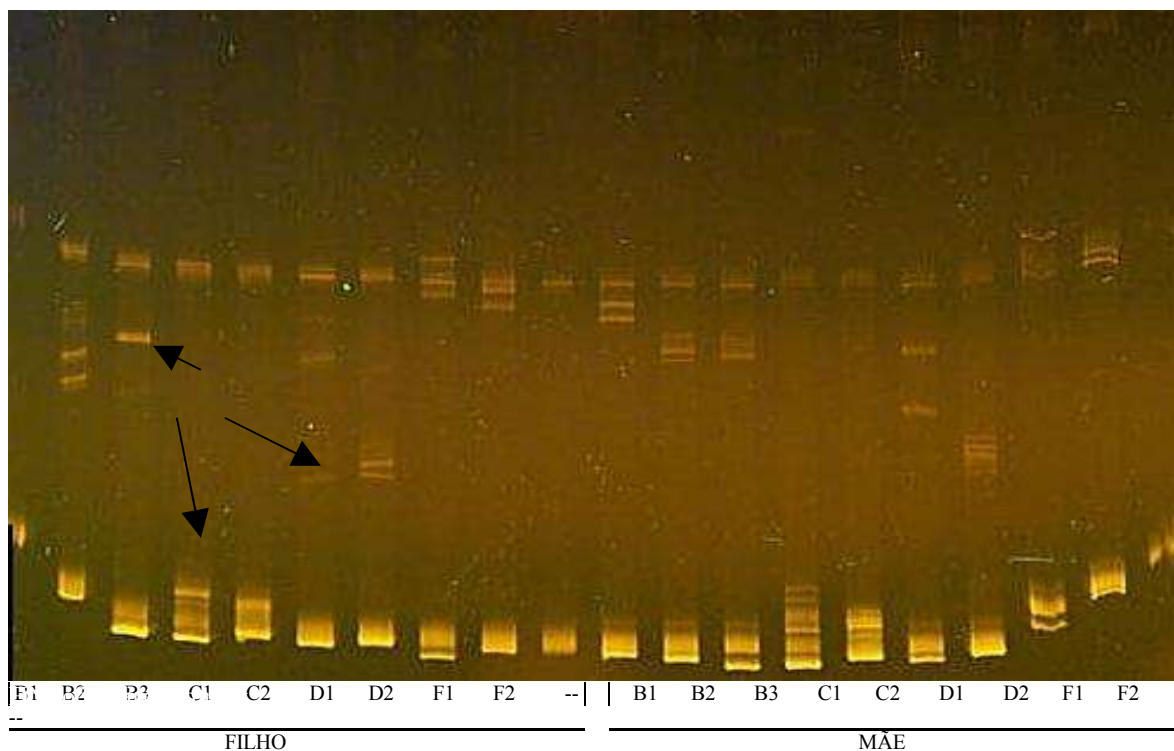


Figura 4 – HIV-1 do subtipo C, identificado por HMA gag em gel de poliacrilamida 5% corado com brometo de etídio em amostras do HIV-1 de par filho/mãe. As bandas alinhadas na região próxima ao meio do gel são DNA de fita simples; as bandas alinhadas na extremidade inferior representam os homoduplex e as dispersas pelo gel são heteroduplex.

