



Dayse Locateli

**SUBTIPAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO HIV EM INDIVÍDUOS SOROPOSITIVOS:
UM ESTUDO PARCIAL DA EPIDEMIOLOGIA DO HIV EM SANTA CATARINA.**

Florianópolis, fevereiro de 2006.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Dayse Locateli

**SUBTIPAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO HIV EM INDIVÍDUOS SOROPOSITIVOS:
UM ESTUDO PARCIAL DA EPIDEMIOLOGIA DO HIV EM SANTA CATARINA.**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

**Orientadores: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard**

Florianópolis, fevereiro de 2006.

Locateli, Dayse

Subtipagem e Caracterização do HIV em Indivíduos Soropositivos: Um Estudo Parcial da Epidemiologia do HIV em Santa Catarina/ Dayse Locateli – Florianópolis 2006. 89 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. HIV. 2. Epidemiologia. 3. Subtipos. 4. Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família, pois
o objetivo principal de minha vida é fazê-los felizes.

"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente." Texto Zen-Budista

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Aguinaldo R. Pinto, pela oportunidade de entrar na vida científica e pela confiança depositada em mim. Pelo incentivo a busca de novas oportunidades e pela coragem de aceitar grandes desafios. Agradeço pelo empenho, paciência e carinho, muito obrigada!

Ao Dr. Edmundo C. Grisard, pela acolhida, paciência e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Por me ensinar a traçar os pontos cardeais para alcançar um objetivo e principalmente por todas suas “sugestões”! Tenho em você um exemplo que quero seguir em minha vida acadêmica. Muito obrigada por tudo!

Ao Professor Zanetti, pelas lições de vida e apoio durante os dois anos de convivência. Mas principalmente pelas intermináveis e inesquecíveis conversas. Sinto-me privilegiada de tê-lo conhecido.

À coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC e as secretárias Joice e Lygia pelo auxílio, amizade e paciência durante o curso. Aos Professores Mário, Carlos e Célia pela amizade e colaboração durante todo o mestrado.

A minha vice-co-orientadora Bibiana Paula Dambrós, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelos (infelizmente) raros momentos de descontração fora do laboratório e pelos ótimos comentários da vida real.

A Patrícia Hermes Stoco, pelo auxílio no seqüenciamento e análise das amostras, pelo companheirismo no trabalho e fora dele. A Juliana e Adriana pela grande amizade construída nestes dois anos e pelos desabafos escondidos na sala de cultura. Aos amigos do LVA, Vanessa, Thiago, Carla, Juliana; da Protozoologia, Daniela Scholl, Cris, Milene, Letícia, Gianinna, Rodrigo e Thais; e do LIA, Paula, Camila e Carol. Aos alunos Glauber, Diogo e José pelo auxílio com os programas de bioinformática.

A minha inseparável companheira de desabafos, caronas, almoços, trabalhos intermináveis nos finais de semana e pela madrugada, telefonemas noturnos e incontáveis fugas para qualquer lugar, Ana Paula Duarte de Souza, pela inesquecível sinceridade e transparência e por me mostrar que é possível existir amizades verdadeiras. Te adoro de montão!

Um agradecimento especial aos pacientes que participaram voluntariamente deste trabalho. Aprendi com eles a valorizar a vida por mais que ela pareça difícil. Acredito que eles sejam os responsáveis pela minha euforia a cada resultado encontrado. Às enfermeiras Dilcélia e Dilma, pelo entretenimento nos dias de coleta. À amiga Sandrinha por tudo que fez por mim e aos médicos Dr. Luiz G. Escada, Gustavo, Marcello e Isabela pela paciência e colaboração.

À minha irmãzinha e melhor amiga Cláudia C. Locateli pelo exemplo a ser seguido na vida acadêmica, pelo apoio nos momentos difíceis e por ter um enorme coração. Ao meu namorado Fábio Leonardo pelo amor e principalmente pela paciência ao longo de toda nossa caminhada. Aos meus pais, pelo incentivo de buscar a realização de meus sonhos, sempre fornecendo todo o suporte necessário, principalmente a compreensão, o amor e a liberdade. Obrigada pela fantástica vida que vocês me proporcionam e pelo lar perfeito que vocês me deram. Amo muito vocês!

Ao maior incentivador e em parte, responsável por esta conquista meu amigo Dr. Carlos Frederico Tourinho. Agradeço pelo auxílio na preparação para a prova de mestrado, pela confiança depositada em mim e principalmente por fazer com que me apaixonasse pelo tema de meu trabalho. Obrigada por despertar em mim o interesse pela pesquisa e pela biologia molecular através de sua brilhante didática. Obrigada pela acolhida, confiança e amizade.

RESUMO

Aproximadamente 40 milhões de pessoas vivem com HIV/AIDS em todo o mundo e o Brasil é um dos países de maior prevalência da América Latina, sendo o Estado de Santa Catarina (SC) o que apresenta a maior incidência no número de casos de AIDS. Baseado na alta variabilidade genética do HIV, estudos de epidemiologia molecular revelam que o subtipo B é o mais prevalente na América do Sul, assim como no Brasil. Desde o início da epidemia de AIDS já foram documentados 10.770 casos em SC, porém, nenhum estudo de caracterização molecular do HIV foi realizado. Assim, o presente estudo visou caracterizar os subtipos do vírus HIV que infectam pacientes no Estado de SC e avaliar o perfil clínico e epidemiológico da epidemia do HIV. A reação de *nested* PCR possibilitou a amplificação de 100% das amostras para a região *gag* e 90,9% para a região *env*, provavelmente refletindo a variabilidade da região do envelope viral. A caracterização dos genes e a subtipagem das amostras foi realizada através do seqüenciamento dos produtos de amplificação e análise filogenética comparativas com seqüências de subtipos padrões. As análises filogenéticas revelaram uma prevalência de 48% do subtipo C, 23% do subtipo B, 23% de formas recombinantes B/C e 6% do subtipo B/F. Os dados aqui apresentados são os primeiros registros da caracterização molecular do vírus HIV circulante no Estado de Santa Catarina e estão de acordo com estudos prévios que demonstram um aumento da prevalência do subtipo C no Sul do Brasil. Além disso, foi detectada uma alta frequência de subtipos recombinantes B/C, sugerindo a presença de recombinações entre estes subtipos na população estuda.

Palavras-chave: HIV, subtipos, Santa Catarina, epidemiologia.

ABSTRACT

Approximately 40 million people live with HIV/AIDS and Brazil is one of the most affected countries in Latin America. Within Brazil, the State of Santa Catarina (SC) presents the greatest incidence in the number of AIDS cases, revealing since the beginning of the AIDS epidemic a total of 10.770 cases, but no characterization of the virus was carried out. Based on the high HIV genetic variability, molecular epidemiology studies revealed that subtype B is the most prevalent subtype in South America, as well in Brazil. Thus, the aim of the present study was to characterize the HIV subtypes infecting patients in SC and to evaluate the epidemiological and clinical profile of the HIV epidemic. *Nested* PCR allowed the amplification of 100% of the samples for the *gag* region and 90.9% for the *env* region, probably reflecting the variability of the viral envelope region. Characterization and subtyping of the samples was carried out by direct sequencing of the PCR products and comparative phylogenetic analysis including standard sequences. Phylogenetic analyzes revealed a prevalence of 48% of subtype C, 23% of subtypes B, 23% of recombinant form B/C, and 6% of subtypes B/F. The herein presented data is the first report on molecular characterization of HIV-1 circulating in Santa Catarina State and is in accordance with previous studies, which demonstrated an increasing pattern of the HIV-1 subtype C prevalence in southern Brazil. Furthermore, a high frequency of a recombinant B/C subtype was detected, suggesting the presence of a spectrum of recombination between these subtypes in the studied population.

Key words: HIV, subtypes, Santa Catarina, epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do HIV, evidenciando sua organização estrutural _____ 4
- Figura 2.** Genoma do HIV-1 _____ 4
- Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação do gene *env* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR _____ 29
- Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação da região V3-V5 do gene *env* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR _____ 29
- Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação da região p7-p24 do gene *gag* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR _____ 30
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação do gene *gag* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR _____ 31
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação do gene *env* utilizando-se diluições seriadas do DNA do plasmídeo C1 como molde na reação de PCR _____ 32
- Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando o resultado do teste de reconstituição para o gene *env* _____ 33
- Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando a detecção dos genes virais (*gag* e *env*) em amostras de pacientes _____ 35
- Figura 10:** Árvore filogenética resultante da análise das seqüências da região V3 do gene *env* do envelope viral do HIV isolado de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina por *neighbor-joining* (1.000 replicatas) utilizando o programa MEGA[®] v. 1.02 _____ 38

Figura 11: Árvore filogenética resultante da análise das seqüências da região p24-p7 do gene *gag* do HIV isolado de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina por *neighbor-joining* (1.000 replicatas) utilizando o programa MEGA[®] v. 1.02 _____ 40

Figura 12. Distribuição dos subtipos de HIV-1 identificados através da análise dos genes *env* e *gag* em amostras de pacientes de Santa Catarina _____ 42

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de digestão dos fragmentos do gene *env* amplificados via *nested* PCR com os iniciadores ED3/ED14 e ED31/ ED33 pela enzima *FokI* _____ 43

Figura 14: Prevalência de subtipos de HIV de acordo com o provável ano de diagnóstico de indivíduos infectados acompanhados no Hospital Regional São José e no CTA _____ 44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Formulação dos diferentes tampões utilizados nas otimizações das reações de PCR para amplificação dos genes *env* e *gag* do HIV-1 _____ 19

TABELA 2: Características clínicas dos indivíduos HIV- positivos incluídos neste estudo _____ 26

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BLAST- do inglês: *Basic Local Alignment Tool*
°C – Graus celsius
cDNA – DNA complementar à RNA
CTA – Centro de Testagem Anônima
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados
 dATP- 2'-deoxiadenosina 5'- trifosfato
 dCTP- 2'-deoxicitidina 5'- trifosfato
 dGTP- 2' –deoxiguanosina 5'- trifosfato
 dTTP- 2'deoxitimidina 5'- trifosfato
ddNTP- Dideoxinucleotídeos trifosfatados
DS – Desvio padrão
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
env – Gene do envelope viral
g – Grama
g – Força da gravidade
gag – Gene do antígeno de superfície viral
h - Horas
HAART- do inglês: *Highly Active Antiretroviral Therapy*
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
M – Molar
MIP – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
µg – Micrograma
min - Minutos
ml – Mililitro
mm³ – Milímetro cúbico
µl – Microlitro
ng – Nanograma
pb – Pares de bases
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
pH – Potencial hidrogeniônico ou concentração de íons H⁺
RFLP – Polimorfismo de tamanho determinado por perfis de restrição (do inglês *Restriction fragment length polymorphism*)
RNase – Ribonuclease
seg - Segundos
Taq – *Thermus aquaticus*
TBE – Tampão Tris-Borato/ EDTA
Tris – Tris (hidrometil) amino metano
UV – Ultra violeta
V – Volt
VHS- Velocidade de hemossedimentação
WHO – Organização Mundial da Saúde (do Inglês *World Health Organization*)
X – Média

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Aspectos gerais da AIDS | 1 |
| 1.2 HIV | 3 |
| 1.3 Epidemiologia | 6 |
| 1.3.1 Epidemiologia do HIV no Estado de Santa Catarina | 8 |
| 1.4 Epidemiologia molecular do HIV | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 3. PACIENTES, MATERIAL & MÉTODOS | 16 |
| 3.1 Considerações éticas | 16 |
| 3.2 Pacientes e Amostras | 16 |
| 3.3 Levantamento do histórico clínico dos pacientes | 16 |
| 3.4 Extração de DNA | 16 |
| 3.5 Dosagem e avaliação da qualidade do DNA extraído | 18 |
| 3.6 Padronização da técnica de PCR | 18 |
| 3.6.1 PCR para amplificação do gene <i>env</i> do HIV | 20 |
| 3.6.2 PCR para amplificação do gene <i>gag</i> do HIV | 21 |
| 3.7 Purificação dos produtos de PCR | 22 |
| 3.8 Seqüenciamento da região V3-V5 do gene <i>env</i> e p24-p7 do gene <i>gag</i> do HIV | 22 |
| 3.9 Análises das seqüências obtidas | 23 |
| 3.10 Identificação da variante B' | 24 |
| 4. RESULTADOS | 26 |
| 4.1 Características epidemiológicas da população em estudo | 26 |
| 4.2 Extração de DNA | 27 |
| 4.3 Padronização da reação de PCR e <i>nested</i> PCR | 28 |
| 4.3.1 Detecção da sensibilidade e especificidade da reação de <i>nested</i> PCR | 31 |
| 4.4 Detecção dos genes virais em amostras de pacientes HIV positivos | 34 |
| 4.5 Seqüenciamento do DNA das amostras | 35 |
| 4.6 Identificação da variante B' | 42 |
| 4.7 Relação dos dados clínicos com o subtipo viral encontrado | 43 |
| 5. DISCUSSÃO | 45 |
| 6. CONCLUSÕES | 58 |

| | |
|------------------------|-----------|
| 7. PERSPECTIVAS | 60 |
| REFERÊNCIAS | 61 |
| ANEXOS | 72 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da AIDS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi reconhecida em meados de 1981, nos EUA, a partir da identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais e moradores de São Francisco e Nova York. Estes pacientes apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e comprometimento do sistema imune, o que levou à conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não catalogada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível (BARRE-SINOUSI, CHERMANN, REY, et al., 1983, GALLO, SALAHUDDIN, POPOVIC, et al., 1984).

Em 1983, Luc Montagnier na França e Robert Gallo nos EUA isolaram um vírus de um paciente com AIDS, recebendo, respectivamente, os nomes de LAV (*lymphadenopathy associated virus* ou vírus associado a linfadenopatia) e HTLV-III (*human T-lymphotrophic virus* ou vírus T-linfotrópico humano tipo III). Posteriormente, este vírus passaria a ser conhecido como vírus da imunodeficiência humana ou HIV (BARRE-SINOUSI, CHERMANN, REY, et al., 1983, GALLO, SALAHUDDIN, POPOVIC, et al., 1984).

Inicialmente acreditava-se que o HIV era transmitido apenas entre homossexuais, usuários de drogas injetáveis e prostitutas, porém com o passar dos anos verificou-se a inexistência de “grupos de risco”. Isto porque o HIV pode ser transmitido através de relação sexual desprotegida (homo ou heterossexual), compartilhamento de seringas entre usuários de drogas, transmissão materno-fetal durante a gravidez, parto ou aleitamento e através da injeção ou transfusão de derivados sanguíneos contaminados (HOFFMANN, KAMPS, 2005).

A patogenia da imunodeficiência, embora envolva mecanismos direta e indiretamente relacionados ao HIV, tem como principal característica a enorme multiplicação viral, levando a uma diminuição progressiva do número e da atividade dos linfócitos T CD4, com comprometimento da imunidade celular, sendo a AIDS uma manifestação tardia e avançada

da infecção. A velocidade de progressão da imunodeficiência é bastante variável, podendo surgir sintomas logo após a infecção ou mesmo depois de 20 anos. A evolução da doença pode ser dividida em fase aguda, fase assintomática e fase de AIDS (RACHID, SCHECHTER, 1999).

A fase aguda da infecção está presente em 40 a 90% dos casos e é caracterizada por alta replicação viral (100 milhões de cópias RNA/ml de plasma), quando grande quantidade de linfócitos T CD4 é infectada e destruída constantemente. Os sintomas podem surgir de sete dias a duas semanas após exposição, sendo muitas vezes confundidos com sintomas de gripe comum. Pacientes que apresentam sintomas mais severos e duradouros durante esta fase de infecção tendem a progredir mais rapidamente para AIDS. Os sintomas mais comuns são febre, úlceras orais, faringite, mialgia, artralgia, cefaléia, mal-estar, perda de peso e linfadenopatia. Em alguns casos os pacientes apresentam adenomegalias, *rash* cutâneo (tronco e membros) e cefaléia. Os exames laboratoriais revelam leucopenia, linfocitose atípica, aumento de enzimas hepáticas e proteinorraquia com glicorraquia normal. Inicialmente ocorre uma redução do número total de linfócitos, com uma redução gradativa de linfócitos T CD4 e um aumento de linfócitos T CD8, caracterizando a inversão da relação CD4/CD8 (HOFFMANN, KAMPS, 2005).

Indivíduos infectados pelo HIV, porém sem sintomas clínicos, estão enquadrados na fase assintomática da infecção. É nesta fase que indivíduos aparentemente saudáveis podem descobrir estarem infectados através de exames de rotina ou doação de sangue. O perfil laboratorial destes pacientes deve ser monitorado constantemente, pois poderá indicar a evolução da imunodeficiência, que pode ser caracterizada nesta etapa por queda do hematócrito e hemoglobina, leucopenia e/ou linfopenia, plaquetopenia e aumento do VHS (velocidade de hemossedimentação). Contagem de subpopulações linfocitárias (CD4/CD8) e avaliação da carga viral devem ser realizadas freqüentemente com intervalos de três a seis

meses, sugerindo o início ou alterações da medicação antiretroviral, bem como a profilaxia de infecções oportunistas (RACHID, SCHECHTER, 1999).

O início dos sinais da fase sintomática surge quando o número de linfócitos T CD4 destruído for superior ao número de linfócitos produzido pelo organismo. Esta fase caracteriza-se por infecções e neoplasias, que raramente acometem indivíduos imunocompetentes. As infecções oportunistas mais características da AIDS são causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, citomegalovírus e *Toxoplasma gondii*, entre outras. Os sinais característicos da AIDS podem incluir inicialmente perda de peso progressiva, astenia, febre intermitente, mialgia e sudorese noturna. Podem surgir em fase mais adiantada candidíase oral, diarreia prolongada sem causa aparente e febre persistente. Nas fases mais tardias da doença o paciente pode apresentar comprometimento do sistema nervoso central com aparecimento de demência (RACHID, SCHECHTER, 1999).

1.2 HIV

HIV é um lentivírus da Família Retroviridae que invade células humanas que possuem o marcador de superfície CD4, como linfócitos T auxiliares, macrófagos e células dendríticas. A depleção do linfócito T CD4 predispõe o organismo a infecções oportunistas e neoplasias que caracterizam a AIDS. O HIV-1 é formado por um envelope lipídico crivado de glicoproteínas, a gp120 e a gp41, que circunda um capsídeo cônico onde estão armazenadas as enzimas e proteínas necessárias para replicação viral (Figura 1), além de duas cópias de RNA genômico de fita simples (HOFFMANN, KAMPS, 2005).