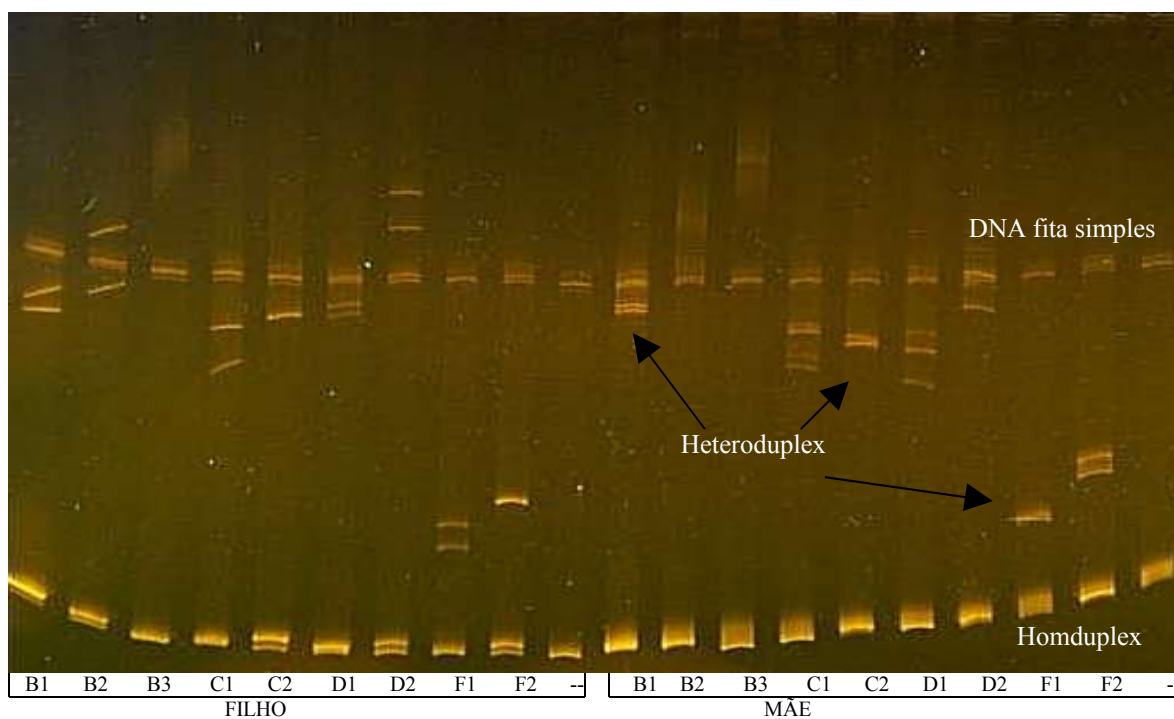
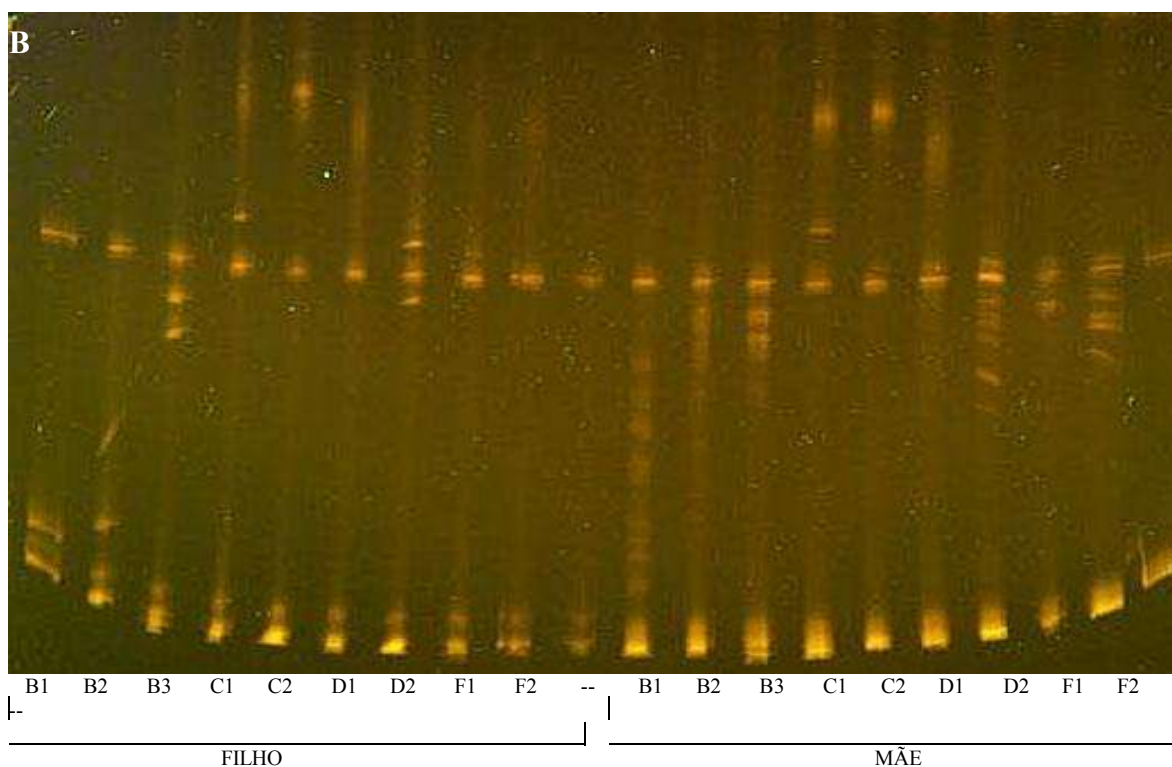
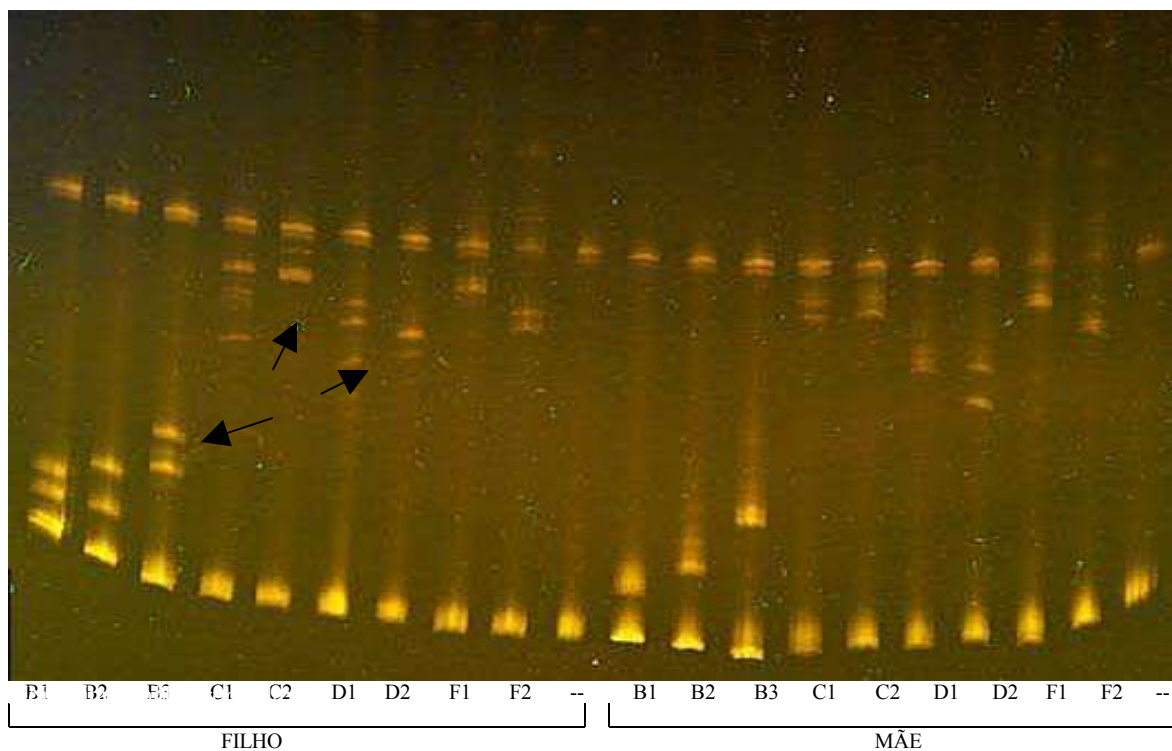


Figura 5 – HIV-1 do subtipo F, identificado por HMA gag em gel de poliacrilamida 5% corado com brometo de etídio em amostras do HIV-1 de par filho/mãe. As bandas alinhadas na região próxima ao meio do gel são DNA de fita simples; as bandas alinhadas na extremidade inferior representam os homoduplex e as dispersas pelo gel são heteroduplex.



Figuras 6A e B – HMA *gag* com amostras do HIV-1 de pares filho/mãe exibindo perfis de migração eletroforética semelhantes (A) e diferentes (B), em gel de poliacrilamida 5% corado com brometo de etídio. As bandas alinhadas na região próxima ao meio do gel são DNA de fita simples; as bandas alinhadas na extremidade inferior representam os homoduplex e as dispersas pelo gel são heteroduplex, gerados pelo pareamento de DNA da amostra-teste com as diferentes cepas de referência.

E. RESUMO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA EM *ENV/GAG*

Todas as amostras de HIV-1 estudadas foram identificadas em pelo menos uma região do genoma viral, *env* ou *gag*. Oitenta e uma amostras (95,3%) foram identificadas simultaneamente nas duas regiões do genoma do HIV-1 investigadas, *env* e *gag*, sendo 28 provenientes de mães HIV⁺/aids e 53 de crianças/adolescentes infectados.

O subtipo B^{*env*}/B^{*gag*} foi o predominante, presente em 84% (68/81) das amostras classificadas por HMA. As outras 13/81 amostras (16%) apresentaram um padrão genotípico híbrido, com subtipos diferentes detectados em *env* e em *gag*: obtivemos 09/13 amostras com perfil B^{*env*}/F^{*gag*} (04 pares mães/filhos HIV⁺/aids e 01 criança órfã); 02/13 amostras B^{*env*}/C^{*gag*} e 02/13 B^{*env*}/BD^{*gag*}, obtidos em um par mãe/filho cada. Todas as amostras de mães e filhos HIV⁺/aids apresentaram o mesmo subtipo, em *env* e em *gag*. As amostras com perfil genotípico híbrido tiveram os resultados confirmados. A Tabela III apresenta os resultados da subtipagem por HMA.

Amostras de HIV-1 com perfis genéticos puros e híbridos foram analisadas quanto a diversas variáveis, para investigar possível associação. Não observamos nenhuma correlação significativa entre padrão genético viral e categoria de exposição ao HIV-1, idade, sexo ou condição clínica dos pacientes.

Foi observada correlação estatisticamente significativa ($p=0,049$) entre subtipo viral e procedência dos pacientes. As amostras com perfil genético híbrido eram, na grande maioria (92,3%), de pacientes procedentes do interior do estado de Goiás. Apenas 01/09

amostra com perfil B^{env}/F^{gag} era de paciente de Goiânia-GO. Todas as amostras de pacientes provenientes de outros estados (Amazonas, Tocantins, Maranhão, Espírito Santo, São Paulo e Distrito Federal) foram identificadas como subtipo B nas regiões *env* e *gag*.

Tabela III - Diversidade do HIV-1 nas regiões *env* e *gag* do genoma viral entre os pacientes estudados (n=81).

Diversidade	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Total Geral
<i>env/gag</i>	(n=28*)	(n=29)	(n=24**)	(n=81)
B ^{env} /B ^{gag}	22 (78,6%)	23 (79,3%)	23 (95,8%)	68 (84%)
B ^{env} /F ^{gag}	04 (14,3%)	04 (13,8%)	01 (4,2%)	09 (11%)
B ^{env} /C ^{gag}	01 (3,6%)	01 (3,4%)	---	02 (2,5%)
B ^{env} /BD ^{gag}	01 (3,6%)	01 (3,4%)	---	02 (2,5%)

* 01 amostra não amplificada por PCR na região de *gag*.

** 01 amostra não amplificada em *env* e 02 com subtipo indefinido - HMA *env* (01) e HMA *gag* (01).

No grupo de mães, todas as amostras com perfil genotípico híbrido (6/13) relacionavam-se a exposição heterossexual. Entretanto, em 02/04 casos de infecção com HIV-1 B^{env}/F^{gag} havia relato de uso de drogas injetáveis pelos parceiros sexuais das pacientes. Em um destes casos, havia ainda história de uso de drogas ilícitas pela paciente, como cocaína, merla, maconha. Nos outros 02/04 casos, havia relato de múltiplos parceiros sexuais por parte das pacientes. Nos casos com HIV-1 B^{env}/C^{gag} e B^{env}/BD^{gag} não encontramos relatos de comportamentos de risco.

VI – DISCUSSÃO

Para entendermos o mapeamento molecular do HIV-1 no Brasil devemos considerar a grande extensão territorial do país e as enormes diferenças regionais observadas entre suas cinco regiões geográficas. Além disto, diante da concentração de dados sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 nas regiões sul e sudeste, esforços devem ser concentrados na caracterização genética do HIV-1 em outras regiões brasileiras. Estes dados são extremamente importantes para o monitoramento da dinâmica da introdução e disseminação de diferentes formas genéticas do HIV-1 no país. Embora as implicações clínicas da diversidade do HIV-1 sejam desconhecidas, os diferentes subtipos têm impacto para os testes de diagnóstico e de detecção da viremia plasmática e podem ser importantes para o desenvolvimento de vacinas (UNAIDS 1997b, Gaschen et al. 2002, Morgado et al. 2002, Thomson et al. 2002b).

Nosso estudo avaliou a diversidade genotípica do HIV-1 em 85 pacientes recrutados no centro de referência regional para diagnóstico e tratamento da infecção pelo HIV-1, Hospital Dr. Anuar Auad/HDT/SUS de Goiânia/GO. Os pacientes foram categorizados em três grupos: pares de mães HIV⁺/aids e filhos infectados pela via vertical (Grupos A e B, respectivamente) e crianças/adolescentes infectados (Grupo C). O subtipo do HIV-1 nas regiões *env* e *gag* do genoma viral foi identificado empregando-se a Análise da Mobilidade de Heteroduplex (“Heteroduplex Mobility Analysis” - HMA *env* e HMA *gag*).

Embora o seqüenciamento seja considerado o “padrão ouro” para a caracterização de genomas virais, esta metodologia é laboriosa e cara, o que limita sua aplicação no monitoramento da distribuição dos subtipos de HIV-1 em países em desenvolvimento. A Análise da Mobilidade de Heteroduplex - HMA - para a região *env*, descrita no início da

década de 90, surgiu como uma importante ferramenta alternativa para a subtipagem do HIV-1 (Delwart et al. 1993, Heyndrickx et al. 1998). A HMA é considerada uma técnica sensível, confiável, de menor custo operacional e relativamente aplicável em larga escala. Além disso, tem sido implementada com sucesso pela UNAIDS em diversos países em desenvolvimento para avaliar a diversidade genética do HIV-1 (Sawadogo et al. 2003). Nosso estudo mostrou a aplicabilidade desta técnica para triagem molecular do HIV-1, em um contexto no qual o seqüenciamento automatizado ainda não está disponível.