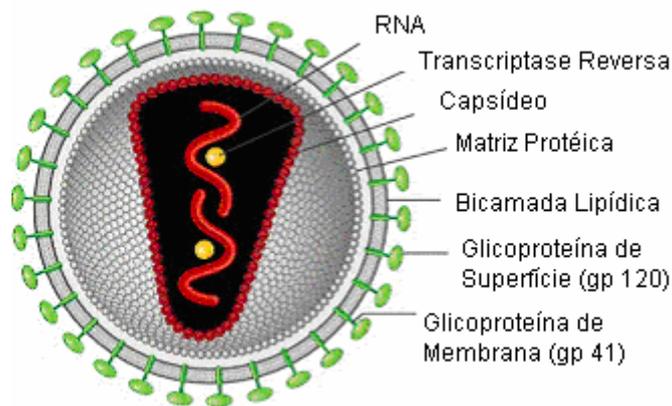


Figura 1. Representação esquemática do vírus HIV, evidenciando sua organização estrutural. Fonte: Disponível em: <http://bio.classes.ucsc.edu>. Acesso em: 03 de jan. 2006.

O genoma viral tem aproximadamente 10.000 nucleotídeos e seus principais genes podem ser divididos em 3 categorias (VAISHNAV, WONG-STAAAL, 1991): os genes estruturais *env*, *gag* e *pol*, presentes em todos os retrovírus, que codificam respectivamente as proteínas do envelope viral, as proteínas do capsídeo e as enzimas virais; os genes *tat*, *rev* e *nef*, codificam proteínas regulatórias de expressão gênica e os genes acessórios *vpr*, *vpu* e *vif* são genes acessórios, sendo que os dois primeiros codificam proteínas necessárias à maturação viral e o último codifica um fraco ativador de transcrição (HOFFMANN, KAMPS, 2005, SLEASMAN, GOODENOW, 2003). O genoma viral é flanqueado por repetições terminais longas ou LTR em ambas as extremidades 5'e 3', que contém elementos intensificadores e promotores, necessários para a transcrição viral (Figura 2).

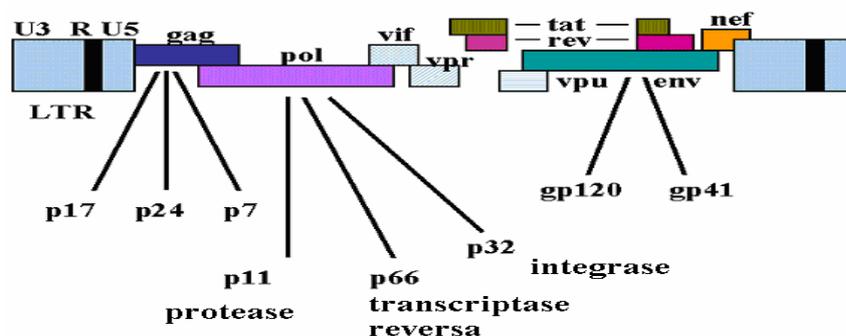


Figura 2. Representação esquemática do genoma do vírus HIV-1. Os retângulos coloridos identificam os nove genes virais. Da esquerda para a direita: *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *env* e *nef*, os quais apresentam-se flanqueados por duas LTR. Abaixo de cada gene estão indicados seus produtos. Fonte:

(HOFFMANN, KAMPS, 2005).

A infecção da célula hospedeira pelo HIV inicia-se através da ligação da gp120 com moléculas CD4 expressas principalmente na superfície dos linfócitos T e macrófagos. Esta interação expõe sítios da gp120 que interagem com os receptores de quimiocinas CCR-5 ou CXCR-4, que funcionam como correceptores essenciais para a entrada do vírus na célula. Após a fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula hospedeira, ocorre a liberação do conteúdo viral no citoplasma da célula e o início da transcrição reversa do RNA viral em DNA fita simples utilizando nucleotídeos endógenos da célula hospedeira. Além de gerar a primeira fita de DNA a partir do RNA viral, a transcriptase reversa (TR) possui atividade de ribonuclease H, o que lhe permite degradar o RNA e sintetizar uma dupla fita de DNA proviral. A TR apresenta uma elevada taxa de erro na adição de nucleotídeos, de aproximadamente 1 a cada 10.000 nucleotídeos, o que resulta na variabilidade genética do HIV, representada através de quasispécies virais circulantes em indivíduos infectados (COFFIN, 1995, GOODENOW, HUET, SAURIN, et al., 1989). Uma vez que o DNA viral tenha sido sintetizado, este é transportado para o núcleo da célula hospedeira e covalentemente ligado ao DNA celular através da enzima integrase.

A transcrição do DNA proviral leva inicialmente à síntese de proteínas regulatórias como *tat* e *rev*. Subseqüentemente, um longo RNAm é transcrito, sendo depois processado dando origem às diversas proteínas virais. O gene *env* codifica as glicoproteínas externas contidas no envelope do vírus, como a gp120 e gp41, *pol* codifica as enzimas necessárias para a replicação viral (transcriptase reversa, integrase e protease) e *gag* dá origem às proteínas da matriz e do capsídeo, como p17 e p24. A gp120 presente no envelope viral é sintetizada como um precursor de 160 kDa, que será clivado pela protease viral, dando origem à gp120 e gp41. As proteínas formadas por *gag* também são derivadas de um precursor maior de 53 kDa, que será clivado dando origem à p24, p17, p9 e p7. As proteínas geradas por *gag* se arranjam

formando o capsídeo viral, que contém no seu interior duas fitas simples de RNA e cópias das enzimas virais. Esse vírus recém-formado deixa a célula por brotamento, sendo neste momento a partícula viral envelopada pela membrana citoplasmática da célula hospedeira (SLEASMAN, GOODENOW, 2003, STITES, 2000).

Após a infecção ocorre uma enorme replicação viral, sendo a carga viral plasmática freqüentemente superior a 10^7 partículas/mm³. Lentamente a carga viral reduz-se, atingindo após 6-12 meses relativa estabilidade, variando de indivíduo para indivíduo. Esta estabilidade individual é o principal determinante da velocidade de progressão da imunodeficiência causada pelo HIV, sendo que indivíduos que mantêm a carga viral alta progridem rápido enquanto aqueles cuja carga viral se mantém em níveis baixos permanecem assintomáticos por vários anos (WONG, HEZAREH, GUNTARD, et al., 1997).

Com o progresso da doença, a carga viral aumenta proporcionalmente, atingindo nos estágios tardios da doença níveis comparáveis à infecção aguda primária. O acompanhamento desta dinâmica de replicação viral em um indivíduo infectado tem grande valor na determinação da eficácia da terapia anti-retroviral, bem como da progressão da doença. A contagem dos linfócitos T CD4 e CD8 é uma medida direta do perfil imunológico de um determinado indivíduo, sendo um excelente indicador de risco para as principais doenças oportunistas associadas à infecção pelo HIV. Estes dados, associados aos sinais clínicos do paciente, são os principais parâmetros utilizados para se iniciar e monitorar a terapia anti-retroviral em pacientes soropositivos (HOFFMANN, KAMPS, 2005).

1.3 Epidemiologia

De acordo com as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita-se que até o final de 2005 entre 36 e 45 milhões de pessoas já haviam sido infectadas pelo HIV em todo o mundo. A distribuição da epidemia é bastante desigual: 24 a 29 milhões de

indivíduos soropositivos na África, 4,5 a 12 milhões na Ásia, 1 a 3 milhões na Europa, 1 a 3 milhões na América e cerca de 45.000 a 120.000 na região da Austrália e Nova Zelândia. Esta epidemia tende a crescer, já que as estimativas calculam cinco milhões de novos infectados a cada ano, perfazendo 14 mil novos casos por dia, sendo a AIDS relacionada com 3,1 milhões de óbitos em todo mundo (UNAIDS - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS / WHO, 2005).

No Brasil, os primeiros casos de AIDS foram identificados em 1982, com posterior disseminação da doença das regiões metropolitanas da região Sudeste para o interior do país. O Brasil tem hoje cerca de 610.000 indivíduos soropositivos, surgindo 21.000 novas infecções por ano. A epidemia de AIDS totalizou 171.923 óbitos desde 1980 e causa, segundo o Ministério da Saúde, 10.000 óbitos ao ano (média de 6,4 óbitos por 100 mil habitantes), sendo a segunda causa de morte entre homens jovens e quarta causa entre mulheres. A AIDS é responsável pela redução média de três meses na expectativa de vida do brasileiro, estando hoje a doença presente em 3.702 (66%) dos municípios do País (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). De acordo com o último Boletim Epidemiológico do Programa Nacional de DST e AIDS, do início de 1980 até dezembro de 2005, o Ministério da Saúde contabilizou 371.827 casos de AIDS. Deste total, 234.736 são de residentes na região Sudeste e 67.006 na região Sul. Os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina concentram 84,8% do total de casos notificados desde o início da epidemia HIV/AIDS. Dos 100 municípios com maior número de casos de AIDS, mais de 80 deles estão nas regiões Sul e Sudeste, sendo que na região Sul as taxas de incidência são as mais elevadas do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As características dos indivíduos infectados pelo HIV estão mudando, demonstrando uma tendência da infecção em atingir a população mais velha, feminina e de baixa renda. Do total geral de casos registrados desde 1980, a doença é mais prevalente entre os homens: são

251.979 com a doença (68,01% do total) contra 118.520 mulheres (31,98% do total). Pode-se verificar no Brasil uma maior expansão do número de casos entre mulheres, principalmente daquelas na faixa etária de 20 a 49 anos, pobres e residentes nas periferias urbanas e cidades do interior com menos de 100 mil habitantes. Nota-se uma maior incidência da doença em pessoas com menos de sete anos de estudo, essa população representa 42% dos casos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A principal via de transmissão da doença é a relação heterossexual desprotegida, respondendo por 88,2% dos casos notificados em mulheres e por 28,4% dos casos em homens. A segunda via de transmissão tem sido o compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis, que responde por 10,5 % dos casos registrados no grupo feminino e por 21,5 % entre os homens. Enquanto nas mulheres a maior incidência ocorre na faixa entre 20 e 49 anos, representando 82,9% dos casos de AIDS notificados, nos homens a faixa etária que mais concentra casos da doença é entre 25 e 49 anos apresentando 79% do total de casos em homens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

1.3.1 Epidemiologia do HIV no Estado de Santa Catarina

Enquanto a região Sudeste sustenta uma trajetória de queda no número de casos de AIDS desde o final da década de 90, na região Sul a desaceleração na ocorrência destes casos é mais lenta. Em Santa Catarina o primeiro registro de AIDS aconteceu em 1984, na região oeste do Estado. Segundo a Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Santa Catarina, entre 1984 e 2004 foram notificados 14.712 casos de AIDS, afetando 71,3 % dos municípios do Estado (D'ORSI, 2004).

Apesar do primeiro registro de AIDS em Santa Catarina ocorrer em uma cidade do interior, a epidemia apresenta alta incidência em municípios litorâneos como Itajaí e Florianópolis. O último boletim epidemiológico demonstra um aumento do número dos casos

em todas as regiões do Estado (SECRETARIA DO ESTADO DE SANTA CATARINA, 2002). O Estado de Santa Catarina tem se destacado por registrar incidência superior da doença em relação à maioria dos outros Estados da Federação, sendo que em 2004 registrou uma taxa de incidência da doença de 25,9 por grupo de 100 mil habitantes. Na região Sul do país, a incidência foi de 23,1 enquanto que no Brasil o índice foi de 17,2 no mesmo grupo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Embora os números de 2005 não estejam ainda totalmente compilados, é bastante provável que Santa Catarina ainda ocupe esta posição no cenário nacional. Desde o início da epidemia no Estado a distribuição dos casos por faixa etária está tendendo para idades mais avançadas, onde a mediana de idade alterou de 19 anos em 1990 para 36 anos em 2003. Os adolescentes (10 a 19 anos) e os adultos jovens (20 a 29 anos) apresentam uma redução na incidência de AIDS desde 2001, sendo esta faixa etária a menos atingida pela epidemia. A faixa etária de 30 a 39 anos é a mais atingida pela epidemia. A incidência em adultos na faixa etária entre 40 a 49 anos está em crescimento constante, assim como adultos com mais de 50 anos e idosos (acima de 60 anos). Entretanto, estes dados podem representar apenas a normalização dos dados no centro de notificações. A razão entre homens e mulheres catarinenses com AIDS passou de 4,8 em 1987 para 1,6 em 2003 demonstrando o processo de feminização no Estado. No início da epidemia a principal categoria de exposição em Santa Catarina era de usuários de drogas injetáveis com 43,8% dos casos notificados. Em 1996 esta categoria foi superada pela transmissão heterossexual, que em 2002 representou 62,2% dos casos notificados. A principal forma de contágio é através da via sexual em indivíduos heterossexuais, seguida de usuários de drogas injetáveis e em terceiro a via sexual em indivíduos homossexuais (D'ORSI, 2004).

Algumas cidades de Santa Catarina como Itajaí, Florianópolis, Balneário Camboriú e São José destacam-se no cenário nacional por apresentarem as mais altas taxas de incidência

de AIDS (SECRETARIA DO ESTADO DE SANTA CATARINA, 2002). Embora campanhas nos meios de comunicação que visam à prevenção da doença sejam uma constante, os resultados desejados nem sempre são alcançados já que o número de novas infecções permanece elevado.

1.4 Epidemiologia molecular do HIV

O genoma do HIV é extremamente variável, o que permite classificá-lo em dois grandes grupos: HIV-1 e HIV-2. HIV-1 é responsável pela pandemia em diversas regiões do globo, enquanto HIV-2 está restrito à África Ocidental (CLAVEL, GUETARD, BRUNVEZINET, et al., 1986, KANKI, BARIN, M'BOUP, et al., 1986). Sintomas clínicos causados por HIV-1 e HIV-2 são similares, porém o desenvolvimento da doença é acentuadamente mais lento nas infecções causadas pelo HIV-2 (MARLINK, KANKI, THIOR, et al., 1994). Baseado na similaridade do genoma viral, três diferentes grupos de HIV-1 foram identificados: grupo M (*Major*), grupo O (*Outlier*) e o grupo N (*New* ou *non-M, non-O*).

Acredita-se que o HIV tenha se originado a partir do vírus da imunodeficiência símia (SIV), transmitido à partir de macacos para a espécie humana (GAO, BAILES, ROBERTSON, et al., 1999). Chimpanzés são utilizados na alimentação humana na África e provavelmente a transmissão para a espécie humana possa ter ocorrido no momento do abate, preparo ou ingestão da carne. A infecção pelo SIV é assintomática em algumas espécies de macacos, enquanto outras espécies desenvolvem uma doença similar à infecção pelo HIV em humanos. Os grupos M, N e O provavelmente derivam de diferentes eventos de transmissão chimpanzé-homem, enquanto a origem dos diferentes subtipos que existem dentro do grupo M do HIV-1 ainda permanece desconhecida e meramente especulativa (KUIKEN, THAKALLAPALLI, ESKLID, et al., 2000). A partir deste momento, HIV-1 será referido como apenas como HIV.

As infecções causadas por vírus pertencentes aos grupos O e N estão limitadas ao continente africano, com poucos casos identificados na Europa ou Estados Unidos, diferentemente do grupo M que é responsável por 99% das infecções distribuídas pelo mundo e pode ser subdividido em distintos subtipos identificados pelas letras A-D, F-H, J e K. Os subtipos são grupos filogeneticamente muito próximos, sendo separados por uma distância que corresponde a uma alteração de 25-35% nas seqüências de nucleotídeos do gene *env* e de 15% nas seqüências do gene *gag* (THOMSON, PEREZ-ALVAREZ, NAJERA, 2002). Para a subtipagem viral são utilizados preferencialmente os genes *env* e *gag*, devido a alta variabilidade presente nestas regiões genômicas, porém outros genes como o gene *pol* podem ser utilizados (PASQUIER, MILLOT, NJOUOM, et al., 2001).

Os subtipos virais estão distribuídos globalmente, sendo que o subtipo C é responsável por mais de 56% de todas as infecções causadas pelo HIV, seguido pelo subtipo B (ESPARZA, BHAMARAPRAVATI, 2000). O subtipo B é predominante na Europa, Américas e Austrália e o subtipo C é bastante comum na Índia e no sul do continente africano, enquanto que nas regiões central e leste da África a maioria das pessoas infectadas pelo HIV apresenta os subtipos A e D (MCCUTCHAN, 2000). No Brasil, existe uma predominância do subtipo B, porém também estão presentes os subtipos C, F, D e A (MORGADO, GUIMARÃES, GALVAO-CASTRO, 2002).

Diferenças na distribuição dos subtipos virais têm sido observadas em distintas regiões geográficas brasileiras. Enquanto a mesma proporção de subtipos B e F foi observada em um estudo conduzido em Manaus, AM (VICENTE, OTSUKI, SILVA, et al., 2000), na região Sudeste estudos têm demonstrado a predominância do subtipo B ($\pm 85\%$), seguido do subtipo F (10-15%) (BONGERTZ, BOU-HABIB, BRIGIDO, et al., 2000, MORGADO, SABINO, SHPAER, et al., 1994, TANURI, SWANSON, DEVARE, et al., 1999). Predominância de subtipo B ($> 90\%$), com poucos casos de subtipos F e C foi observada em amostras de HIV do

Nordeste (COUTO-FERNANDEZ, MORGADO, BONGERTZ, et al., 1999) e Centro-Oeste (STEFANI, PEREIRA, MARTELLI, et al., 2000), respectivamente. O subtipo C, primeiramente detectado no Brasil nas cidades de São Paulo e Porto Alegre (CSILLAG, 1994), representa 3% das infecções observadas no Brasil (BONGERTZ, BOU-HABIB, BRIGIDO, et al., 2000, BRINDEIRO, R., VANDERBORGHT, CARIDE, et al., 1999). Um estudo recente, porém, demonstrou que 30% dos vírus circulantes na região Sul e Sudeste são do subtipo C, contrastando de forma bastante acentuada com o padrão de distribuição do HIV verificado em outras regiões do país (SOARES, M. A., DE OLIVEIRA, BRINDEIRO, et al., 2003). A incidência do subtipo C na cidade de Porto Alegre, RS, chega a 37% dos vírus circulantes, e pode atingir 44% se considerado as formas recombinantes que contém seqüências relacionadas ao subtipo C (SOARES, E. A., SANTOS, PELLEGRINI, et al., 2003).

As variantes genéticas do HIV que apresentam relações filogenéticas com diferentes *quasispécies* ao longo do genoma são originadas de uma recombinação intersubtipos em indivíduos com dupla ou múltiplas infecções. Além disso, estes vírus recombinantes podem ser transmitidos a um indivíduo durante a infecção primária. Eventos de recombinação entre segmentos de dois diferentes subtipos virais ocorrem durante a transcrição reversa do HIV, no momento que a enzima transcriptase reversa alterna entre as duas fitas de RNA do vírus. Estes vírus recombinantes inter-subtipos são identificados como formas recombinantes circulantes (CRFs), havendo 21 CRFs já descritas até o presente momento (LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY, 2005). No Brasil o primeiro registro de formas recombinantes foi feito em 1994, quando se identificou o vírus recombinante B/F (SABINO, SHPAER, MORGADO, et al., 1994). Desde então já foram documentadas infecções por vírus que apresentavam diversas formas de recombinações, entre eles, recombinantes B/C, B/F, B/C/F e C/F, bem como infecções concomitantes por dois subtipos distintos (MORGADO, GUIMARÃES, GALVAO-

CASTRO, 2002). A identificação de formas recombinantes geralmente é baseada nas seqüências de dois ou mais genes virais analisados conjuntamente (BLACKARD, COHEN, MAYER, 2002).

A análise através de seqüenciamento do gene que codifica a gp120 tem revelado cinco regiões variáveis, de V1 a V5. A região hipervariável V3 é composta por aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, através dos quais pode-se identificar os subtipos virais, estando possivelmente relacionada a aspectos de infectividade do HIV, alterações no tropismo celular do vírus, habilidade de formação de sincício e progressão da infecção inicial para AIDS (STANFIELD, GHIARA, OLLMANN SAPHIRE, et al., 2003). Diferentes seqüências de aminoácidos na alça V3 da gp120 foram observadas em amostras virais obtidas de pacientes que apresentavam infecção pelo subtipo B, relatando uma associação com a região onde as amostras foram coletadas (MORGADO, GUIMARÃES, GRIPP, et al., 1996). Amostras do subtipo B isoladas nos EUA e Europa apresentam o motivo GPGR, enquanto que algumas amostras isoladas no Brasil apresentam o motivo GWGR, sendo classificadas como B'. Estudos realizados em outros países da América Latina não encontraram a presença de isolados B' nas amostras testadas (RUSSELL, CARCAMO, WATTS, et al., 2000). Além da análise comparativa de seqüências, a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) pode ser utilizada para a identificação da variante B', onde a digestão de produtos de amplificação da região V3 da gp120 com uma enzima de restrição específica fornece perfis distintos entre amostras do subtipo B e B' (MORGADO, GUIMARÃES, NEVES JUNIOR, et al., 1998). O motivo GWGR está associado com substituições em regiões adjacentes da glicoproteína do envelope viral que resulta em alterações na antigenicidade e na estrutura secundária da proteína (MORGADO, GUIMARÃES, GRIPP, et al., 1996).

Os subtipos virais apresentam indícios que podem diferir entre si na progressão da

doença, carga viral, uso de co-receptores de quimiocinas, taxas de transmissão vertical e níveis de ativação da transcrição. Além disso, a variabilidade do HIV também pode afetar a eficácia de testes diagnósticos e testes quantitativos de carga viral (BLACKARD, COHEN, MAYER, 2002). A grande diversidade entre os subtipos do HIV também representa um grande desafio para o desenvolvimento de vacinas. A maioria de vacinas experimentais tem sido desenvolvida contra o subtipo B, porém existem diversas regiões geográficas onde este não é o subtipo presente. A importância da diversidade viral também está relacionada à progressão clínica da doença e a transmissibilidade do HIV-1. Existem, porém, poucos trabalhos nessa área, com resultados contraditórios (ALAEUS, LIDMAN, BJORKMAN, et al., 1999, KANKI, HAMEL, SANKALE, et al., 1999, NELSON, RUNGRUENGTHANAKIT, MARGOLICK, et al., 1999), havendo necessidade de maiores investigações para que se possa chegar a conclusões mais sólidas.

Uma vez que Santa Catarina é um dos Estados brasileiros com maior incidência de AIDS (25,9 casos / 100 mil habitantes), torna-se necessário o conhecimento dos subtipos virais circulantes neste Estado, permitindo assim uma melhor compreensão da epidemia no Estado de Santa Catarina, bem como na região Sul. Além disso, estes dados poderão auxiliar no estabelecimento de políticas de saúde pública e possibilitar o desenvolvimento de novos tratamentos e testes de vacinas, quando os mesmos estiverem disponíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar um levantamento parcial da epidemia do HIV no Estado de Santa Catarina, através da identificação dos subtipos virais presentes neste Estado.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de PCR para os genes *env* e *gag* de amostras de DNA proviral HIV;
- Identificar os subtipos virais presentes nas amostras do Estado de Santa Catarina através da técnica de seqüenciamento da região V3 do envelope viral;
- Identificar a presença de formas recombinantes através da técnica de seqüenciamento do gene *env* associado ao gene *gag* do HIV.
- Identificar a presença do motivo GWGR em amostras do subtipo B;
- Relacionar os dados de subtipagem viral com os dados clínicos dos pacientes;
- Relacionar os dados de subtipagem com a forma de contágio do HIV.

3 PACIENTES, MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Projeto número nº 215/2004). Os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e os que demonstraram interesse em participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

3.2 Pacientes e Amostras

As amostras de DNA proviral de HIV utilizadas no presente estudo foram obtidas através da coleta de 6 ml de sangue periférico de 100 indivíduos soropositivos, atendidos no Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes (São José, SC) e no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) do mesmo município. Foram selecionados apenas pacientes saudáveis, com valores de linfócitos T CD4 acima de 300 células/mm³, a fim de assegurar um elevado número de células para extração de DNA proviral. A coleta foi realizada em tubos a vácuo, sendo que a purificação do DNA proviral das amostras, amplificação e seqüenciamento dos genes de interesse foram realizadas no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da UFSC.

3.3 Levantamento do histórico clínico dos pacientes

A partir do prontuário médico de cada paciente, foram obtidas informações tais como sexo, idade, prováveis data e forma de contágio, relação CD4/CD8, carga viral, número de linfócitos totais e procedência do paciente.

3.4 Extração de DNA

Aproximadamente 3 ml de sangue de cada amostra foi adicionado de 1ml de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis) para a separação de leucócitos . Após centrifugação, a 4.000 x g por 20 min a temperatura ambiente foi coletada a camada de leucócitos em um tubo de 1,5 ml e centrifugada a 1.000 x g por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e às amostras foi adicionado 500µl da solução de lise (Tris 1M, NaCl 1M, EDTA 0,5M, SDS 10%) e 100 mg de proteinase K (20 mg/µl) , sendo as mesmas incubadas a 45°C por aproximadamente 12 h.

Procedeu-se então a extração do DNA. Após a adição de 500µL de fenol equilibrado (USB, Cleveland) e homogeneinização cuidadosa durante 10 min, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 x g à temperatura ambiente. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo estéril e adicionada de 500 µl de fenol-clorofórmio (1:1), repetindo-se os passos de homogeneização e centrifugação. A fase aquosa foi novamente transferida para um novo tubo e adicionada a ela 500 µl de clorofórmio, repetindo-se os passos de homogeneização e centrifugação. O sobrenadante foi então coletado e transferido para um novo tubo onde o DNA total foi precipitado pela adição de 50µl de uma solução de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 1 ml de etanol 100%, previamente gelado, seguido de incubação a -20°C por 60 min e centrifugação por 30 min a 12.000 x g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 75% (v/v), seguido de centrifugação a 12.000 x g por 10 min a temperatura ambiente. O etanol foi então descartado e o precipitado permaneceu a temperatura ambiente por 30 minutos para secagem do DNA. O DNA foi finalmente reidratado em 50 µl de água pentadestilada e desmineralizada suplementada com 10 µg de RNase, incubado por 1 hora a 37°C (SAMBROOK, RUSSELL, 2001) e armazenado a 4°C.

Algumas amostras não puderam ter o DNA extraído através deste protocolo padrão,

sendo então utilizado um protocolo alternativo proposto por Salazar e colaboradores, 1998. Um mililitro de sangue total foi centrifugado a 1.200 x g por 5 min e o sobrenadante foi descartado por inversão. As células do sangue foram lisadas com 1ml de tampão Tris 1 (10mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/l KCl, 10 mmol/l MgCl₂, 2 mmol/l EDTA, pH 8.0 e 25 ml/l Triton X-100). Após centrifugação, o precipitado foi lavado com tampão Tris 1 e lisado com 220 µl de tampão Tris 2 (10mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/l KCl, 10 mmol/l MgCl₂, 2 mmol/l EDTA, pH 8.0 e 0,4 mol/l NaCl e 10 g/l dodecil sulfato de sódio) e incubado por 15 min a 56°C. As proteínas celulares foram removidas por precipitação, após adição de 100 µl de 5 mol/l NaCl, o DNA foi isolado por precipitação com etanol 100% e solubilizado em 50 µl de água.

3.5 Dosagem e avaliação da qualidade do DNA extraído

A quantidade e a pureza do DNA extraído foram determinadas por espectrofotometria em um aparelho Biophotometer[®] (Eppendorf, Hamburgo), observando-se as absorbâncias em 260 e 280 nm, assim como a relação 260/280, conforme o descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001).

Além disso, o DNA extraído foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE-1X. Após a diluição das amostras de DNA extraído em tampão de aplicação (xilenocianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e ficoll 15%), as amostras foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese por aproximadamente 40 minutos a 100V (60 mA) em TBE 1X (45mM Tris-borato, 1mM EDTA). Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo (0,01% v/v) e revelado por exposição à luz UV em um transiluminador MacroVue UV20[®] (Hofer, San Francisco), sendo os resultados documentados de forma digital (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

3.6 Padronização da técnica de PCR

Inicialmente, a reação de amplificação dos genes *env* e *gag* do HIV foi padronizada utilizando-se um protocolo composto de 12 tampões de reação, os quais diferem nas concentrações de MgCl₂ e KCl e no pH (Tabela1). Cada conjunto de reações foi acompanhado de um controle negativo, que continha todos os reagentes necessários à amplificação exceto o DNA molde. Foram utilizados como controles positivos DNA do plasmídeo C1, que contém o gene *env* e do plasmídeo G1, que contém o gene *gag*, os quais foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Carlos Frederico Tourinho dos Santos (UNISUL, Palhoça-SC) e pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN-SC), respectivamente. As condições de amplificação variaram para os dois genes trabalhados no presente estudo e serão apresentadas nos tópicos a seguir. A seqüência de todos iniciadores utilizados no presente estudo está descrita no Anexo B.

Tabela 1: Formulação dos diferentes tampões* utilizados na otimização das reações de PCR para amplificação dos genes *env* e *gag* do HIV.

| Tampão | Tris-HCl | | | MgCl ₂ | KCl |
|--------|----------|--------|--------|-------------------|-------|
| | pH 8,3 | pH 8,8 | pH 9,2 | | |
| 01 | 100mM | - | - | 15mM | 250mM |
| 02 | 100mM | - | - | 15mM | 750mM |
| 03 | 100mM | - | - | 35mM | 250mM |
| 04 | 100mM | - | - | 35mM | 750mM |
| 05 | - | 100mM | - | 15mM | 250mM |
| 06 | - | 100mM | - | 15mM | 750mM |
| 07 | - | 100mM | - | 35mM | 250mM |
| 08 | - | 100mM | - | 35mM | 750mM |
| 09 | - | - | 100mM | 15mM | 250mM |
| 10 | - | - | 100mM | 15mM | 750mM |
| 11 | - | - | 100mM | 35mM | 250mM |
| 12 | - | - | 100mM | 35mM | 750mM |

* Adaptado do *kit* Opti-Prime® (Stratagene, Califórnia)

3.6.1 PCR para amplificação do gene *env* do HIV

Foram utilizadas reações de *nested* PCR com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade na amplificação do gene *env* do HIV-1 a partir de DNA total extraído de sangue de pacientes soropositivos.

Para a primeira reação de PCR utilizou-se 5 pmol dos iniciadores específicos ED5 (5'- ATG GGA TCA AAG CCT AAA GCC ATG TG-3') e ED12 (5'- AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG-3') direcionados para os dois extremos do gene do envelope viral (*env*), 1U de *Taq* DNA polimerase (LabTrade do Brasil, São Paulo), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Invitrogen, La Jolla), 15 mM MgCl₂, 250 mM KCl, 100mM Tris-HCl, 0,1 a 2,0 µg de DNA molde, completando-se o volume final de 10 µl por reação. A reação de amplificação ocorreu sob as seguintes condições térmicas: 3 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, 32 ciclos de 94°C de 15 seg, 55°C por 45 seg, 72°C por 1 min e um passo final de extensão a 72°C por 5 min em termocicladores *Mastercycler Gradient*[®] (Eppendorf, Hamburgo). A amplificação de um fragmento de 1.250 pb correspondente à região variável (V1-V5) do gene do envelope do HIV foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose conforme o descrito no item 3.5.

A segunda reação de PCR obedeceu às mesmas condições da primeira reação, porém foram utilizados iniciadores direcionados à porções mais internas do fragmento de amplificação de 1.250 pb. Utilizando os iniciadores ES7 (5'- tgt aaa acg acg gcc agt CTG TTA AAT GGC AGT CTA GC -3') e ES8 (5'- cag gaa aca gct atg acc CAC TTC TCC AAT TGT CCC TCA -3') (os nucleotídeos em letras minúsculas são complementares ao iniciador universal M13) e o produto da primeira reação como DNA molde, a presença do produto esperado de 700 pb referente a região hipervariável V3-V5 do HIV-1 foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% conforme o descrito em 3.5.

Alternativamente, para amplificação do gene *env* foram utilizados os iniciadores ED3 (5'-TTA GGC ATC TCC TAT GGC AGG AAG AAG CGG-3') / ED14 (5'-TCT TGC CTG GAG CTG TTT GAT GCC CCA GAC-3') para a primeira reação de PCR e os iniciadores ED31 (5'-CCT CAG CCA TTA CAC AGG CCT GTC CAA AG-3') e ED33 (5'-TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C-3') para a *nested* PCR, gerando respectivamente 2Kb (rev) e 640pb (C2-C3) (DELWART, HERRING, RODRIGO, et al., 1995).

3.6.2 PCR para amplificação do gene *gag* do HIV

Para a amplificação do gene *gag* foram utilizadas reações de *nested* PCR para posterior reação de seqüenciamento. Na primeira reação de PCR foram utilizados 5 pmol de iniciadores direcionados para os dois extremos do gene HIG822 (5'-GCT TTC AGC CCA GAA GTA ATA CC-3') e HIGHMA1317 (5'-CCA AAT TCT CCC TAA AAA ATT AGC CT-3'), 1U de *Taq* DNA polimerase (LabTrade do Brasil, São Paulo), 10mM tampão PCR 10X, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 0,1 a 2,0µg de DNA das células infectadas e quantidade suficiente de água para completar 10µl. A amplificação ocorreu sob as seguintes condições: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg e 72°C por 1 min com a extensão final por 7 minutos a 72°C. Quando completados os ciclos, um produto de 830 pb foi verificado em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídeo e visualizado no trasluminador UV. A segunda reação de PCR obedeceu às mesmas condições da primeira reação, porém utilizando-se iniciadores mais internos: H1Gag1584 (5'-AAA GAT GGA TAA TCC TGG G-3') e g17 (5'-TCC ACA TTT CCA ACA GCC CTT TTT-3'), gerando um produto de 460 pb correspondente a região de p24 e p7. As amostras foram estocadas a -20°C (HEYNDRICKX, JANSSENS, ZEKENG, et al., 2000).

3.7 Purificação dos produtos de PCR

Iniciadores e dNTPs não incorporados foram eliminados dos produtos de amplificação utilizando-se inicialmente uma precipitação com isopropanol 70% e centrifugação a 9.000 x *g* por 45 min a 4 °C, seguido de lavagem com etanol 70% gelado e centrifugação a 9.000 x *g* por 20 min a 4 °C. O produto de PCR purificado foi reidratado em 13µl de água purificada. A perda gerada pelo processo de purificação foi avaliada pela análise dos produtos em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo e visualizado em transluminador MacroVue UV20[®] (Hofer, San Francisco), sendo os resultados documentados de forma digital.

3.8 Seqüenciamento da região V3-V5 do envelope viral e p24-p7 do gene gag do HIV

O seqüenciamento do DNA proviral dos produtos de *nested* PCR gerados pela amplificação das regiões *env* e *gag* do HIV foi realizado em um equipamento *MegaBace 1000[®] DNA Analysis System* (GE/Amershan Biosciences Inc., Uppsala), utilizando-se a reação de seqüenciamento com o kit *DYEnamic[®] ET Dye Terminator* (GE/Amershan Biosciences), conforme especificações do fabricante. Utilizou-se uma concentração entre 50 a 200 ng do produto de *nested* PCR como DNA molde, 5,0 pmol de iniciador específico ES7 (alternativamente ED31) e H1Gag1584 para seqüenciamento dos genes *env* e *gag*, respectivamente, 4,2 µl de *DYEnamic[®] ET terminator reagent premix*, em reações de volume final de 10 µl em microplacas próprias de 96 orifícios. As condições empregadas na amplificação para marcação das seqüências foram: 95°C por 25 seg de desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e extensão a 60°C por 120 seg.

Após a reação de seqüenciamento realizou-se a purificação dos produtos a fim de retirar os dideoxynucleotídeos, deoxynucleotídeos e iniciadores não incorporados

utilizando-se isopropanol 70% e centrifugação 9.000 x *g* por 45 min a temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 70% gelado, seguindo-se nova centrifugação a 9.000 x *g* por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e realizou-se uma centrifugação com placa invertida em papel absorvente até que se atingisse a rotação de 450 x *g* para retirar o excesso de etanol. Após a incubação da placa em estufa a 37°C por 15 min para evaporação de resíduos de etanol, as amostras foram diluídas em 8 µl de tampão de aplicação contendo 70% formamida e EDTA 1mM. As amostras foram eletroinjetadas a 2 KV por 120 seg e eletroeluídas 9 KV por 1-2 horas. Após eletroforese as seqüências geradas foram analisadas conforme descrito no item 3.10.

3.9 Análises das seqüências obtidas

As amostras foram seqüenciadas em triplicata e as seqüências geradas foram analisadas com o apoio do Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC). A qualidade das seqüências obtidas foi analisada pelo pacote Phred/Phrap/Consed[®] (EWING, GREEN, 1998, EWING, HILLIER, WENDL, et al., 1998), sendo os cromatogramas analisados e corrigidos manualmente, quando necessário. O programa Phrap forneceu a seqüência consenso entre diferentes seqüenciamentos do mesmo produto através da análise da qualidade de cada nucleotídeo aumentando assim, a confiabilidade da seqüência obtida. As seqüências consenso geradas foram então comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL, GISH, MILLER, et al., 1990, LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY, 2005) para a comprovação da identidade das seqüências obtidas.

Objetivando estimar a distância genética entre as linhagens de HIV presentes nas diferentes amostras dos pacientes, as seqüências foram alinhadas com seqüências de

referência através do programa Clustal X[®] v. 1.83 (THOMPSON, GIBSON, PLEWNIAK, et al., 1997) utilizando-se os parâmetros padrões e comparadas pelos métodos de *bootstrapped neighbour-joining* (1.000 replicatas) e máxima parcimônia (200 replicatas), utilizando-se o programa MEGA[®] v. 1.02. (KUMAR, TAMURA, JAKOBSEN, et al., 2001).