Os nossos resultados da triagem molecular do HIV-1 por HMA env e HMA gag em mães, crianças e adolescentes HIV⁺/aids indicaram nítida predominância do HIV-1 subtipo B em ambas regiões, sendo que 84% das amostras analisadas apresentaram o padrão B^{env}/ B^{gag}. HIV-1 subtipo B foi o único subtipo “não-híbrido” identificado entre estes pacientes. Desde meados da década de 90, vários estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil em pacientes das regiões norte, nordeste e em especial da região sudeste indicam predominância do subtipo B, responsável por ~85% dos casos de infecção pelo HIV-1 (Morgado et al. 1994, Galvão-Castro et al. 1996, Morgado et al. 1998, Bongertz et al. 2000, Vicente et al. 2000, Morgado et al. 2002, Gadelha et al. 2003).

A maior prevalência do subtipo B no Brasil pode indicar vantagem seletiva ou um efeito fundador, já que o subtipo B parece ter sido o primeiro introduzido no país. Apesar do HIV-1 subtipo B predominar em países industrializados como os EUA e em países do oeste europeu, em escala global representa apenas 12% dos isolados (Takebe et al. 2004).

Uma variante genética do subtipo B denominada B⁺, que difere do subtipo B clássico por apresentar no topo da alça V3 da gp120 o motivo GWGR, ao invés de GPGR, foi descrita

no Brasil no início da década de 90 (Potts et al. 1993, Morgado et al. 1994). Esta variante B” do HIV-1 foi identificada pela primeira vez no estado de Goiás em 1998 em um grupo de crianças infectadas pela via vertical (Álvares Júnior 1999).

Em decorrência da possível importância da região *env*, que codifica a gp120, para o desenvolvimento de vacinas, os primeiros estudos enfocaram a diversidade do HIV-1 nesta região. Porém mais recentemente, outras regiões do genoma do HIV-1 como *gag*, *pol* e *nef* têm sido também investigadas por grupos brasileiros (Guimarães et al. 2002b, Gadelha et al. 2003, Machado et al. 2004a e b, Pereira et al. 2004).

O HIV-1 do grupo M, responsável pela pandemia global de aids apresenta vários subtipos: A-D, F-H, J e K. Além disto, 16 formas recombinantes intersubtipos (“CRFs - Circulating Recombinant Forms”) responsáveis por microepidemias foram descritas. Mais recentemente um número crescente de formas recombinantes intersubtipos de HIV-1 tem sido descritos. Atualmente considera-se que as chances de detecção de novas formas híbridas do HIV-1 sejam maiores do que as chances de se descrever formas puras ainda desconhecidas (Los Alamos 2005). Neste contexto, a descrição de HMA para outra região do genoma viral, *gag*, representa uma possibilidade de se estender a subtipagem por HMA para duas regiões genéticas distintas do HIV-1, *env* e *gag* (Heyndrickx et al. 2000).

Segundo Heyndrickx e colaboradores (2000), a realização simultânea de HMA para as regiões *env* e *gag* apresenta a grande vantagem de possibilitar a identificação de genomas recombinantes do HIV-1. Ainda, a detecção de HIV-1 com perfil genotípico híbrido, ou seja, apresentando subtipo na região *env* diferente do subtipo da região *gag*, é fortemente

sugestiva de recombinação intersubtipos. Entretanto, nestes casos se pode descartar a possibilidade de co-infecção com diferentes subtipos do HIV-1 e estudos de seqüenciamento e análise filogenética são indicados (Nájera et al. 2002, Thomson et al. 2002b).

O emprego simultâneo em nosso estudo de HMA *env* e HMA *gag* nos permitiu identificar HIV-1 com padrão híbrido em um percentual considerável de amostras de mães e crianças/adolescentes infectados. HIV-1 com perfil genotípico híbrido, constituído de pelo menos dois subtipos virais diferentes, foi detectado em 16% dos casos. Os diferentes padrões híbridos foram observados: B^{env}/F^{gag}, B^{env}/C^{gag} e B^{env}/BD^{gag}. É interessante ressaltar que todas as amostras de HIV-1 analisadas apresentaram subtipo B na região *env* e as outras variantes de HIV-1, subtipos F, C e D, foram detectados na região *gag*.

Dentre as amostras identificadas com perfil híbrido, observamos predomínio do perfil B^{env}/F^{gag}, presente em 11% dos pacientes. Nossos resultados diferem da maioria dos estudos sobre a diversidade genética do HIV-1 realizados no Brasil, nos quais o subtipo F é descrito como a segunda variante mais prevalente, representando 10 a 15% dos casos. Além disto recombinantes B/F são relatados numa proporção menor de casos (<1%) (Morgado et al. 2002, Machado et al. 2004a). Entretanto, é importante destacar que na maioria destes estudos a diversidade genética viral era analisada em apenas uma região do genoma, o que indica que a prevalência de HIV-1 recombinante poderia estar subestimada. Machado e colaboradores (2004b), analisando amostras do HIV-1 de crianças da região sudeste, obtiveram 21% de isolados com subtipos discordantes nos genes da protease e da transcriptase reversa, sendo que a maioria destes eram recombinantes B/F.

Embora haja uma aparente ausência do subtipo F puro, ou seja, F^{env}/F^{gag} , no estado de Goiás, estudos anteriores indicaram a presença do subtipo F por HMA *env* realizado em pacientes co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Ferro 2000) e gestantes (Stefani et al. 2000). Como nestes estudos anteriores a diversidade genética só foi avaliada em uma região do genoma, não foi possível inferir sobre formas recombinantes de HIV-1.

Em Goiás, o primeiro estudo que avaliou a diversidade genética do HIV-1 em duas regiões do genoma viral (*env* e *gag*) em mães HIV⁺/AIDS, empregando a técnica de HMA, encontrou predominância de HIV-1 subtipo B (~86%), com o restante das amostras apresentando perfil híbrido B^{env}/F^{gag} (Alcântara, 2003). Estudo recente em pacientes HIV⁺/aids co-infetados com *Mycobacterium leprae* indicou predominância do HIV-1 do subtipo B^{env}/B^{gag} , seguido de formas recombinantes B^{env}/F^{gag} (Pereira et al. 2004).