Para comparação e determinação dos subtipos virais, foram incluídas nesta análise seqüências dos genes analisados (*env* e *gag*) obtidas no GenBank, correspondendo aos seguintes subtipos: B (GenBank KO3455), C (GenBank U52953), F (GenBank AF005494) e BF (GenBank AF385936). Além destas, foi também incluída na análise comparativa as seqüências dos genes *env* e *gag* do vírus da imunodeficiência símia (GenBank DQ136310).

3.10 Identificação da variante B'

As amostras identificadas como subtipo B a partir da análise do gene *env* do envelope viral foram também avaliadas pela técnica de RFLP. Inicialmente o DNA proviral das amostras foi amplificado por *PCR* conforme descrito no item 3.7, utilizando-se iniciadores direcionados para a região do envelope viral. Para a primeira reação foram utilizados os iniciadores ED3 (5'- TTA GGC ATC TCC TAT GGC AGG AAG AAG CGG -3') e ED14 (5'- TCT TGC CTG GAG CTG TTT GAT GCC CCA GAC) para amplificação de um produto de aproximadamente 2,0 Kb. Para a reação de *nested PCR* foram utilizados os iniciadores ED31 (5'-CCT CAG CCA TTA CAC AGG CCT GTC CAA AG-3') e ED33 (5'- TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C-3') que amplificam apenas a região hipervariável V3 do gene *env*, gerando um produto de aproximadamente 500 pb (DELWART, SHEPPARD, WALKER, et al., 1994, MORGADO, GUIMARÃES, NEVES JUNIOR, et al., 1998). O produto do *nested PCR* foi purificado com isopropanol 70% e álcool 70% como previamente descrito. Para a reação de RFLP, 300 ng de produto

de *nested* PCR purificado foi digerido com 4U da enzima de restrição *Fok* I (New England Biolabs, Beverly) em tampão próprio durante 2 horas a 37°C. Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% por 2 horas a 60V em 1 TBE, sendo corado e fotografado conforme o descrito em 3.5.

4 RESULTADOS

4.1 Características epidemiológicas da população em estudo

As principais características analisadas dos 100 indivíduos incluídos no presente estudo estão representadas na Tabela 2. O grupo amostral foi formado por 55 mulheres e 45 homens. A média de células T CD4 foi de 535 células/mm³ de sangue e a média de RNA viral de 7.910 cópias/ml de plasma. Uma grande variação na carga viral foi observada, de indetectável (<80 cópias/ml) a acima de 10⁵ cópias/ml de plasma.

Tabela 2: Características clínicas e epidemiológicas dos indivíduos HIV positivos incluídos neste estudo.

| Característica | Total |
|---------------------------------------|-------------|
| Idade (X ±DP) | 38,6 ±10,4 |
| Sexo | |
| Feminino | 55 % |
| Masculino | 45% |
| Tempo de infecção em anos (X ±DP) | 6,71 ± 4,71 |
| Linfócitos T CD4/ul (X ±DP) | |
| Geral | 535 ± 195,5 |
| Tratados | 506 ± 173,6 |
| Não tratados | 577 ± 299,3 |
| CD4 > 500 células /mm ³ | 48% |
| CD4 200-500 células /mm ³ | 52% |
| Cópias de RNA / ml (X) | |
| Tratados | 5.452 |
| Não tratados | 8.828 |
| Carga viral indetectável* | 48% |
| Perfil terapêutico | |
| Tratados | 67 |
| Não tratados | 33 |
| Forma de contágio (via) | |
| Relação heterossexual | 73% |
| Compartilhamento de drogas injetáveis | 13% |
| Relação homossexual | 10% |
| Transfusão sanguínea | 4% |
| Origem | |
| Grande Florianópolis | 75 |
| Outras cidades de SC | 9 |
| Outros Estados | 6 |

* Valores abaixo de 80 cópias virais por mililitro de plasma.

De acordo com a contagem de células T CD4, os pacientes foram classificados em dois grupos: pacientes com >500 células/mm³ (48%) e pacientes com células T CD4 entre

200 e 500 células/mm³ (52%). Somente 33 pacientes não utilizavam tratamento anti-retroviral; 16 pacientes utilizavam terapia dupla e 55 pacientes utilizavam coquetel terapêutico (HAART). A forma de contágio mais comum observada foi através da relação sexual heterossexual (73%), seguida da transmissão por compartilhamento de drogas injetáveis (13%), exposição homossexual (10%), transfusão sanguínea (4%).

Baseando-se nas informações obtidas dos pacientes através de entrevista, pôde-se identificar os prováveis locais de contágio, identificados na Tabela 2 como procedência. A maioria das infecções ocorreu na região compreendida como Grande Florianópolis sendo 42% provenientes do Município de Florianópolis, 37% do Município de São José e 4% da Cidade de Palhoça. Outras Cidades catarinenses citadas pelos pacientes como prováveis locais de infecção foram: Chapecó, Bom Retiro, Santo Amaro da Imperatriz, Imbituba, Laguna, Tubarão, Criciúma, São João Batista, Rancho Queimado e Rio do Sul. Além destes, foram ainda citadas as cidades do Rio de Janeiro-RJ, Curitiba-PR, Santa Maria e Porto Alegre no Rio Grande do Sul.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras utilizando o protocolo de fenol-clorofórmio foi possível em somente 88 das 100 amostras coletadas. Estas amostras apresentaram aproximadamente 10-20 µg de DNA. As 12 amostras restantes não apresentaram a separação de leucócitos ideal após centrifugação com o reagente Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich), o que impossibilitou a extração de seu ácido nucléico. Para estas amostras foi testado um protocolo alternativo de extração de DNA genômico, contendo Triton X-100, SDS e uma simples purificação protéica (SALAZAR, HIRATA, CAVALLI, et al., 1998). A utilização deste protocolo resultou na degradação do DNA genômico das amostras estudadas, reduzindo o número amostral de 100 para 88.

4.3 Padronização da reação de PCR e *nested* PCR

A padronização da técnica visando a amplificação via PCR do gene *env* do HIV foi realizada utilizando-se os iniciadores ED5/ED12 e ES7/ES8, como proposto por Delwart e colaboradores (1994) com pequenas modificações. Da mesma forma, as condições de reação utilizadas para amplificação do gene *gag* permaneceram segundo proposto por Heyndrickx (2000).

Para a padronização da reação de amplificação do gene *env* foi utilizado o controle positivo de um plasmídeo de referência que contém a região do gene que codifica o envelope viral (subtipo C1, *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH, EUA*). Aplicando-se o protocolo dos 12 tampões especificado no item 3.6 de Pacientes, Material & Métodos utilizando-se os iniciadores ED5 e ED12. Nestas condições, a reação que apresentou o melhor resultado, traduzido pela intensidade do fragmento amplificado e pela não geração de produtos além do fragmento esperado, foi aquela que continha o tampão de número 09 (15mM MgCl₂, 250 mM KCl, pH 9,0), como demonstrado na Figura 3. O tampão comercial fornecido com a enzima *Taq* DNA polimerase apresentou menor intensidade do produto gerado quando comparado aos outros tampões utilizados. Desta forma, foi padronizado o uso do tampão de número 09 para a primeira reação de PCR.

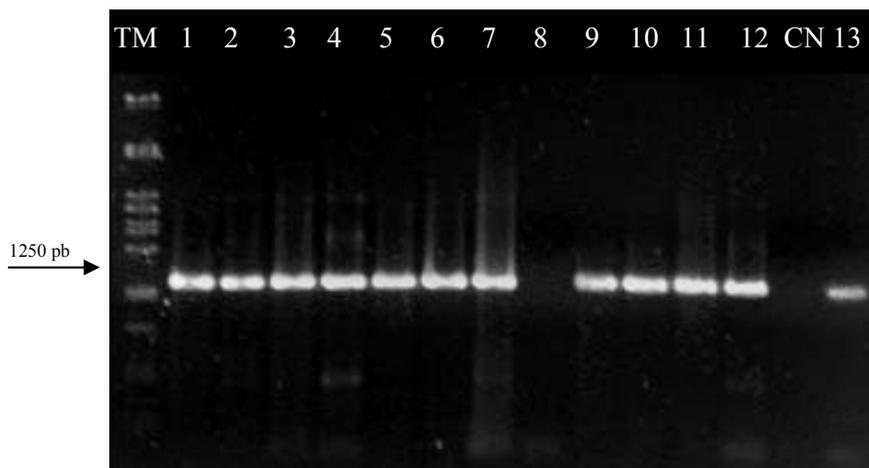


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação do gene *env* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR. Canaletas 01 a 12: tampões 1 a 12 (Tabela 1); canaleta 13: tampão comercial fornecido com a enzima *Taq* DNA polimerase; TM: padrão de tamanho molecular: fago lambda digerido com *Pst*I; CN: controle negativo.

Para o segundo par de iniciadores, ES7 e ES8, que permitiram a amplificação de uma região mais interna do gene, gerando um fragmento de 700pb, foram utilizadas as mesmas condições de padronização descritas para o par de iniciadores ED5 e ED12, sendo que o melhor tampão também foi o de número 09 (Figura 4), o qual foi também escolhido para as reações de *nested* PCR para amplificação da região V3-V5 do envelope viral.

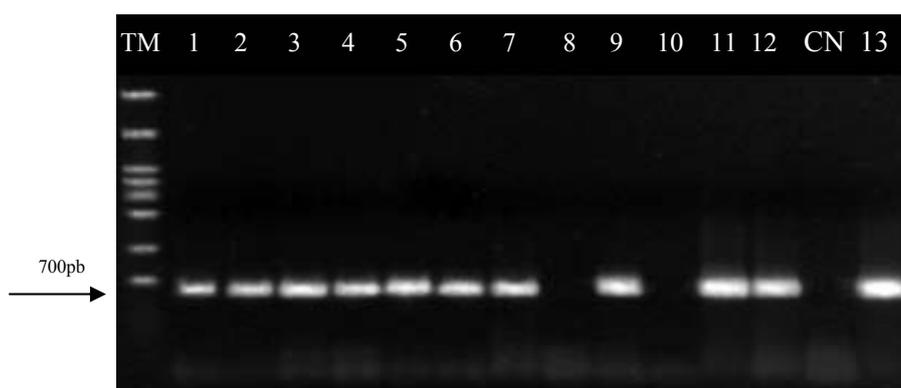


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação da *nested* PCR referente à região V3-V5 do gene *env* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR. Canaletas 1 a 12: tampões 01 a 12 (tabela 1); canaleta 13: tampão comercial fornecido com a enzima *Taq* DNA polimerase; TM: padrão de tamanho molecular fago lambda digerido com *Pst*I; CN: controle negativo.

Para a padronização da amplificação do gene *gag* foi utilizado o controle positivo de um plasmídeo de referência que contém a região do capsídeo viral (subtipo G1, *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*, NIH, USA). Aplicou-se o protocolo dos 12 tampões especificado no item 3.6 em Pacientes, Material & Métodos utilizando-se os iniciadores H1G822 e H1GHMA1317 na primeira PCR. Nestas condições a reação que apresentou o melhor resultado foi aquela que continha o tampão comercial fornecido pelo fabricante da enzima *Taq* DNA polimerase (LabTrade), como demonstrado na Figura 5.

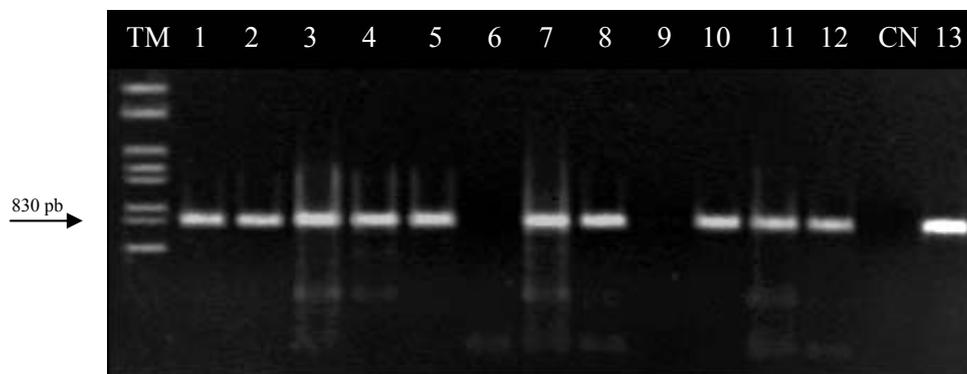


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação da região p7-p24 do gene *gag* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR. Canaletas 1 a 12: tampões 01 a 12 (Tabela 01); canaleta 13: tampão comercial fornecido com a enzima *Taq* DNA polimerase; TM: padrão de tamanho molecular fago lambda digerido com *Pst*I.

A reação de *nested* PCR utilizando-se iniciadores H1Gag1584 e G17, permitiu a amplificação de uma região mais interna do gene *gag* gerando um fragmento de 460pb. Foram utilizadas as mesmas condições de padronização descritas para o par de iniciadores H1G822 e H1GHMA1317, sendo que o tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (LabTrade) também apresentou o melhor perfil de amplificação, sendo então, escolhido como tampão padrão para ambas as reações da região do capsídeo viral, como apresentado na Figura 6. Na padronização da reação de *nested* PCR verificou-se a amplificação dos genes alvo (*env* e *gag*) em uma ampla faixa de concentração de $MgCl_2$ e KCl, incluindo a geração de produtos em pHs distintos (Figuras 4 e 6).

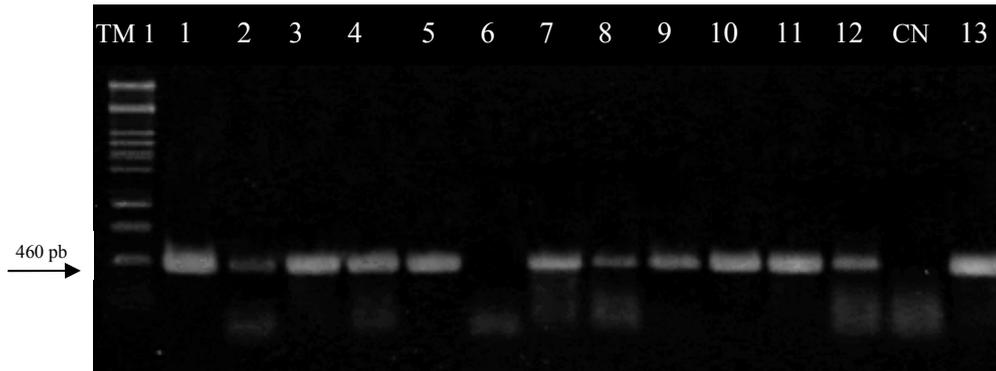


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação em *nested* PCR do gene *gag* utilizando-se diferentes tampões na preparação da reação de PCR. canaletas 1 a 12: tampões 01 a 12 (Tabela 1); canaleta 13: tampão comercial fornecido com a enzima *Taq* DNA polimerase; TM: padrão de tamanho molecular fago lambda digerido com *Pst*I; CN: controle negativo.

4.3.1 Detecção da sensibilidade e especificidade da reação de *nested* PCR

Para avaliar a sensibilidade da PCR na detecção do gene *env*, foram utilizadas diluições seriadas desde 10 ng até 1 fg (10ng, 1ng, 0,1ng 0,01ng ...1fg) de DNA do controle positivo, plasmídeo C1, o qual contém o fragmento da gp 160 do envelope viral. Para a primeira reação de PCR para o gene *env* verificou-se a detecção do produto de PCR até a concentração de 0,1 pg de DNA. Foi então realizada a *nested* PCR utilizando-se os iniciadores mais internos para as maiores diluições, onde a primeira reação de PCR não apresentou produtos visíveis em gel de agarose. Partindo-se da concentração de 1 pg, seguiu-se a diluição seriada até 1 fg. A segunda reação de PCR demonstrou a grande sensibilidade da *nested* PCR, pois quantidades ínfimas puderam ser amplificadas até a concentração de 1fg de DNA plasmidial (Figura 7).

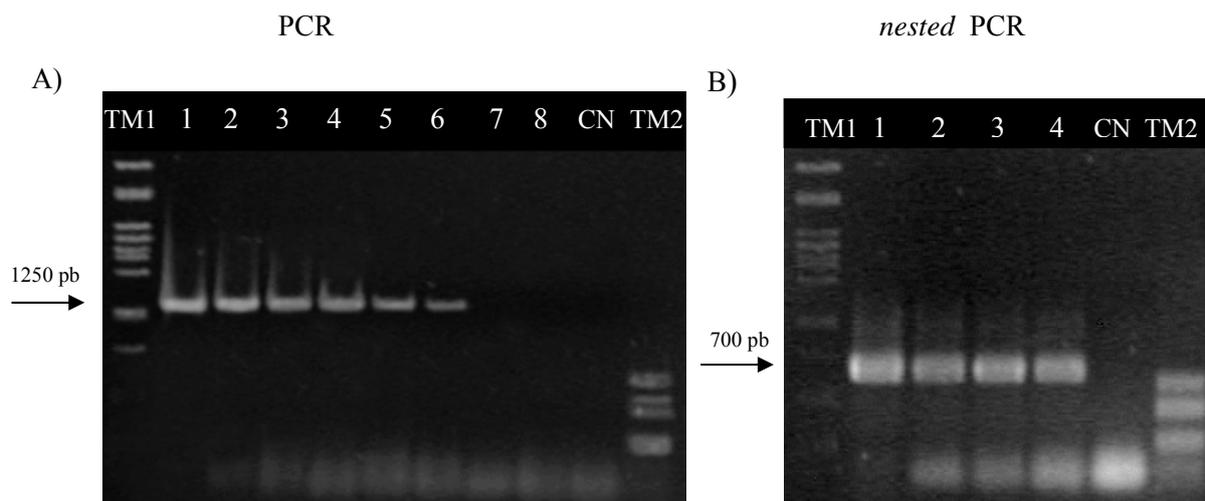


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de amplificação do gene *env* utilizando-se diluições seriadas do DNA do plasmídeo C1 como molde na reação de PCR. TM1 e TM2: padrões de tamanho molecular (TM1= fago lambda digerido com *Pst*I e TM2= plasmídeo pUC 18 digerido com *Hae*III); A) primeira reação de PCR. Canaletas 1 a 8: diluições seriadas de 10ng a 1fg do DNA do plasmídeo C1; CN: controle negativo da reação (sem adição de DNA); B) Reação de *nested* PCR. Canaletas 1-4: diluições seriadas de 1pg a 1fg de DNA do plasmídeo C1.

Para a detecção do gene *gag* do HIV também foram realizados experimentos de limite de sensibilidade utilizando-se diluições seriadas do DNA do plasmídeo de referência G1 e as condições de PCR padronizadas para amplificação deste gene. Pôde-se observar que a reação para a detecção do gene *gag* do HIV apresentou uma sensibilidade de 1 pg na primeira reação de PCR e um aumento de sensibilidade de 10X na *nested* PCR (dados não mostrados). Com base nestes resultados, estabelecemos como padrão a utilização de 1 pg de DNA plasmidial como controle positivo das reações de PCR e *nested* PCR para a detecção do gene *gag* do HIV.

Com a finalidade de verificar a especificidade da metodologia proposta, foram realizadas reações de PCR e *nested* PCR com os iniciadores dirigidos aos genes *gag* e *env* do HIV utilizando diferentes concentrações de DNA humano sem infecção pelo HIV. Nestes experimentos foi possível verificar que os iniciadores ED5, ED12, ES7 e ES8 dirigidos ao gene *env* e os iniciadores H1G822, H1GHMA1317, H1G1584 e G17 complementares ao gene *gag* não apresentam ligações inespecíficas com o DNA humano,

não tendo revelado nenhum produto de amplificação tanto na PCR quanto na *nested* PCR (dados não mostrados).

Para verificar se o DNA genômico humano isolado dos linfócitos totais exercia algum papel inibitório sobre a amplificação dos genes *env* e *gag* do HIV, 1000ng, 100ng, 10ng e 1ng de DNA genômico foi adicionado de 1fg de DNA plasmidial C1 ou G1 referente aos genes *env* e *gag*, respectivamente. Juntamente com estas amostras foram amplificados controles positivos (DNA plasmidial) e negativos (água e amostras HIV negativas). No teste de reconstituição para o gene *env* os resultados demonstraram que, em pequenas quantidades de DNA genômico humano ocorre a amplificação do gene viral, porém em quantidades próximas de 1.000 ng de DNA genômico esta amplificação é inibida (Figura 8).

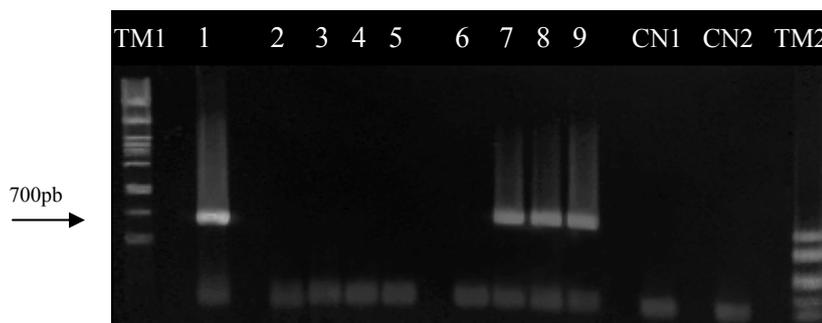


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando o resultado do teste de reconstituição para o gene *env*. TM1 e TM2: padrões de tamanho molecular (TM1= fago lambda digerido com *Pst*I e TM2= plasmídeo pUC 18 digerido com *Hae*III); canaleta 1: Controle Positivo; canaletas 2-5: diluições seriadas de 1.000ng a 1ng de DNA HIV negativo; canaleta 6-9: diluições seriadas de 1.000ng a 1ng de DNA HIV-1 negativo adicionadas de 1fg DNA plasmidial C1; CN1: controle negativo (sem adição de DNA) da primeira reação de PCR; CN2: controle negativo (sem adição de DNA) da reação de *nested* PCR.

No teste de reconstituição realizado com o gene *gag*, a primeira reação de PCR apresentou grande quantidade de bandas não específicas. Entretanto, realizando-se a *nested* PCR pôde-se observar um aumento da especificidade traduzido pela amplificação controles positivos não apresentaram na primeira reação a banda característica de 830pb, porém na *nested* PCR pode-se observar a amplificação da região de 460pb, confirmando a

necessidade da técnica de *nested* PCR no aumento da sensibilidade de detecção. Esta reação foi específica para a amplificação do DNA plasmidial, não sendo observada a amplificação de bandas inespecíficas em função da presença de DNA humano não infectado (resultados não apresentados). A reação de *nested* PCR foi mais sensível para amplificar o gene *env* (1fg) do que o gene *gag* (0,1pg).

4.4 Detecção dos genes virais em amostras de pacientes HIV positivos

Com base nos resultados obtidos na padronização da técnica de *nested* PCR, em todas as reações de amplificação de amostras de pacientes foi estabelecido o emprego de: dois controles positivos consistindo dos plasmídeos de referência C1 e G1 em diferentes concentrações; DNA humano não infectado em três diluições (1.000ng, 100ng e 10ng) e controle negativo contendo apenas água (CN) e três diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) de cada amostra a ser testada, considerando-se a possível presença de substâncias inibitórias. A Figura 9 representa a detecção dos genes virais *env* e *gag* em amostras de dois pacientes. Na parte superior da figura está representada a primeira reação de PCR e na parte inferior a *nested* PCR. Foi possível observar na Figura 9 a melhora da sensibilidade e da especificidade na detecção dos genes *env* e *gag* do HIV através da reação de *nested* PCR em amostras HIV positivas.

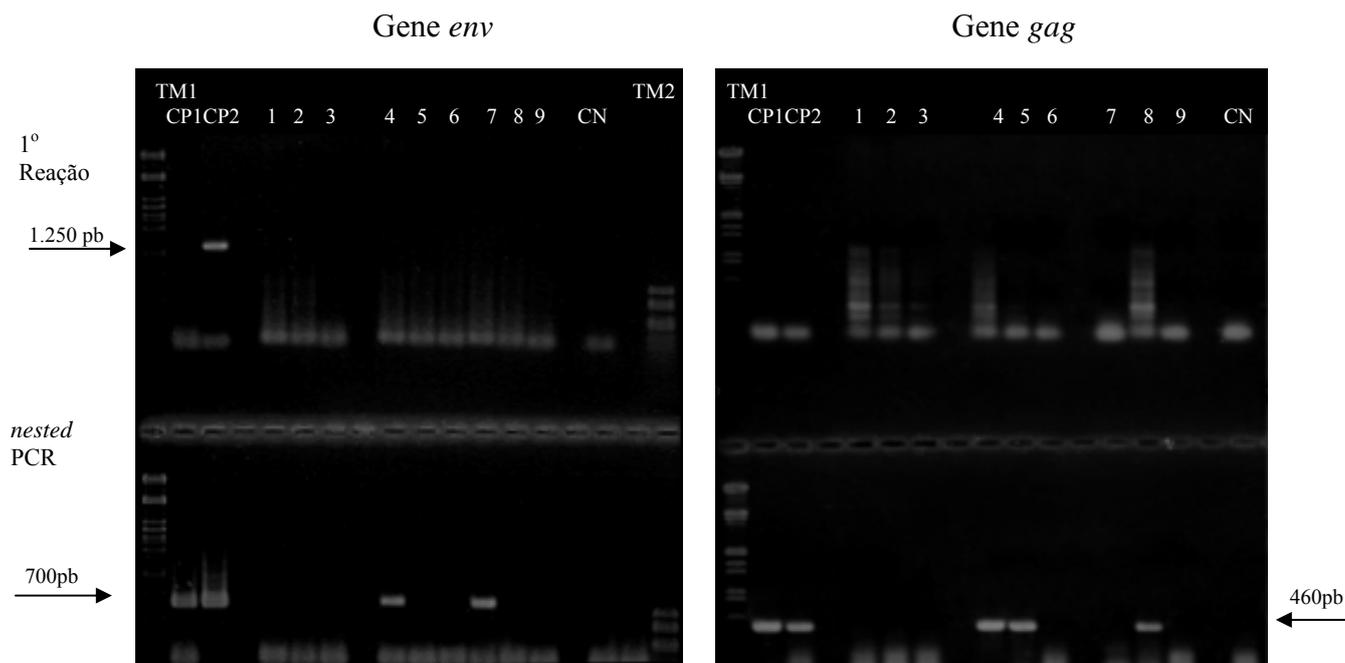


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio demonstrando a detecção dos genes virais (*gag* e *env*) em amostras de pacientes. CN: controle negativo; TM1 e TM2: padrões de tamanho molecular (TM1= fago lambda digerido com *Pst*I e TM2= plasmídeo pUC 18 digerido com *Hae*III); CP: controles positivos; canaletas 1-3: amostra de DNA de paciente HIV negativo; canaletas 4-6 e 7-9: amostras de DNA de pacientes HIV positivos, nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000, respectivamente.

Considerando-se a possível presença de substâncias inibidoras da atividade da enzima *Taq* DNA polimerase e as diferenças nas quantidades, assim como nas relações de DNA humano e de DNA proviral das diferentes amostras, foram utilizadas nas reações de PCR para detecção do gene *env* três diluições de cada amostra.

Foi possível a amplificação do gene *gag* em todas as amostras analisadas através da *nested* PCR e a amplificação do gene *env* pela mesma estratégia foi satisfatória em 66 das 88 amostras testadas (75% das amostras). Esta reduzida eficiência está provavelmente relacionada com a elevada variabilidade genética da região do envelope viral.

4.5 Sequenciamento do DNA das amostras

Para a realização do sequenciamento direto de produtos de PCR foi necessária a purificação das amostras. A técnica de precipitação utilizando-se isopropanol 70% e etanol

70% apresentou bons resultados, eliminando o excesso de nucleotídeos e iniciadores não incorporados.

A eficiência da técnica de seqüenciamento automatizado de produtos purificados de PCR, utilizando-se os mesmos iniciadores da reação de amplificação, apresentou-se eficaz e satisfatória. Das 88 amostras de DNA purificadas, todas puderam ser amplificadas, purificadas e seqüenciadas para o gene *gag* e 66 amostras (75%) puderam ser amplificadas e seqüenciadas para o gene *env*. Dez amostras (11%) do gene *gag* apresentaram leitura inferior à 450 pb sendo necessário a realização de novo seqüenciamento utilizando-se o iniciador reverso g17. A qualidade dos cromatogramas gerados foi analisada através do pacote Phred/Phrap/Consed sendo consideradas válidas apenas as seqüências com qualidade Phred igual ou superior a 20 (EWING, GREEN, 1998, EWING, HILLIER, WENDL, et al., 1998). As amostras foram seqüenciadas em triplicata e as seqüências consenso geradas pelo programa Phrap foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados de *Los Alamos National Laboratory, EUA* (LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY, 2005) através do programa Blast-HIV para a identificação dos subtipos virais.

Muitas amostras empregadas neste estudo apresentaram valores de *e-value* e *score* muito semelhantes quando comparados com diferentes subtipos virais de referência, o que representava incerteza na identificação dos subtipos virais presentes naquelas amostras. Diante disto, fez-se necessário um estudo filogenético das amostras, utilizando-se as 66 amostras para as quais foi possível obter seqüências de ambos os genes *env* e *gag* e seqüências de amostras de referência depositadas no banco de dados de *Los Alamos*. Todas as seqüências consenso obtidas pelo programa Phrap de cada gene foram então alinhadas através do programa Clustal X[®] v.1.83 (THOMPSON, GIBSON, PLEWNIAK, et al., 1997) e analisadas pelo programa MEGA[®] versão 2.1 (KUMAR, TAMURA, JAKOBSEN,

et al., 2001). Para esta análise, que estima a proximidade entre as amostras, foram utilizados os métodos da máxima parcimônia (200 replicatas) e *neighbor-joining* (1.000 replicatas) utilizando-se os parâmetros padrões de ambos os programas. Uma vez que os filogramas resultantes de ambos os métodos foram concordantes, tanto para o gene *env* como para o gene *gag*, serão apresentados somente os filogramas obtidos através da análise por *neighbor-joining*.

A análise comparativa das seqüências do gene *env* obtidas das amostras com seqüências representativas dos diferentes subtipos virais do HIV (B, C e F) disponíveis no banco de dados revelou a formação de três agrupamentos distintos formados pelas seqüências dos diferentes subtipos virais, sendo possível identificar amostras do subtipo B, C e F circulantes no Estado de Santa Catarina (Figura 10).

A análise das seqüências do gene *gag* através do programa Blast-HIV apresentou valores de *e-value* e *score* muito próximos e freqüentemente iguais tornando difícil a classificação correta em subtipo F ou B/F para este gene. Na construção da árvore filogenética para o gene *gag*, foi verificado que o subtipo F apresentou um ramo distante e isolado das seqüências das amostras estudadas, sendo então substituído pela seqüência do recombinante BF, que se apresentou mais próximo das amostras na análise filogenética. Assim, foram utilizadas amostras de referência para os subtipos B, C e BF disponíveis no banco de dados de *Los Alamos*. A árvore filogenética evidenciou três grupos distintos onde as amostras foram agrupadas com seu respectivo grupo de referência (Figura 11). A comparação das seqüências do gene *gag* obtidas das amostras de HIV isoladas no Estado de Santa Catarina com seqüências representativas dos diferentes subtipos virais, identificou a prevalência do subtipo C (51 amostras), seguido do subtipo B (27 amostras) e F (2 amostras) (Figura 11).

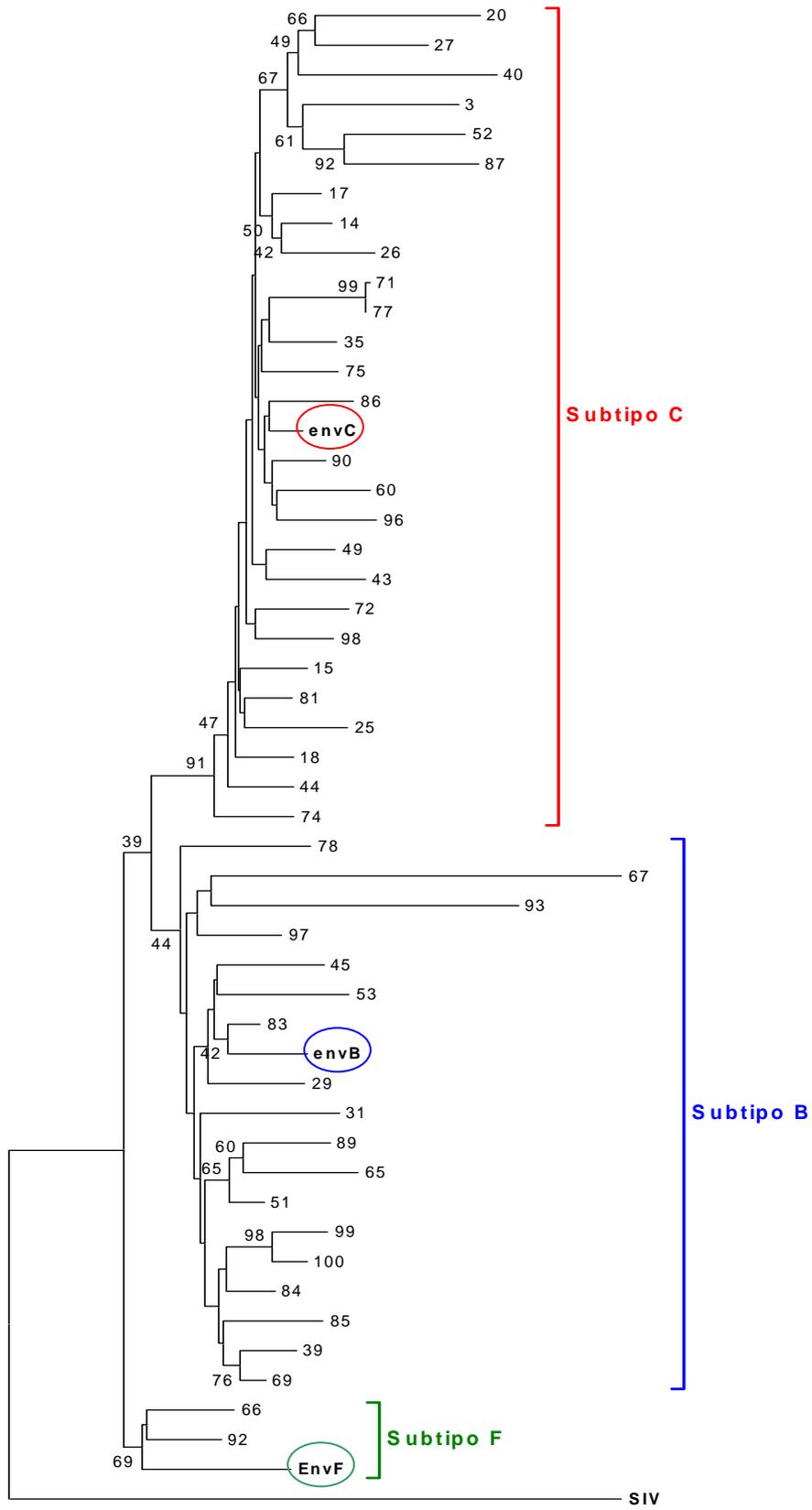


Figura 10: Árvore filogenética resultante da análise das seqüências da região V3 do gene *env* do envelope viral do HIV isolado de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina por *neighbor-joining* (1.000 replicatas) utilizando o programa MEGA[®] v. 1.02. EnvB, EnvC e EnvF são seqüências representativas dos subtipos virais B (GenBank KO3455), C (GenBank U52953), F (GenBank AF005494) e SIV é uma seqüência do vírus da imunodeficiência símia (GenBank DQ136310) utilizado como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* são indicados em cada nó da árvore. A barra com escala representa a distância evolucionária de 0,1 nucleotídeos por posição na seqüência analisada.