Comparando-se com outros estados brasileiros, a maior proporção de HIV-1 B/F encontrada em Goiás sugere que a epidemia de aids na região centro-oeste talvez apresente maior semelhança com o perfil da diversidade do HIV-1 descrito na Argentina. Neste país, a epidemia de aids é caracterizada principalmente pelo subtipo B e diversos recombinantes B/F, principalmente a CRF12_BF, com aparente ausência do subtipo F puro. Vários estudos têm apontado a presença destes recombinantes na América do Sul desde 1986-1987 (Carr et al. 2001, Gomes-Carrilo et al. 2002, Thomson et al. 2000, Thomson et al. 2002a).

Nosso estudo é o primeiro a descrever HIV-1 com perfil híbrido B^{env}/C^{gag} em pacientes do estado de Goiás, e no centro-oeste. Esta variante foi identificada em um par mãe/filho,

procedente da cidade de Jataí, interior de Goiás. A criança foi diagnosticada aos 7 anos de idade, com contagem de LTCD4⁺ de 413 células/ μ L e viremia plasmática de 4,3 log₁₀. No momento do estudo, cerca de 1 anos após o diagnóstico, esta criança tinha contagem de LTCD4⁺ de 176 células/ μ L, indicando imunodeficiência grave, embora com carga viral mais baixa (3,9 log₁₀). A mãe da criança tinha contagem de linfócitos T CD4⁺ bastante baixa no momento do diagnóstico (232 céls/ μ L), mas apresentava este parâmetro dentro da normalidade no momento do estudo.

Anteriormente, Stefani e colaboradores (2000) identificaram o subtipo C em uma gestante proveniente da região sul do Brasil, onde este subtipo é mais freqüentemente encontrado, principalmente em pacientes de Porto Alegre/RS, diferindo substancialmente das outras regiões geográficas do país (Martínez et al. 2002, Soares et al. 2003b). Soares e colaboradores (2003a) demonstraram uma marcante heterogeneidade na distribuição dos subtipos do HIV-1 na cidade de Porto Alegre, com prevalências praticamente iguais de isolados B (45%) e C (40%), presença do subtipo F (12%) e recombinantes B/D (1,5%) e B/F (1,5%). Estudo de seqüenciamento de recombinantes C^{env}/B^{gag} e B^{env}/C^{gag} em amostras das regiões sul e sudeste do país confirmam a participação ativa de diferentes formas recombinantes na epidemia de aids do Brasil (Guimarães et al. 2002a). Globalmente, o subtipo C é a forma genética do HIV-1 mais prevalente, representando 47% dos casos (Takebe et al. 2004).

Embora o subtipo D puro não tenha sido encontrado em pacientes de Goiás, este foi primeiramente descrito no Brasil em um paciente do Rio de Janeiro (Morgado et al. 1998,

Tanuri et al. 1999). Apesar da grande homologia genética entre os subtipos B e D, este subtipo foi detectado em um par mãe/filho proveniente de Faina/GO por HMA gag em eletroforese em gel de poliacrilamida com 30% de uréia. Apesar de estudos de seqüenciamento serem importantes para esta confirmação, nossos resultados sugerem que, ainda que numa proporção limitada de pacientes, o subtipo D parece circular em pacientes do Estado de Goiás.

Dados sobre a diversidade genotípica do HIV-1 em crianças no Brasil são escassos. Álvares Júnior (1999), estudando casos de aids pediátrica no estado de Goiás por HMA env, identificou subtipo B em todas as amostras analisadas. Em uma coorte de gestantes HIV⁺/aids e filhos expostos ao vírus, realizada na cidade de Goiânia-GO, observou-se um caso de transmissão perinatal do HIV-1 e subtipo B^{env}/B^{gag} foi detectado na mãe e no filho (Alcântara 2003). Recentemente, em coorte de 133 crianças infectadas pelo HIV-1 no estado do Rio de Janeiro, o seqüenciamento de 2 fragmentos da região *pol*, responsáveis por codificar a transcriptase reversa e a protease, indicou predomínio do subtipo B, 6,8% de subtipo F e 20,3% de recombinantes (F/B, D/F, C/B, D/B, B/F), com um aumento na freqüência destas formas híbridas a partir de 1990 (Machado et al. 2004a).

Analisando-se simultaneamente amostras do HIV-1 do caso fonte (mães HIV⁺/aids) e da criança infectada durante gestação, parto, aleitamento, observamos que o mesmo subtipo genético foi detectado em todos os pares de transmissão vertical. Yang e colaboradores (2003) em um estudo com pares de transmissão materno-infantil do HIV-1 avaliaram a diversidade genética em fragmentos dos genes *env* e *gag* por meio de seqüenciamento. Subtipos discordantes em *env* e em *gag* foram considerados sugestivos de recombinação

intersubtipos, quando o mesmo perfil foi observado em ambos os membros do par mãe/filho. Nossos resultados, indicando os mesmos subtipos na mãe e no filho, reforçam a possibilidade de transmissão perinatal de vírus recombinantes. No entanto, o sequenciamento de regiões mais extensas do genoma viral e o mapeamento do sítio de recombinação são necessários para a definição do recombinante (Nájera et al. 2002).

Observando o perfil eletroforético das amostras dos pares mãe/filho, padrões eletroforéticos semelhantes foram observados em 52% dos resultados de HMA env e em 65% de HMA gag, o que é compatível com a menor variabilidade da região *gag* quando comparada com região *env* (Takebe et al. 2004, Los Alamos 2005). Em um subgrupo de amostras de pares mãe/filho, embora tenhamos encontrado os mesmos subtipos, observamos perfis eletroforéticos diferentes entre as amostras.

Embora a HMA seja uma técnica de triagem, estas diferenças na formação de heteroduplex podem refletir variações genéticas das populações virais materna e da criança, surgidas em decorrência de forças seletivas diversas agindo em cada hospedeiro, como resposta imune e uso de anti-retrovirais. Além disso, estas diferenças podem indicar seleção na transmissão das cepas pela via vertical. Vários fatores parecem interferir na transferência perinatal do HIV-1, tais como fenótipo viral, resposta imune materna, carga viral materna ao parto e fatores obstétricos (tempo de trabalho de parto, intercorrências durante o parto), os quais poderiam resultar em divergências nas *quasispecies* virais de mães e filhos, e finalmente colaborar para os diferentes perfis eletroforéticos observados (Wolinsky et al. 1992, Dickover et al. 2001, Renjifo et al. 2003, Verhofstede et al. 2003).