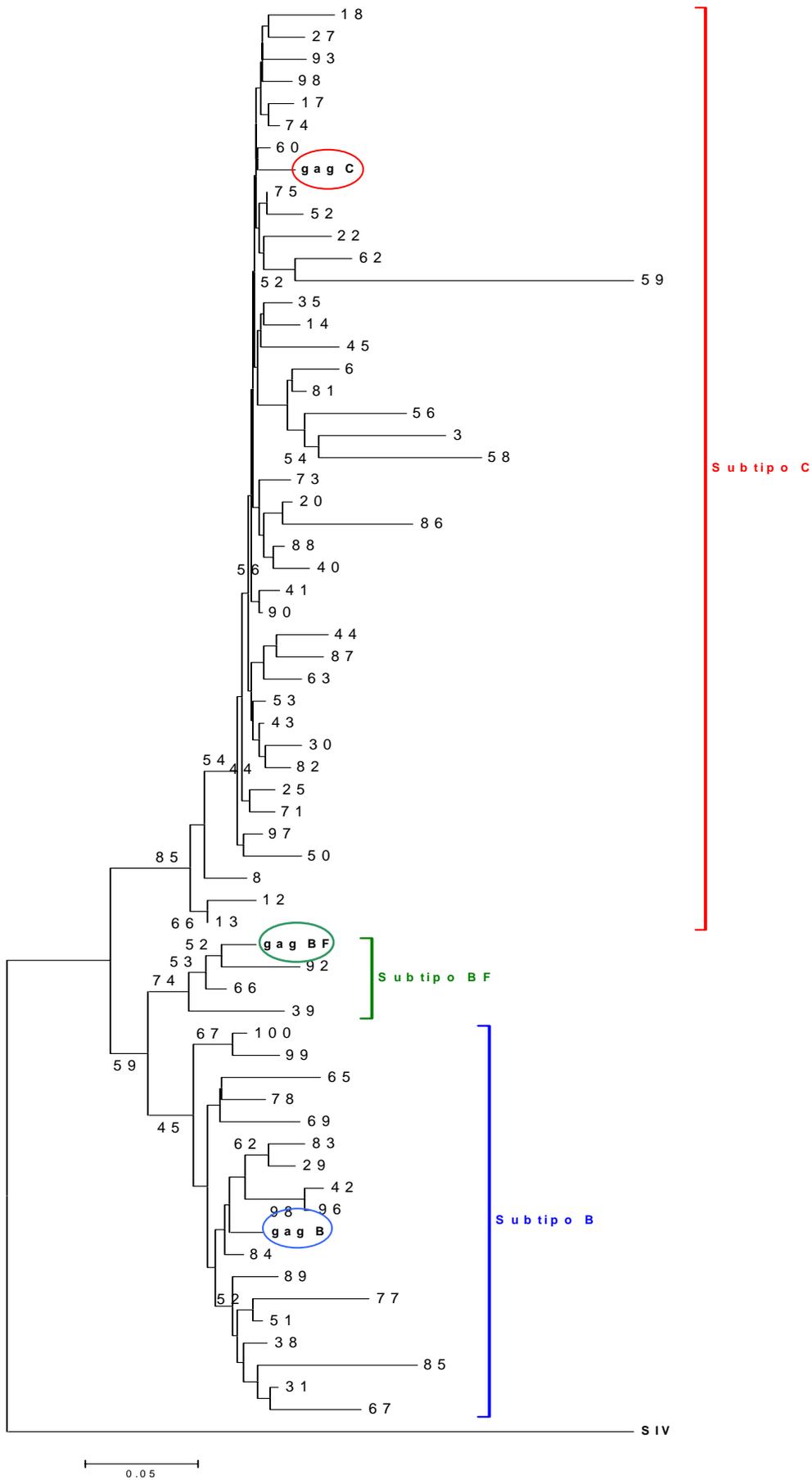


Figura 11: Árvore filogenética resultante da análise das seqüências da região p24-p7 do gene *gag* do HIV isolado de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina por *neighbor-joining* (1.000 replicatas) utilizando o programa MEGA[®] v. 1.02. *gagB*, *gagC* e *gagBF* são seqüências representativas dos subtipos virais B (GenBank KO3455), C (GenBank U52953), BF (GenBank AF385936) e SIV é uma seqüência do vírus da imunodeficiência símia (GenBank DQ136310) utilizado como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* são indicados em cada nó da árvore. A barra com escala representa a distância evolucionária de 0,05 nucleotídeos por posição na seqüência analisada.

A comparação das análises filogenéticas para os genes *env* e *gag* demonstradas nas Figuras 10 e 11 revela a alteração de posicionamento de algumas amostras, como por exemplo as amostras 45, 53, 93 e 97. Esta observação pode ser devida a diferentes fatores, podendo ser explicada por uma infecção mista do indivíduo por diferentes subtipos virais ou pela ocorrência de formas recombinantes do HIV. Como alternativa para identificar os subtipos presentes no gene *env* das 22 amostras que não geraram seqüências, foram utilizados os pares de iniciadores: ED3/ED14 e ED31/ED33. A utilização destes iniciadores possibilitou a identificação de mais 14 amostras, totalizando 80 amostras seqüenciadas em ambos os genes virais. Analisando somente o gene *env* foi possível identificar 45 amostras do subtipo C, 32 amostras do subtipo B e 3 amostras do subtipo F. Porém, quando estudado o gene *gag* destas mesmas amostras foi possível identificar perfis distintos sendo 51 amostras do subtipo C, 27 amostras do subtipo B e 2 amostras identificadas como recombinantes B/F.

A classificação final das amostras com base nas seqüências obtidas revelou prevalência de 48% do subtipo C, seguido 23% do subtipo B e as seguintes formas recombinantes: 15% *envB/gagC*, 7,5% *envC/gagB*, 3,75% *envF/gagB* e 2,5% *envB/gagF*, como demonstrado na Figura 12. Além destas 80 amostras estudadas, 8 amostras puderam ser caracterizadas apenas pelo gene *gag*, sendo todas classificadas como subtipo C. A Figura 12 demonstra um perfil geral das amostras provenientes dos pacientes que puderam ser genotipadas através do estudo dos dois genes virais, *env* e *gag*.

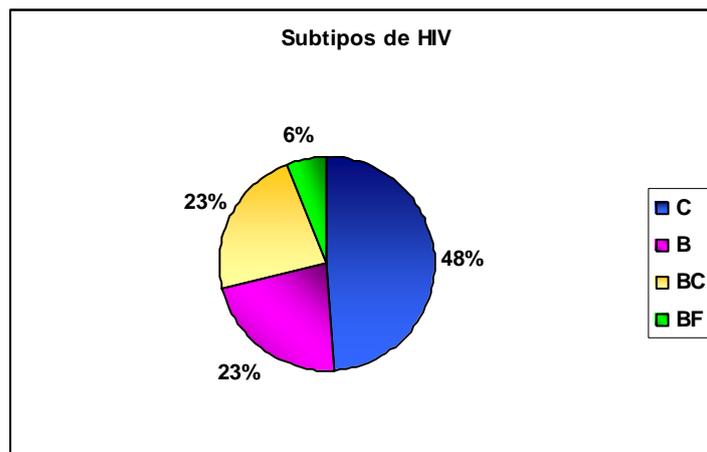


Figura 12. Distribuição dos subtipos do vírus HIV identificados através da análise dos genes *env* e *gag* em amostras de pacientes de Santa Catarina.

4.6 Identificação da variante B'

Através da análise do gene *env* foi possível a identificação de 32 amostras como subtipo B. Destas, 27 puderam ser amplificadas na reação de PCR utilizando os iniciadores ED3/ED14 e ED31/ED33. A Figura 13 representa o produto de *nested* PCR após clivagem com a enzima *FokI* de amostras caracterizadas como subtipo B (canaletas 2-16). Observou-se que a técnica de RFLP foi capaz de identificar sete amostras com o motivo GWGR, apresentando o perfil da variante B', identificados pela presença de uma banda de 410 pb quando da eletroforese do produto de digestão pela enzima *FokI* (Figura 13). Amostras que apresentaram perfis de fragmentos diferentes de 410 pb não foram caracterizadas como subtipo B'.

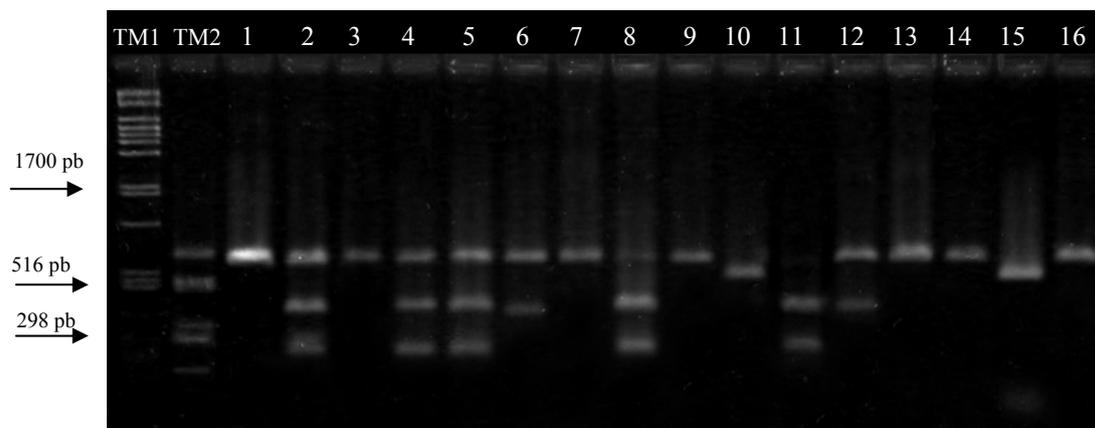


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídio revelando os produtos de digestão dos fragmentos do gene *env* amplificados via *nested* PCR com os iniciadores ED3/ED14 e ED31/ ED33 pela enzima *FokI*. Canaleta 1: Produto de *nested* PCR não digerido; canaletas 2 a 16: produtos de *nested* PCR não digeridos de diferentes pacientes (canaletas 3, 7, 9, lambda digerido com *PstI*; TM2: plasmídeo pUC 18 digerido com *HaeIII*.

4.7 Relação dos dados clínicos com o subtipo viral encontrado

A análise dos dados clínicos correlacionados com o subtipo viral foi realizada em 80 amostras que puderam ser caracterizadas em ambos os genes, *env* e *gag*. Esta amostra foi representada por 44 mulheres (55%) e 36 homens (45%) com uma idade média de 37,63 anos (DP: 11,38) entre as mulheres e 40 anos (DP: 9,2) entre os homens.

Relacionando-se os dados obtidos através da análise molecular das amostras isoladas com os dados dos pacientes foi possível verificar a predominância do subtipo C do HIV entre indivíduos heterossexuais, porém a relação entre o subtipo B e infecção homossexual ou entre usuários de drogas injetáveis não pôde ser estabelecida. Todos os pacientes contaminados através de transfusão sanguínea apresentaram o subtipo C do HIV. Dentre os indivíduos heterossexuais, o subtipo C representou 47,5 % das infecções, seguido pela forma recombinante B/C com 27,8 %, 18 % do subtipo B e 6,5 % do subtipo B/F. Foi analisada a prevalência dos subtipos através do tempo nas amostras coletadas no Estado de Santa Catarina. Para isso, foi comparada a provável data de infecção de cada

paciente com o subtipo encontrado, sendo necessário o agrupamento das mesmas em 4 períodos (anterior a 1990, 1991-1995, 1996-2000 e 2001-2004) (Figura 14).

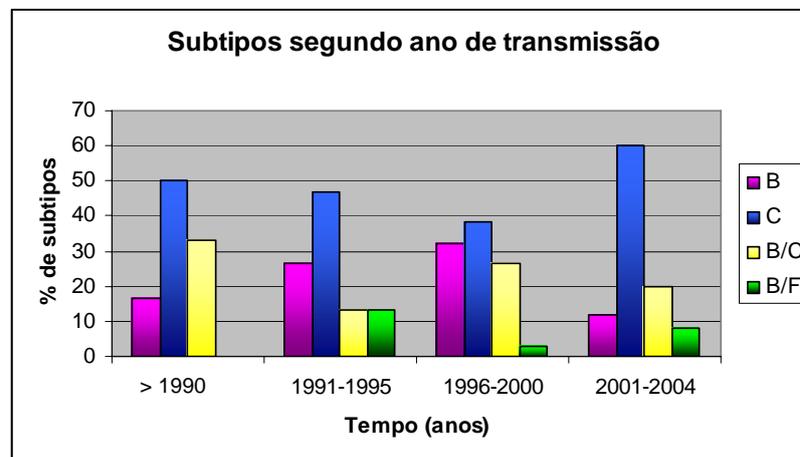


Figura 14: Prevalência de subtipos do vírus HIV de acordo com o provável ano de diagnóstico de indivíduos infectados acompanhados no Hospital Regional São José e no CTA.

Através desta relação foi possível a detecção da presença do subtipo B e C em datas anteriores a 1990. Neste período também foram encontradas amostras recombinantes B/C. O subtipo recombinante B/F foi identificado entre amostras provavelmente infectadas no período entre 1991-1995. A prevalência do subtipo C entre as amostras analisadas foi constante, independente do período analisado. Não foi encontrada relação significativa entre a carga viral, contagem de células CD4 e os subtipos virais.

5 DISCUSSÃO

A elevada variabilidade genética do HIV oferece uma contínua geração de variantes moleculares entre o mesmo subtipo viral e formas recombinantes entre os subtipos virais que se encontram distribuídas por todo o mundo. A diversidade do HIV é resultante de três fatores que atuam independentemente: alta taxa de replicação, freqüente introdução de mutações e recombinação (COFFIN, 1995). Por conseqüência, a epidemia do HIV está em constante mudança sendo influenciada por fatores virais, mas também por fatores humanos como migração, comércio de produtos e pessoas e mudanças sócio-culturais (KIJAK, MCCUTCHAN, 2005). Os estudos moleculares podem fornecer informações importantes para um melhor entendimento da variabilidade genética do HIV e representar uma importante ferramenta no monitoramento da dinâmica da distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV.

No início da epidemia mundial os testes de diagnóstico eram desenvolvidos baseados em características apresentadas pelo HIV do subtipo B. Atualmente, estão sendo estudadas novas tecnologias que possibilitem a detecção de anticorpos contra todos subtipos dos grupos M e O. Esta adaptação também foi realizada nos testes de quantificação de RNA, o que gerou melhores resultados para pacientes que continham vírus de subtipos não-B (PAREKH, PHILLIPS, GRANADE, et al., 1999, SWANSON, SORIANO, DEVARE, et al., 2001), visto que há diferenças nos níveis de carga viral entre os diferentes subtipos (HU, VANICHSENI, MASTRO, et al., 2001). Assim como os testes diagnóstico, os tratamentos antiretrovirais disponíveis também foram desenvolvidos baseados no HIV do subtipo B. Sabe-se que o grupo O do HIV é naturalmente resistente a inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídicos e o que subtipo G é menos susceptível a inibidores da protease (DESCAMPS, APETREI, COLLIN, et al., 1998, DESCAMPS, COLLIN, LETOURNEUR, et al., 1997). Além disso, verificou-se que

mutações associadas com resistência à antiretrovirais é distinta entre os subtipos B e C, o que deve direcionar o desenvolvimento de novas terapias (GROSSMAN, PAXINOS, AVERBUCH, et al., 2004). Alguns estudos de acompanhamento clínico de pacientes soropositivos encontraram uma relação entre a progressão mais veloz para AIDS e o subtipo de HIV do paciente (KANKI, HAMEL, SANKALE, et al., 1999). Entretanto, poucos estudos tem sido realizados nesta área e existem resultados contraditórios (ALAEUS, LIDMAN, BJORKMAN, et al., 1999).

A identificação dos subtipos virais pode ser realizada pela técnica de HMA (*Heteroduplex Mobility Assay*), onde a maioria dos reagentes necessários é fornecida pelo *NIH AIDS Research & Reference Reagent Program*, apresentando-se assim como uma técnica de baixo custo. Geralmente são utilizados nesta técnica plasmídeos referentes aos subtipos predominantes na região para que haja uma ligação com o subtipo específico do paciente. Entretanto se houver o surgimento de novos subtipos e a possibilidade de formas recombinantes, torna-se necessário o estudo de todos os plasmídeos de referência disponíveis no *kit* e a análise de mais de um gene viral, aumentando o tempo e o custo destas análises. Além disso, a identificação de formas recombinantes exige uma adequação da técnica de HMA (BUONAGURO, TAGLIAMONTE, TORNESELLO, et al., 2005).

Outra técnica utilizada para a identificação dos subtipos de HIV é a sorotipagem. Esta técnica é baseada na ligação de anticorpos existentes no soro do paciente com peptídeos presentes na região V3 dos diferentes subtipos do HIV-1. Porém, esta não é capaz de distinguir entre amostras do subtipos B e F (BONGERTZ, GUIMARÃES, SOARES-DA-COSTA, et al., 1999) e entre os subtipos A e C, sendo ainda incapaz de identificar formas recombinantes (BONGERTZ, OUVENEY, TEIXEIRA, et al., 2003, SMITH, GERETTI, OSNER, et al., 2005). Além disso, esta técnica apresenta resultados discordantes com o seqüenciamento de nucleotídeos da amostras de subtipos não-B, o que

a torna pouco utilizada nos levantamentos epidemiológicos (SMITH, GERETTI, OSNER, et al., 2005). Tanto a técnica de HMA quanto a sorotipagem não são aplicáveis em locais onde haja a possibilidade de grande variabilidade genética do HIV, devido à alta frequência de resultados indeterminados e incorretos (BUONAGURO, TAGLIAMONTE, TORNESELLO, et al., 2005). Uma alternativa para a classificação dos subtipos virais é a técnica de seqüenciamento de nucleotídeos, que diante do exposto, representa o método de referência para a classificação dos subtipos virais, possibilitando a identificação de formas recombinantes e a análise filogenética das amostras.

Para o seqüenciamento faz-se necessário a realização inicial da técnica de amplificação dos genes virais de interesse através da PCR. A PCR demonstra ser uma ferramenta sensível e específica, podendo assim ser utilizada na análise da diversidade genética de uma determinada população. Entretanto, os protocolos padrões de uma reação de PCR nem sempre são adequados, sendo necessário uma adequação da reação à seqüência alvo a ser amplificada, aos iniciadores e aos tampões utilizados (INNIS, GELFAND, SNINSKY, 1999). Para aumentar a sensibilidade da detecção de HIV em amostras clínicas são utilizadas reações de *nested* PCR (DELWART, SHEPPARD, WALKER, et al., 1994, GUIMARÃES, MOREIRA, MORGADO, 2002).

Para a caracterização dos subtipos de HIV geralmente é utilizado o gene *env*, devido a sua maior variabilidade genética. Outros genes podem ser estudados com este intuito, como por exemplo, o gene *gag*, que contém menor variação nas seqüências intersubtipos que o gene *env* (LOUWAGIE, MCCUTCHAN, PEETERS, et al., 1993). O estudo destes genes em conjunto possibilita a identificação de formas recombinantes ou em mosaico (GUIMARÃES, DOS SANTOS MOREIRA, LOUREIRO, et al., 2002, MCCUTCHAN, SALMINEN, CARR, et al., 1996). A necessidade desta análise conjunta é justificada em estudos realizados no Brasil, devido a vários registros de formas

recombinantes em diferentes regiões do país (GUIMARÃES, DOS SANTOS MOREIRA, LOUREIRO, et al., 2002, RAMOS, TANURI, SCHECHTER, et al., 1999, SABINO, SHPAER, MORGADO, et al., 1994).

No presente estudo, verificou-se um aumento da especificidade e sensibilidade na detecção do HIV quando utilizada a reação *nested* PCR, através da redução de bandas espúrias e detecção do fragmento esperado, somente na segunda reação de PCR (Figura 7). Inúmeras tentativas para amplificar a região do envelope viral de 22 amostras que se mostraram negativas na *nested* PCR foram infrutíferas, provavelmente devido a existência de polimorfismos nos sítios de ligação dos iniciadores na região V3-V5. Outra hipótese como a baixa concentração de DNA molde foi descartada, já que, o teste de sensibilidade demonstrou que a amplificação do gene *env* necessitava de quantidades menores que o gene *gag*. Outros trabalhos relatam a dificuldade de amplificação do gene *env* do HIV e apontam como solução deste problema a utilização iniciadores alternativos (CASTRO, ECHEVERRIA, DEIBIS, et al., 2003, DELWART, SHEPPARD, WALKER, et al., 1994). Neste contexto, utilizaram-se os iniciadores ED3/ED14 e ED31/ED33 sendo possível a amplificação de mais 14 amostras, totalizando 80 (90,9%) amostras genotipadas para ambos os genes virais. Os iniciadores utilizados neste trabalho para amplificação do gene *env* foram desenhados baseados no HIV circulante no início dos anos 90, e uma vez que este vírus varia seu genoma a cada replicação, pode-se explicar a dificuldade de ligação dos iniciadores ao DNA alvo das formas atualmente circulantes. A técnica de purificação utilizando-se isopropanol e etanol representou uma alternativa de baixo custo para o seqüenciamento direto de produtos de PCR onde a utilização de *kits* de purificação ou de clonagem pode ser dispensada.

A classificação das amostras com base na análise comparativa das seqüências obtidas através do seqüenciamento direto de produto de PCR revelou prevalência 48% do

subtipo C nas amostras testadas, 23% do subtipo B e as formas recombinantes B/C (23%) e B/F (6%) (Figura 13). Além destas amostras foi possível identificar mais 8 amostras, porém a caracterização pôde ser realizada apenas para o gene *gag*, sendo todas classificadas como subtipo C.

Ao comparar as seqüências de diferentes subtipos de referência de HIV com as amostras estudadas verificou-se o agrupamento das mesmas com os subtipos correspondentes, sendo que estes dados corroboram com a análise pelo programa BLAST (Figuras 10 e 11). Apenas a amostra de número 92 que no programa BLAST foi classificada como subtipo B para o gene *gag*, na árvore filogenética foi agrupada com o subtipo recombinante B/F. Provavelmente esta amostra apresenta recombinações em todo genoma viral, pois, analisando somente o gene *gag* identificou-se a forma recombinante B/F. Outra possibilidade é o surgimento de uma nova variante viral. Estas hipóteses somente serão comprovadas após a realização de novas análises, onde será incluído um número maior de grupos de referência e a análise filogenética de grupos menores de amostras serão estudados isoladamente.

A análise filogenética das seqüências do gene *env* foi capaz de separar as amostras em três grupos, agrupando-as com os subtipos de referência B, C e F. O estudo filogenético do gene *gag* proporcionou a classificação adequada das amostras, já que os valores de *score* e *e-value* encontrados no programa BLAST entre os subtipos foi muito semelhante. Estes valores encontrados no BLAST demonstram a baixa variabilidade do gene *gag*, que já está bem estabelecido em estudos anteriores (LOUWAGIE, MCCUTCHAN, PEETERS, et al., 1993).

Os baixos valores de *bootstrap* representam uma grande proximidade genética entre as amostras, entretanto, esta análise foi capaz de separar as amostras com seus grupos de referência e assim foi considerado que um valor de *bootstrap* de 60 pode inferir uma

diferença filogenética entre as amostras. Através dos valores de *bootstrap* observados também foi inferido que as amostras do subtipo C possuem o genoma mais conservado que as amostras do subtipo B. Apesar de ocorrer o agrupamento entre as seqüências das amostras estudadas no presente trabalho com seqüências de amostras de referência, verifica-se a necessidade de incorporar à análise filogenética outras seqüências de referência para aumentar a segurança destes resultados.

A presença de muitos subtipos de HIV na mesma região geográfica tem sido registrada em muitos países do mundo, especialmente em países do continente africano. Entretanto, países da Europa, Austrália e América do Norte apresentam quase que exclusivamente o subtipo B como vírus circulante (ESPARZA, BHAMARAPRAVATI, 2000). Na América do Sul, o subtipo B é o predominante, seguido do subtipo F (RUSSEL, 2000). Pesquisas recentes registraram a circulação de subtipos C na Argentina, Paraguai e Uruguai (CARRION, EYZAGUIRRE, MONTANO, et al., 2004).

Santa Catarina é um dos Estados brasileiros com maior incidência de casos de AIDS (25,9 casos / 100 mil habitantes). Inúmeros fatores podem explicar as razões dessa elevada incidência, como a presença de cidades portuárias (Itajaí, Laguna e São Francisco do Sul), turísticas (terceiro maior pólo turístico nacional) e proximidade territorial com países como Argentina, Paraguai e Uruguai. Esta proximidade territorial pode aumentar os número de infecções em estados brasileiros devido ao falho controle da epidemia e indisponibilidade de medicamentos pelo governo destes países (UNAIDS - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS / WHO, 2005). Outro fator importante é a possível influência da epidemia de AIDS destes países nas características moleculares do HIV no Estado, através do surgimento de novos subtipos ou formas recombinantes. Além disso, Santa Catarina tem uma grande relação territorial como Estado do Rio Grande do Sul que apresenta a maior taxa de incidência de AIDS por 100.000

habitantes (29,2 casos) do país. No Rio Grande do Sul o perfil molecular do HIV tem apresentado uma redução do subtipo B e um aumento constante do subtipo C (SOARES, M. A., DE OLIVEIRA, BRINDEIRO, et al., 2003). Já nos países próximos de Santa Catarina ocorre a prevalência do subtipo B, formas recombinantes B/F e apenas casos isolados do subtipo C (CARRION, EYZAGUIRRE, MONTANO, et al., 2004). Alguns estudos prévios descrevem o perfil molecular da epidemia de AIDS na região Sul do Brasil (SOARES, E. A., MARTINEZ, SOUZA, et al., 2005, SOARES, M. A., DE OLIVEIRA, BRINDEIRO, et al., 2003), porém não incluem amostras de Santa Catarina.

Através da análise molecular das amostras catarinenses estudadas identificou-se a predominância do subtipo C, com prevalência de 48%, chegando a 71,25% se considerar as formas recombinantes. Este perfil representa características epidemiológicas diferentes do restante do Brasil que apresenta o subtipo B como predominante (BONGERTZ, BOUHABIB, BRIGIDO, et al., 2000, BRINDEIRO, R. M., DIAZ, SABINO, et al., 2003). O subtipo C corresponde a 56% de todas as infecções causadas pelo HIV em todo o mundo (ESPARZA, BHAMARAPRAVATI, 2000). A região sudeste do Brasil apresenta uma baixa frequência deste subtipo (aproximadamente 5-10%), sendo praticamente ausente no restante do país. Pesquisas prévias no sul do país, incluindo os Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul, revelam um crescimento em grandes proporções do subtipo C, sendo que sua incidência pode variar entre 25 a 45% dependendo da região estudada (BRINDEIRO, R. M., DIAZ, SABINO, et al., 2003).

Alguns estudos apresentam o subtipo C como um vírus mais infeccioso e que se espalha mais rapidamente que outros subtipos (DE OLIVEIRA, SALEMI, GORDON, et al., 2004), isto poderia explicar o aumento das infecções pelo HIV-1 C no Rio Grande do Sul e conseqüentemente a prevalência nas amostras coletas em Santa Catarina por sua proximidade territorial. O surgimento do subtipo C no Brasil foi reportado em um paciente

do Estado Rio Grande do Sul diagnosticado em 1990 (SOARES, E. A., SANTOS, PELLEGRINI, et al., 2003), entretanto, quando estratificado o resultado da subtipagem viral por provável ano de contágio verificou-se a presença de infecções por este subtipo em anos anteriores a 1990, o que sugere a presença deste subtipo viral em Santa Catarina desde o início da epidemia no Sul do Brasil. Alguns trabalhos defendem a hipótese do subtipo C ter sido recentemente introduzido no Brasil, discordando com os resultados encontrados neste trabalho e com as pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul (GUIMARÃES, MOREIRA, MORGADO, 2002, RODENBURG, LI, TRASK, et al., 2001).

Além disso, foram identificados diferentes subtipos virais quando analisados concomitantemente os genes *env* e *gag* (Figuras 10 e 11), o que representa a presença de vírus recombinantes ou a co-infecção por mais de um subtipo viral no mesmo indivíduo (CORNELISSEN, KAMPINGA, ZORGDRAGER, et al., 1996). Estima-se que 10% a 40% do HIV-1 circulante na África seja formado por subtipos discordantes entre os genes *env* e *gag*, sendo que este número varia dependendo do número de subtipos circulantes na região (PEETERS, SHARP, 2000). Um estudo realizado na cidade de Manaus identificou 45% das amostras como recombinantes B/F (VICENTE, OTSUKI, SILVA, et al., 2000). A presença destes recombinantes também foi observada em outras regiões do país como São Paulo (SA FILHO, SANABANI, DIAZ, et al., 2005) e em outros países da América do Sul (RUSSELL, CARCAMO, WATTS, et al., 2000). Devido a presença de subtipos distintos na mesma região, torna-se freqüente a identificação de formas recombinantes B/C e B/F em países como Uruguai, Argentina, Bolívia e Venezuela (AULICINO, KOPKA, ROCCO, et al., 2005, CARR, AVILA, GOMEZ CARRILLO, et al., 2001).

Nos Estados do RS e PR foi descrita a presença de recombinantes B/C representando 25% das infecções entre 2001 e 2002. (BRINDEIRO, R. M., DIAZ,

SABINO, et al., 2003). Entre as amostras estudadas neste trabalho verificou-se a presença de 23% de formas recombinantes B/C (12 *envB/gagC* e 6 *envC/gagB*) e 6% de recombinantes B/F (2 *envB/gagF* e 3 *envF/gagB*) (Figura 13). Somadas, as formas recombinantes totalizam 29% das amostras estudadas, o que representa um número superior ao encontrado nos outros Estados do Sul. Estes dados podem representar um acréscimo no perfil de formas recombinantes no Sul do país. Apesar de terem sido identificadas formas recombinantes B/F, não encontrou-se amostras contendo o subtipo F puro, o que já foi observado em outros estudos conduzidos na América Latina (CARR, AVILA, GOMEZ CARRILLO, et al., 2001).

As infecções duplas ou recombinantes fazem parte da epidemia do Brasil, que apresenta registros de recombinantes B/F desde 1994 entre amostras do Estado do Rio de Janeiro (LOUWAGIE, DELWART, MULLINS, et al., 1994, RAMOS, TANURI, SCHECHTER, et al., 1999). A presença de recombinantes B/C entre nossas amostras em anos anteriores a 1990 pode estar relacionada com a infecção prévia dos indivíduos por um subtipo viral e subsequente co-infecção por outro subtipo, ocorrendo a recombinação entre as cepas durante o período decorrido até a coleta destas amostras. Porém a presença de formas recombinantes durante este período não é excluída, devido a concomitante presença dos subtipos B e C na mesma região e período estudados.

A identificação de formas recombinantes distintas sugere a alta frequência de infecções duplas entre os subtipos B e C e os subtipos B e F, demonstrando a complexidade da epidemia no Estado de Santa Catarina. Uma das vantagens evolucionárias das recombinações que está bem estabelecida é a capacidade de adaptação, sugerindo que formas recombinantes de HIV bem adaptadas possam se expandir num futuro próximo (BURKE, 1997). O número total de formas recombinantes entre as amostras analisadas ultrapassa o número encontrado por estudos prévios em outras regiões do Sul do país.

Além disso, a recombinação pode acelerar a progressão para AIDS (LIU, MITTLER, NICKLE, et al., 2002) e fornecer ao vírus a capacidade de escapar do tratamento antiretroviral (NAJERA, DELGADO, PEREZ-ALVAREZ, et al., 2002) e da resposta imune (MORRIS, MARSDEN, HALCROW, et al., 1999).

Dentre as amostras estudadas verificou-se que o maior número de infecções ocorreu através do contato sexual entre heterossexuais concordando com a mudança observada no perfil da epidemia catarinense que inicialmente era caracterizada pela alta incidência entre usuários de drogas injetáveis (D'ORSI, 2004). Alguns estudos têm sugerido que os subtipos de HIV podem estar associados com diferentes modos de transmissão, isto porque alguns subtipos apresentam menor potencial de transmissão heterossexual em comparação com outros (SOTO-RAMIREZ, RENJIFO, MCLANE, et al., 1996). Esta hipótese está baseada na presença de células de Langerhans na mucosa genital e sua ausência na mucosa retal. Estas células apresentam a molécula CD4 em suas membranas e podem representar o alvo primário do HIV. Quando o HIV do subtipo B é transmitido por via sexual heterossexual, este vírus apresenta baixa replicação nas células de Langerhans, diferente do que ocorre com o subtipo C, que possui alta replicação e provavelmente maior potencial de transmissão através da via heterossexual (SOTO-RAMIREZ, RENJIFO, MCLANE, et al., 1996). O subtipo C representou 47,5% das infecções entre os heterossexuais e se considerarmos as formas recombinantes B/C este número alcança 75,4%. A mesma tendência pode ser observada entre heterossexuais e o subtipo C em amostras do Rio Grande do Sul (BRINDEIRO, R. M., DIAZ, SABINO, et al., 2003) e do Chile (RIOS, FERNANDEZ, JARAMILLO, et al., 2005).

Mesmo com um número pequeno de amostras em nosso estudo observou-se a presença de infecções entre usuários de drogas injetáveis (13%) que é historicamente uma via de transmissão do HIV importante na epidemia em Santa Catarina. Foi verificada uma

heterogeneidade de subtipos entre este grupo de pacientes apresentando amostras do subtipo B, C e a ausência de formas recombinantes. A alta diversidade genética do HIV entre usuários de drogas pode ser verificada em amostras do sudeste que apresentavam o subtipo B (TEIXEIRA, BASTOS, TELLES, et al., 2004) e F (ROSSINI, DIAZ, CASEIRO, et al., 2001), do nordeste com o subtipo B (COUTO-FERNANDEZ, MORGADO, BONGERTZ, et al., 1999) e com a detecção de CRFs em usuários de drogas tailandeses (NGUYEN, HU, CHOOPANYA, et al., 2002).

Apesar de ter sido encontrada uma relação entre a via de transmissão heterossexual com o subtipo C do HIV, a ligação entre forma de infecção e subtipo viral não pôde ser estabelecida com outros subtipos neste estudo. Além disso, diferentes subtipos de HIV foram encontrados entre pacientes infectados pela mesma via, o que provavelmente está diretamente relacionado com o subtipo do vírus circulante na região (ou que o indivíduo foi exposto) do que com a forma de transmissão.

Através da técnica de RFLP foi possível identificar o motivo GWGR em 21,9% das amostras identificadas como subtipo B (Figura 13). Outras análises usando a mesma metodologia encontraram a predominância de 30-57%, dependendo da área geográfica investigada (GALVAO-CASTRO, COUTO-FERNANDEZ, MELLO, et al., 1996, MORGADO, GUIMARÃES, NEVES JUNIOR, et al., 1998). Após a digestão das amostras, foi verificado no gel de agarose a presença de fragmentos de tamanho inferior ao fragmento não digerido, o que pode estar relacionado com a digestão incompleta ou com a presença da seqüência de aminoácidos (GWGR) em regiões localizadas nas extremidades do fragmento, que não caracteriza a presença da variante B'. Nenhuma relação foi encontrada entre a presença do motivo GWGR com a forma de transmissão viral. Estudos demonstram que a variante B' esteja presente no Brasil desde o início da epidemia (MORGADO, GUIMARÃES, NEVES JUNIOR, et al., 1998) porém, dentre as amostras

deste estudo verificou-se a presença desta variante em somente uma amostra com provável data de infecção no ano de 1994, sendo as restantes infectadas entre 1999 e 2002.

A importância desta variante do subtipo B na epidemia da AIDS no Brasil permanece desconhecida. Entretanto, estudos têm comparado a presença deste motivo com dados clínicos de pacientes e concluído que indivíduos infectados com o subtipo B' apresentavam uma progressão mais lenta para a AIDS (CASSEB, KOMNINAKIS, ABDALLA, et al., 2002, SANTORO-LOPES, HARRISON, TAVARES, et al., 2000). Além disso, a região V3 possui epítomos importantes para a neutralização do vírus por anticorpos e para imunidade mediada por células. Alterações nesta região da glicoproteína podem representar mudança comportamental do vírus, pois é através desta região que ele interage com co-receptores de quimiocinas nas células. Por estas características apresentadas, as diferenças encontradas nas variantes B', assim como a presença de formas recombinantes que apresentam uma grande diversidade genética viral, podem interferir no desenvolvimento de novas terapias, vacinas, gerar resistência a antiretrovirais e alterar a patologia causada pelo HIV (SANTORO-LOPES, HARRISON, TAVARES, et al., 2000).

Embora este estudo tenha sido bastante restrito em relação ao número e a origem das amostras, os resultados obtidos permitiram a identificação de grande heterogeneidade entre as amostras catarinenses. Estudos complementares, utilizando um maior número amostral e com amostras de outras regiões do Estado são fundamentais para uma melhor caracterização e entendimento da epidemia no Estado de Santa Catarina.

Em uma análise geral verificou-se a prevalência do subtipo C entre as amostras de Santa Catarina, que representa um perfil bastante semelhante ao encontrado no Estado do Rio Grande do Sul. Porém, foi identificado um alto número de formas recombinantes e a presença de recombinações com o subtipo F, que está presente em países próximos à este Estado e também no Estado do Rio de Janeiro. Nenhuma relação entre os subtipos virais e

dados clínicos puderam ser estabelecidos, sendo necessários estudos com um maior número de amostras. Este trabalho apresenta um conjunto de dados epidemiológicos e moleculares relacionados à epidemia do HIV no Estado de Santa Catarina ainda não descritos na literatura que podem contribuir para o entendimento do polimorfismo genético deste vírus no Brasil.