A maioria de nossas amostras com perfil genético híbrido (92,3%) pertenciam a pacientes de diferentes cidades do interior do Estado de Goiás: B^{env}/C^{gag} de Jataí; B^{env}/F^{gag} de Mineiros, Nerópolis, Rio Verde e Trindade; B^{env}/BD^{gag} de Faina. Apenas uma amostra, com perfil B^{env}/F^{gag}, era procedente de Goiânia. A distribuição destes casos sugere uma disseminação destes perfis genéticos virais (prováveis recombinantes) pelo interior do estado de Goiás, podendo refletir diferentes episódios de introdução destes possíveis recombinantes em diferentes regiões do estado. Sabe-se que viagens e os padrões de migração das populações contribuem para a disseminação da diversidade genética do HIV-1 (Perrin et al. 2003). Analisando amostras do HIV-1 de crianças e adolescentes nascidos em outros estados do país (Amazonas, Tocantins, Maranhão, Espírito Santo, São Paulo e Distrito Federal) observamos que todas eram do subtipo B, tanto na região *env* quanto em *gag*.

Obtivemos alta eficiência de amplificação e detecção do subtipo do HIV-1. Dentre as 85 amostras testadas, o subtipo do HIV-1 foi detectado em pelo menos uma região do genoma. Por razões ignoradas, algumas amostras (2/85; 2,4%) não foram amplificadas em uma das duas regiões investigadas, *env* ou *gag*. Outras duas amostras, embora amplificadas por PCR, não tiveram subtipo identificado e devem ser avaliadas por HMA com outras cepas de referência. Além disto estudos de sequenciamento deverão contribuir para esclarecer estes casos. Além da baixa viremia ou imunossupressão grave (baixa contagem de LTCD4+), outros fatores inerentes à amostra (mutação na região do genoma investigada, subtipo viral muito divergente, presença de fatores inibidores de amplificação) podem comprometer a análise (Mullins 1995).

Estudos prévios sobre a diversidade genotípica do HIV-1 em pacientes do Estado de Goiás foram realizados em diversos subgrupos populacionais: gestantes/mães HIV⁺/aids, crianças infectadas pela via vertical e pacientes co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis* ou com *Mycobacterium leprae* (Álvares Júnior 1999, Ferro 2000, Stefani et al. 2000, Alcântara 2003, Pereira 2004). Os resultados deste trabalho vêm contribuir para o conhecimento da diversidade genética do HIV-1 em pacientes da região Centro-Oeste, confirmando o predomínio do subtipo B^{env}/B^{gag} seguido de formas híbridas B^{env}/F^{gag}, B^{env}/C^{gag} e B^{env}/BD^{gag}, estas últimas sugestivas de eventos de recombinação genética intersubtipos.

VII – CONCLUSÕES

A utilização da HMA env associada a HMA gag na subtipagem de amostras do HIV-1 de pares de mães HIV⁺/aids - filhos infectados pela via vertical e de crianças/adolescentes infectados da cidade de Goiânia-GO, permitiu detectar:

1. HIV-1 padrão B^{env}/B^{gag} predominante entre as amostras testadas (84%), e única forma genética não-híbrida;
2. Formas genéticas híbridas foram a segunda variante mais prevalente (16%);
3. Dentre os híbridos, a grande maioria tinha perfil B^{env}/F^{gag} (11%). Aparente ausência de subtipo F puro;
4. A elevada proporção de padrões genotípicos híbridos, sugestivos de formas recombinantes do HIV-1, corrobora resultados anteriores que apontam a forma B^{env}/F^{gag} como a segunda mais prevalente no Estado;
5. Primeiro estudo a detectar a presença de possíveis recombinantes B^{env}/C^{gag} (2,5%) e B^{env}/BD^{gag} (2,5%) em nossa região, indicando que provavelmente outras formas genéticas do HIV-1 estão circulando entre os pacientes do estado de Goiás.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH 2003. Congenital and Acquired Immunodeficiencies. In WB Saunders Company, *Cellular and Molecular Immunology*, Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Philadelphia. p. 453-476.

Alcântara KC 2003. Transmissão vertical do HIV-1: estudo de pares mães HIV+/aids-filhos e diagnóstico molecular precoce. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Goiás, 2003.

Álvares Júnior JT 1999. Aids pediátrica em Goiás: estudo imunológico e virológico de casos por transmissão vertical; análise retrospectiva de 1986-1999. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Goiás, 1999.

Barré-Sinoussi F 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348: 31-35.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey f, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montaigner L 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-71.

Bongertz V, Bou-Habib DC, Brígido LFM, Caseiro M, Chequer PJN, Couto-Fernandez JC, Ferreira PC, Galvão-Castro B, Greco D, Guimarães ML, Linhares de Carvalho MI, Morgado MG, Oliveira CAF, Osmanov S, Ramos CA, Rossini M, Sabino E, Tanuri A,

Ueda M, the Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization 2000. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biological and immunological characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 184-93.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA 2000. AIDS & Lentivirus. In Guanabara Koogan, *Jawetz, Melnick & Adelberg - Microbiologia Médica*, Geo F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen A. Morse. Rio de Janeiro. p. 455-468.

Cao H, Walker BD 2000. Immunopathogenesis of HIV-1 infection. *Clin Dermatol* 18: 401-10.

Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, de As CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazans AR, Tanuri A 2000. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 275 (1): 107-15.

Carr JK, Avila M, Carrillo MG, Salomon H, Hierholzer J, Watanaveeradej V, Pando MA, Negrete M, Russell KL, Sanchez J, Birx DL, Andrade R, Vinales J, McCutchan FE 2001. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 15: F41-F47.

Cichutek K, Merget H, Norley S, Linde R, Kreuz W, Gahr M, Kurth R 1992. Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7365-9.

Cilliers T, Morris L 2002. Correceptor usage and biological phenotypes of HIV-1 isolates. *Clin Chem Lab Med* 40(9): 911-17.

Coffin JM 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267: 483-489.

Cornelissen M, Campinga G, Zorgdrager F, Goudsmit J, and the UNAIDS Network for HIV isolation and characterization 1996. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by *env* show high frequency of recombinant *gag* genes. *J Virol* 70(11): 8209-12.

Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rübsamen-Waigmann H, Mullins JI 1993. Genetic relationships determined by a DNA Heteroduplex Mobility Assay: analysis of HIV-1 *env* genes. *Science* 262: 1257-61.

Delwart EL, Pan H, Sheppard HW, Wolpert D, Neumann AU, Korber B, Mullins JI 1997. Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* 71(10): 7498-7508.

Dickover RE, Garratty EM, Plaeger S, Bryson YJ 2001. Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *J Virol* 75(5): 2194-203.

Domingo E, Martínez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortín J, López-Galindez C, Pérez-Breña P, Villanueva N, Nájera R, Scott V, Steinhauer D, DePolo N, Holland J 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance – a review. *Gene* 40: 1-8.

Eshleman SH, Becker-Pergola G, Deseyve M, Guay LA, Mracna M, Fleming T, Cunningham S, Musoke P, Mmiro F, Brooks Jackson J 2001. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype on women receiving single-dose Nevirapine prophylaxis to prevent HIV-1 vertical transmission (HIV network for prevention trials 012 study). *J Infect Dis* 184: 914-7.

Ferro MO 2000. HIV-Mycobacterium tuberculosis co-infection: virologic and immunologic characteristics in patients from central Brazil. *Dissertação de Mestrado*. San Francisco State University, may 2000.

Francis DP, Heyward WL, Popovic V, Orozco-Cronin P, Orelind K, Gee C, Hirsch A, Ippolito T, Luck A, Longhi M, Gulati V, Winslow N, Gurwith M, Sinangil F, Berman PW 2003. Candidate HIV/AIDS vaccines: lessons learned from the world's first phase III efficacy trials. *AIDS* 17: 147-56.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde 2002. Guia de Vigilância Epidemiológica, 5th ed., Brasília, 842p. vol I.

Gadelha SR, Shindo N, Cruz JNM, Morgado MG, Galvão-Castro B 2003. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus – 1 in the state of Ceará, northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(4): 461-64.

Galvão-Castro B, Couto-Fernandez JC, Mello MA, Linhares-de-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bongertz V, Ferreira PCP, Morgado M, Sabino E, Tanuri A, the Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization 1996. A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91(3): 335-8.

Garber DA, Silvestri G, Feinberg MB 2004. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet* 4: 397-413.

Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B 2002. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* 296: 2354-59.

Gomes-Carrillo MG, Avila M, Hierholzer J, Pando M, Martinez PL, McCutchan FE, Carr JK 2002. Mother-to-child HIV type 1 transmission in Argentina: BF recombinants have predominated in infected children since the mid-1980s. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(7): 477-83.

Goodenow M, Huet T, Saurin W, Kwok S, Sninsky J, Wain-Hobson S 1989. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2: 344-52.

Guimarães ML, Moreira AS, Loureiro R, Galvão-Castro B, Morgado MG 2002a. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(17): 1261-9.

Guimarães ML, Moreira AS, Morgado MG 2002b. Polymorphism of the human immunodeficiency virus type 1 in Brazil: genetic characterization of the *nef* gene and implications for vaccine design. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(4): 523-26.

Heyndrickx L, Janssens W, Coppens S, Vereecken K, Willems B, Fransen K, Colebunders R, Vandenbruaene M, Van der Groen G 1998. HIV type 1 C2V3 *env* diversity among Belgian individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(14): 1291-6.

Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, Coppens S, Vereecken K, de Witte K, Van Rempelbergh R, Kahindo M, Morison L, McCutchan FE, Carr JK, Albert J, Essex M, Goudsmit J, Asjö B, Salminen M, Buvé A, Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities, Van der Groen G 2000. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by *gag/env* Heteroduplex Mobility Assay. *J Virol* 74(1): 363-370.

Heyndrickx L, Van der Auwera G, Janssens W, van der Groen G 2002. HIV-1 group M *gag* Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) subtyping kit (Protocol Version 5, February 2002)/ page 1-15.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-26.

Hu DJ, Buvéa A, Baggsb J, van der Groena G, Dondero TJ 1999. What role does HIV-1 subtype play in transmission and pathogenesis? An epidemiological perspective. *AIDS* 13: 873–81.

Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP 2000. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 74 (3): 1234-40.

Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirrell D, Watera C, Lyagoba F, Nakiyingi J, Rutebemberwa A, Morgan D, Weber J, Gilks C, Whitworth J 2002. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1–positive persons in Uganda. *J Infect Dis* 185: 1244–50.

Kanki PJ, Hamel DJ, Sankalé J, Hsieh C, Thior I, Barin F, Woodcock SA, Guèye-Ndiaye A, Zhang E, Montano M, Siby T, Marlink R, NDoye I, Essex ME, MBoup S 1999. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes Differ in Disease Progression. *J Infect Dis* 179: 68–73.

Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288: 1789-96.

Levy JA 1996. Infection by human immunodeficiency virus – CD4 is not enough. *N Engl J Med* 335(20): 1528-30.

Li WH, Tanimura M, Sharp PM 1988. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol Biol and Evolut* 5: 313-30.

Los Alamos - HIV Sequence database 2005. <http://www.hiv-web.lanl.gov>.

Machado ES, Lambert JS, Afonso AO, Cunha SM, Oliveira RH, Tanuri A, Sill AM, Soares MA 2004a. Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1 – infected children in Rio de Janeiro, Brazil. *Anais Acad Bras Cienc* 76(4): 727-41.

Machado ES, Lambert JS, Watson DC, Afonso AO, da Cunha SM, Nogueira SA, Caride E, Oliveira RH, Sill AM, DeVico A, Tanuri A 2004b. Genotypic resistance and HIV-1 subtype in Brazilian children on dual and triple combination therapy. *J Clin Virol* 30: 24-31.

Martínez AMB, Barbosa EF, Ferreira PCP, Cardoso FA, Silveira J, Sassi G, da Silva CM, Mendonça-Signorini V, Antunes CMF 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(5): 471-76.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EC, Bongertz V, Brígido L, Guimarães MD, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins J, Hendry RM, Mayer A 1994. V3 region polymorphism in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 569-75.

Morgado MG , Guimarães ML, Gripp CBG, Costa CI, Neves Jr I, Costa CI, Santos VGV, Linhares-de-Carvalho MI, Galvão-Castro B, Bongertz V, and The Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group 1998. High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J AIDS Hum Retroviruses* 18(5): 488-94.

Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B 2002. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(2): 143-150.

MS - Ministério da Saúde / PN-DST/AIDS 2002/2003. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos e Adolescentes infectados pelo HIV. www.aids.br

MS - Ministério da Saúde / PN-DST/AIDS 2004. Guia de Tratamento Clínico da Infecção pelo HIV em Crianças. www.aids.br

Mullins JI 1995. Heteroduplex Mobility Analysis: HIV-1 *env* Subtyping Kit. Protocol version 5. <http://ubik.microbiol.washington.edu/hma/index.html>

Murray MCM, Embree JE, Ramdahin SG, Anzala AO, Njenga S, Plummer FA 2000. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 viral genotype on mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect Dis* 181: 746-9.

Nájera R, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Thomson MM 2002. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* 16(suppl 4): S3-S16.

Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362: 355-8.

Pereira GAS, Stefani MMA, Araújo Filho JA, Souza LCS, Stefani GP, Martelli CMT 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg* 71(5): 679-840.

Perrin L, Kaiser L, Yerly S 2003. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet* 3: 22-7.

Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves CB, Badaro R, Suleiman J, Ferreira O, and the Brazilian Collaborative AIDS Research Group 1993. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 7: 1191-97.

Renjifo B, Fawzi W, Mwakagile D, Hunter D, Msamanga G, Spiegelman D, Garland M, Kagoma C, Kim A, Chaplin B, Hertzmark E, Essex M 2001. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol* 4(1): 16-25.

Renjifo B, Chung M, Gilbert P, Mwakagile D, Msamanga G, Fawzi W, Essex M 2003. In-utero transmission of quasispecies among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Virology* 307(2): 278-82.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B 2000. HIV-1 nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/articles/nomenclature/Nomen.html>.

Sabino EC, Díaz RS, Brigido LF, Learn GH, Mullins JI, Reingold AL, Duarte AJS, Mayer A, Busch MP 1996. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo city, Brazil. *AIDS* 10: 1579-84.

Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BTM, Díaz RS, Bongertz V, Cavalcante S, Galvão-Castro B, Mullins JI, Mayer A 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 68(10): 6340-46.

Sawadogo S, Adjé-Touré C, Bilé CE, Ekpini REN, Chorba T, Nkengasong JN 2003. Field evaluation of the gag-based Heteroduplex Mobility Assay for genetic subtyping of circulating recombinant forms of human immunodeficiency virus type 1 in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J Clin Microbiol* 41(7): 3056-9.

Schüpbach J, Popovic M, Gilden RV, Gonda MA, Sarngadharan MG, Gallo RC 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-5.

Sharp PM, Bailes E, Gao F, Beer BE, Hirsch VM, Hahn BH 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem Soc Trans* 28: 275-82.

Soares EAJM, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA 2003a. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34(5): 520-6.

Soares MA, Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brígido L, Pires IL, Morgado MG, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Cassol S, Tanuri A, and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance 2003b. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 17: 11-21.

Stefani MMA, Pereira GAS, Martelli CMT, Shindo N, Galvão-Castro B 2000. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23(2): 205-7.

Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K 2004. Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. *Pediatrics International* 46: 236-44.

Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M 1999. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20(1): 60-6.

Tàpia N, Franco S, Puig-Basagoiti F, Menéndez C, Alonso PL, Mshinda H, Clotet B, Saiz JC, Martínez MA 2003. Influence of human immunodeficiency virus type 1 subtype on mother-to-child transmission. *J Gen Virol* 84: 607-13.

Temin HM 1993. Retrovirus variation and reverse trnascription: Abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6900-03.

Thomson MM, Villahermosa ML, Vazquez-de-Parga E, Cuevas MT, Delgado E, Manjón N, Medrano L, Pérez-Álvarez L, Contreras G, Carrillo MG, Salomón H, Nájera R 2000. Widespread circulation of a BF intersubtype recombinant form among HIV-1 infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 14: 897- 899.

Thomson MM, Delgado E, Herrero I, Villahermosa ML, Vazquez-de Parga E, Cuevas MT, Carmona R, Medrano L, Perez-Alvarez L, Cuevas L, Najera R 2002a. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 83: 107- 119.

Thomson MM, Pérez-Álvarez L, Nájera R 2002b. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet* 2: 461-71.

UNAIDS/WHO 1997a. Implications of HIV variability for transmission: scientific and policy issues. Expert Group of the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. *AIDS* 11: UNAIDS1-UNAIDS15.

UNAIDS/WHO 1997b. HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics. Workshop report from the European Commission (DG XII, INCO-DC) and the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. *AIDS* 11: UNAIDS17-UNAIDS36.

Verhofstede C, Demecheleer E, De Cabooter N, Gaillard P, Mwanyumba F, Claeys P, Chohan V, Mandaliya K, Temmerman M, Plum J 2003. Diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) *env* sequence after vertical transmission in mother-child pairs infected with HIV-1 subtype A. *J Virol* 77(5): 3050-7.

Vicente ACP, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, Hu D, Rayfield MA, Bretas G, Tanuri A 2000. The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 327-31.

Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E 2000. Unprecedented degree of human

immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 74(22): 10498-507.

Wolinsky SM, Wike CM, Korber BTM, Hutto C, Parks WP, Rosenblum LL, Kunstman KJ, Furtado MR, Muñoz JL 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255: 1134-7.

Yang C, Li M, Newman RD, Shi Y, Ayisi J, van Eijk AM, Otieno J, Misore AO, Steketee RW, Nahlen BL, Lal RB 2003. Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission. *AIDS* 17: 1667-74.

Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391: 594-7.

IX – ANEXOS

Anexo A. Documento de Aprovação do Estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do HDT/HAA/SUS.

Anexo B. Ficha de Investigação Epidemiológica e Clínica do Estudo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)