6 CONCLUSÕES

- Utilizando os iniciadores ED5/ED12 e ES7/ES8, o tampão contendo 100mM Tris-HCl pH 8,8, 15mM MgCl₂ e 750mM KCl mostrou-se ideal para a amplificação da região V3-V5 do gene *env* das amostras de DNA proviral. Para a amplificação do gene *gag* com os iniciadores HIG822/HIGHMA1317 e H1Gag1584/g17 o melhor tampão foi o comercialmente disponível (LabTrade do Brasil) com pH 8,5 e 15mM MgCl₂.
- De um total de 88 amostras, 22 (25%) não apresentaram amplificação do gene *env* utilizando os iniciadores ED5/ED12 para a primeira reação de PCR e ES7/ES8 para a reação de *nested* PCR. Porém, as mesmas amostras apresentaram amplificação para o gene *gag* demonstrando o possível polimorfismo do gene do envelope viral, impedindo a ligação dos iniciadores naquela região.
- A utilização da técnica de *nested* PCR demonstrou-se útil no aumento da sensibilidade e especificidade da reação de detecção dos genes *gag* e *env* do vírus HIV nas amostras testadas, eliminando bandas espúrias presentes na primeira reação de PCR.
- A inserção de seqüências de subtipos de referência do vírus HIV disponíveis no GenBank na análise por máxima parcimônia e *neighbor-joining* permitiu a formação de grupos que correspondem aos subtipos B, C, F para o gene *env* e B, C e BF para o gene *gag* de 66 amostras estudadas.
- A prevalência do subtipo C nas amostras coletadas no Estado de SC sugere um perfil distinto de outros estados brasileiros, que apresentam subtipo B como predominante;

- A presença de formas recombinantes ou co-infecção demonstra a heterogeneidade do vírus no Estado de Santa Catarina, sugerindo a alta frequência de infecções duplas pelos subtipos B e C e subtipos B e F.
- A presença do motivo GWGR em 21,9 % das amostras pesquisadas no presente estudo é relativamente menor da incidência estimada por pesquisas prévias que é de 30-57% das amostras brasileiras.
- A forma de transmissão mais comum entre as amostras estudadas foi pela via sexual heterossexual (73%), seguida pela contaminação entre usuários de drogas injetáveis (UDI) (13%), via sexual homossexual (10%) e através de transfusão sanguínea (4%).
- A prevalência do subtipo C entre heterossexuais observada no presente estudo, corrobora com dados da literatura.
- Entre os heterossexuais foi observada uma grande variabilidade genética apresentada pelos subtipos B, C e recombinantes B/C e B/F. O subtipo C foi responsável por 47% das infecções entre os heterossexuais e, se considerarmos as formas recombinantes, este número corresponde a 75 % das infecções.
- Nenhuma relação pôde ser observada entre os diferentes subtipos virais e os dados clínicos dos pacientes estudados, provavelmente devido ao número reduzido da amostra.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar estudos com maior número de amostras do maior número de regiões geográficas possíveis, objetivando ampliar o conhecimento das amostras de HIV circulantes no Estado de Santa Catarina.
- Verificar relações entre os subtipos virais encontrados com características clínicas do pacientes.
- Realizar um acompanhamento dos pacientes com análise molecular do HIV ao longo do tempo para verificar alterações no genoma viral frente a pressões seletivas.
- Pesquisar características biológicas do HIV e relacionar com possíveis alterações no genoma viral.
- Realizar o seqüenciamento do gene *pol* do genoma do HIV em amostras de pacientes do Estado de Santa Catarina para a verificação de resistência à medicamentos antiretrovirais.

REFERÊNCIAS

ALAEUS, A.; LIDMAN, K.; BJORKMAN, A.; GIESECKE, J.; ALBERT, J. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *Aids*, v. 13, n. 8, p. 901-907, 1999.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AULICINO, P. C.; KOPKA, J.; ROCCO, C.; MANGANO, A.; SEN, L. Sequence analysis of a South American HIV type 1 BC recombinant. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 21, n. 10, p. 894-896, 2005.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 868-871, 1983.

BLACKARD, J. T.; COHEN, D. E.; MAYER, K. H. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis*, v. 34, n. 8, p. 1108-1114, 2002.

BONGERTZ, V.; BOU-HABIB, D. C.; BRIGIDO, L. F.; CASEIRO, M.; CHEQUER, P. J.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; FERREIRA, P. C.; GALVAO-CASTRO, B.; GRECO, D.; GUIMARÃES, M. L.; LINHARES DE CARVALHO, M. I.; MORGADO, M. G.; OLIVEIRA, C. A.; OSMANOV, S.; RAMOS, C. A.; ROSSINI, M.; SABINO, E.; TANURI, A.; UEDA, M. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 23, n. 2, p. 184-193, 2000.

BONGERTZ, V.; GUIMARÃES, M. L.; SOARES-DA-COSTA, M. F.; VELOSO, V. G.; BASTOS, F. I.; SZWARCOWALD, C. L.; DERRICO, M.; TELLES, P. R.; PILLOTO, J. H.; JOAO FILHO, E. C.; MORGADO, M. G. Anti-HIV-1 seroreactivity and HIV transmission route[R1]. The HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. *J Clin Virol*, v. 12, n. 1, p. 27-36, 1999.

BONGERTZ, V.; OUVENEY, E. P.; TEIXEIRA, S. L.; SILVA-DE-JESUS, C.; HACKER, M. A.; MORGADO, M. G.; BASTOS, F. I. Anti-human immunodeficiency virus-1 antibody titers in injection drug users compared to sexually infected individuals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 2, p. 209-212, 2003.

BRINDEIRO, R.; VANDERBORGHT, B.; CARIDE, E.; CORREA, L.; ORAVEC, R. M.; BERRO, O.; STUYVER, L.; TANURI, A. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 7, p. 1674-1680, 1999.

BRINDEIRO, R. M.; DIAZ, R. S.; SABINO, E. C.; MORGADO, M. G.; PIRES, I. L.; BRIGIDO, L.; DANTAS, M. C.; BARREIRA, D.; TEIXEIRA, P. R.; TANURI, A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. **Aids**, v. 17, n. 7, p. 1063-1069, 2003.

BUONAGURO, L.; TAGLIAMONTE, M.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M. Evaluation of a modified version of Heteroduplex Mobility Assay for rapid screening of HIV-1 isolates in epidemics characterized by mono/dual clade predominance. **J Virol Methods**, v. 124, n. 1-2, p. 123-134, 2005.

BURKE, D. S. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 253-259, 1997.

CARR, J. K.; AVILA, M.; GOMEZ CARRILLO, M.; SALOMON, H.; HIERHOLZER, J.; WATANAVEERADEJ, V.; PANDO, M. A.; NEGRETE, M.; RUSSELL, K. L.; SANCHEZ, J.; BIRX, D. L.; ANDRADE, R.; VINOLES, J.; MCCUTCHAN, F. E. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. **Aids**, v. 15, n. 15, p. F41-47, 2001.

CARRION, G.; EYZAGUIRRE, L.; MONTANO, S. M.; LAGUNA-TORRES, V.; SERRA, M.; AGUAYO, N.; AVILA, M. M.; RUCHANSKY, D.; PANDO, M. A.; VINOLES, J.; PEREZ, J.; BARBOZA, A.; CHAUCA, G.; ROMERO, A.; GALEANO, A.; BLAIR, P. J.; WEISSENBACHER, M.; BIRX, D. L.; SANCHEZ, J. L.; OLSON, J. G.; CARR, J. K. Documentation of subtype C HIV Type 1 strains in Argentina, Paraguay, and Uruguay. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 9, p. 1022-1025, 2004.

CASSEB, J.; KOMNINAKIS, S.; ABDALLA, L.; BRIGIDO, L. F.; RODRIGUES, R.; ARAUJO, F.; VEIGA, A. P.; DE ALMEIDA, A.; FLANNERY, B.; HENDRY, R. M.; DUARTE, A. J. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? **Int J Infect Dis**, v. 6, n. 3, p. 164-169, 2002.

CASTRO, E.; ECHEVERRIA, G.; DEIBIS, L.; GONZALEZ DE SALMEN, B.; DOS SANTOS MOREIRA, A.; GUIMARÃES, M. L.; BASTOS, F. I.; MORGADO, M. G. Molecular epidemiology of HIV-1 in Venezuela: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a B/F recombinant infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 32, n. 3, p. 338-344, 2003.

CLAVEL, F.; GUETARD, D.; BRUN-VEZINET, F.; CHAMARET, S.; REY, M. A.; SANTOS-FERREIRA, M. O.; LAURENT, A. G.; DAUGUET, C.; KATLAMA, C.; ROUZIOUX, C.; ET AL. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, v. 233, n. 4761, p. 343-346, 1986.

COFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, v. 267, n. 5197, p. 483-489, 1995.

CORNELISSEN, M.; KAMPINGA, G.; ZORGDRAGER, F.; GOUDSMIT, J. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by env show high frequency of recombinant gag genes. The UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. **J Virol**, v. 70, n. 11, p. 8209-8212, 1996.

COUTO-FERNANDEZ, J. C.; MORGADO, M. G.; BONGERTZ, V.; TANURI, A.; ANDRADE, T.; BRITES, C.; GALVAO-CASTRO, B. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 22, n. 3, p. 288-293, 1999.

CSILLAG, C. HIV-1 subtype C in Brazil. **Lancet**, v. 344, n. 8933, p. 1354, 1994.

DE OLIVEIRA, T.; SALEMI, M.; GORDON, M.; VANDAMME, A. M.; VAN RENSBURG, E. J.; ENGELBRECHT, S.; COOVADIA, H. M.; CASSOL, S. Mapping sites of positive selection and amino acid diversification in the HIV genome: an alternative approach to vaccine design? **Genetics**, v. 167, n. 3, p. 1047-1058, 2004.

DELWART, E. L.; HERRING, B.; RODRIGO, A. G.; MULLINS, J. I. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR Methods Appl**, v. 4, n. 5, p. S202-216, 1995.

DELWART, E. L.; SHEPPARD, H. W.; WALKER, B. D.; GOUDSMIT, J.; MULLINS, J. I. Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays. **J Virol**, v. 68, n. 10, p. 6672-6683, 1994.

DESCAMPS, D.; APETREI, C.; COLLIN, G.; DAMOND, F.; SIMON, F.; BRUN-VEZINET, F. Naturally occurring decreased susceptibility of HIV-1 subtype G to protease inhibitors. **Aids**, v. 12, n. 9, p. 1109-1111, 1998.

DESCAMPS, D.; COLLIN, G.; LETOURNEUR, F.; APETREI, C.; DAMOND, F.; LOUSSERT-AJAKA, I.; SIMON, F.; SARAGOSTI, S.; BRUN-VEZINET, F. Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. **J Virol**, v. 71, n. 11, p. 8893-8898, 1997.

D'ORSI, E. **Informativo Epidemiológico "Barriga Verde"**, 2004. Disponível em: <http://www.saude.sc.gov/publicacoes/dVe/Informativo_Epidemiologico.pdf>. Acesso em: julho de 2005.

ESPARZA, J.; BHAMARAPRAVATI, N. Accelerating the development and future availability of HIV-1 vaccines: why, when, where, and how? **Lancet**, v. 355, n. 9220, p. 2061-2066, 2000.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

GALLO, R. C.; SALAHUDDIN, S. Z.; POPOVIC, M.; SHEARER, G. M.; KAPLAN, M.; HAYNES, B. F.; PALKER, T. J.; REDFIELD, R.; OLESKE, J.; SAFAI, B.; ET AL. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500-503, 1984.

GALVAO-CASTRO, B.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; MELLO, M. A.; LINHARES-DE-CARVALHO, M. I.; CASTELLO-BRANCO, L. R.; BONGERTZ, V.; FERREIRA, P. C.; MORGADO, M.; SABINO, E.; TANURI, A. A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 335-338, 1996.

GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D. L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C. M.; MICHAEL, S. F.; CUMMINS, L. B.; ARTHUR, L. O.; PEETERS, M.; SHAW, G. M.; SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436-441, 1999.

GOODENOW, M.; HUET, T.; SAURIN, W.; KWOK, S.; SNINSKY, J.; WAIN-HOBSON, S. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 2, n. 4, p. 344-352, 1989.

GROSSMAN, Z.; PAXINOS, E. E.; AVERBUCH, D.; MAAYAN, S.; PARKIN, N. T.; ENGELHARD, D.; LORBER, M.; ISTOMIN, V.; SHAKED, Y.; MENDELSON, E.; RAM, D.; PETROPOULOS, C. J.; SCHAPIRO, J. M. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 2159-2165, 2004.

GUIMARÃES, M. L.; DOS SANTOS MOREIRA, A.; LOUREIRO, R.; GALVAO-CASTRO, B.; MORGADO, M. G. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 17, p. 1261-1269, 2002.

GUIMARÃES, M. L.; MOREIRA, A. S.; MORGADO, M. G. 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**, v. 97, n. 4, p. 523-526, 2002.

HEYNDRICKX, L.; JANSSENS, W.; ZEKENG, L.; MUSONDA, R.; ANAGONOU, S.; VAN DER AUWERA, G.; COPPENS, S.; VEREECKEN, K.; DE WITTE, K.; VAN RAMPENBERGH, R.; KAHINDO, M.; MORISON, L.; MCCUTCHAN, F. E.; CARR, J. K.; ALBERT, J.; ESSEX, M.; GOUDSMIT, J.; ASJO, B.; SALMINEN, M.; BUVE, A.; VAN DER GROEN, G. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. **J Virol**, v. 74, n. 1, p. 363-370, 2000.

HOFFMANN, C.; KAMPS, B. S. **HIV Medicine 2005**. Flying Publisher, 2005.

HU, D. J.; VANICHSENI, S.; MASTRO, T. D.; RAKTHAM, S.; YOUNG, N. L.; MOCK, P. A.; SUBBARAO, S.; PAREKH, B. S.; SRISUWANVILAI, L.; SUTTHENT, R.; WASI, C.; HENEINE, W.; CHOOPANYA, K. Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. **Aids**, v. 15, n. 6, p. 683-691, 2001.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. **PCR applications**. San Diego: Academic Press, 1999.

KANKI, P. J.; BARIN, F.; M'BOUP, S.; ALLAN, J. S.; ROMET-LEMONNE, J. L.; MARLINK, R.; MCLANE, M. F.; LEE, T. H.; ARBEILLE, B.; DENIS, F.; ET AL. New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). **Science**, v. 232, n. 4747, p. 238-243, 1986.

KANKI, P. J.; HAMEL, D. J.; SANKALE, J. L.; HSIEH, C.; THIOR, I.; BARIN, F.; WOODCOCK, S. A.; GUEYE-NDIAYE, A.; ZHANG, E.; MONTANO, M.; SIBY, T.; MARLINK, R.; I, N. D.; ESSEX, M. E.; S, M. B. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. **J Infect Dis**, v. 179, n. 1, p. 68-73, 1999.

KIJAK, G. H.; MCCUTCHAN, F. E. HIV Diversity, Molecular Epidemiology, and the Role of Recombination. **Curr Infect Dis Rep**, v. 7, n. 6, p. 480-488, 2005.

KUIKEN, C.; THAKALLAPALLI, R.; ESKLID, A.; DE RONDE, A. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. **Am J Epidemiol**, v. 152, n. 9, p. 814-822, 2000.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

LIU, S. L.; MITTLER, J. E.; NICKLE, D. C.; MULVANIA, T. M.; SHRINER, D.; RODRIGO, A. G.; KOSLOFF, B.; HE, X.; COREY, L.; MULLINS, J. I. Selection for human immunodeficiency virus type 1 recombinants in a patient with rapid progression to AIDS. **J Virol**, v. 76, n. 21, p. 10674-10684, 2002.

LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY, N. HIV Sequence Database. **Los Alamos National Laboratory, NM.**, 2005. Disponível em: <<http://hiv-web.lanl.gov>>. Acesso em: dez. de 2004.

LOUWAGIE, J.; DELWART, E. L.; MULLINS, J. I.; MCCUTCHAN, F. E.; EDDY, G.; BURKE, D. S. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 561-567, 1994.

LOUWAGIE, J.; MCCUTCHAN, F. E.; PEETERS, M.; BRENNAN, T. P.; SANDERS-BUELL, E.; EDDY, G. A.; VAN DER GROEN, G.; FRANSEN, K.; GERSHY-DAMET, G. M.; DELEYS, R.; ET AL. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. **Aids**, v. 7, n. 6, p. 769-780, 1993.

MARLINK, R.; KANKI, P.; THIOR, I.; TRAVERS, K.; EISEN, G.; SIBY, T.; TRAORE, I.; HSIEH, C. C.; DIA, M. C.; GUEYE, E. H.; ET AL. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**, v. 265, n. 5178, p. 1587-1590, 1994.

MCCUTCHAN, F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **Aids**, v. 14 Suppl 3, n. p. S31-44, 2000.

MCCUTCHAN, F. E.; SALMINEN, M. O.; CARR, J. K.; BURKE, D. S. HIV-1 genetic diversity. **Aids**, v. 10 Suppl 3, n. p. S13-20, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico DST/AIDS**, 2005. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm>>. Acesso em: 03 de nov. 2005.

MORGADO, M. G.; GUIMARÃES, M. L.; GALVAO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 143-150, 2002.

MORGADO, M. G.; GUIMARÃES, M. L.; GRIPP, C. B.; NEVES JUNIOR, I.; COSTA, C. I.; DOS SANTOS, V. G.; LINHARES-DE-CARVALHO, M. I.; GALVAO-CASTRO, B.; BONGERTZ, V. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 339-342, 1996.

MORGADO, M. G.; GUIMARÃES, M. L.; NEVES JUNIOR, I.; DOS SANTOS, V. G.; LINHARES-DE-CARVALHO, M. I.; CASTELLO-BRANCO, L. R.; BASTOS, F. I.; CASTILHO, E. A.; GALVAO-CASTRO, B.; BONGERTZ, V. Molecular epidemiology of HIV in Brazil: polymorphism of the antigenically distinct HIV-1 B subtype strains. The Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 383-386, 1998.

MORGADO, M. G.; SABINO, E. C.; SHPAER, E. G.; BONGERTZ, V.; BRIGIDO, L.; GUIMARÃES, M. D.; CASTILHO, E. A.; GALVAO-CASTRO, B.; MULLINS, J. I.; HENDRY, R. M.; ET AL. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 569-576, 1994.

MORRIS, A.; MARSDEN, M.; HALCROW, K.; HUGHES, E. S.; BRETTE, R. P.; BELL, J. E.; SIMMONDS, P. Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations. **J Virol**, v. 73, n. 10, p. 8720-8731, 1999.

NAJERA, R.; DELGADO, E.; PEREZ-ALVAREZ, L.; THOMSON, M. M. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. **Aids**, v. 16 Suppl 4, n. p. S3-16, 2002.

NELSON, K. E.; RUNGRUENGTHANAKIT, K.; MARGOLICK, J.; SURIYANON, V.; NIYOMTHAI, S.; DE BOER, M. A.; KAWICHAI, S.; ROBISON, V.; CELENTANO, D. D.; NAGACHINTA, T.; DUERR, A. High rates of transmission of subtype E human immunodeficiency virus type 1 among heterosexual couples in Northern Thailand: role of sexually transmitted diseases and immune compromise. **J Infect Dis**, v. 180, n. 2, p. 337-343, 1999.

NGUYEN, L.; HU, D. J.; CHOOPANYA, K.; VANICHSENI, S.; KITAYAPORN, D.; VAN GRIENSVEN, F.; MOCK, P. A.; KITTIKRAISAK, W.; YOUNG, N. L.; MASTRO, T. D.; SUBBARAO, S. Genetic analysis of incident HIV-1 strains among injection drug

users in Bangkok: evidence for multiple transmission clusters during a period of high incidence. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 30, n. 2, p. 248-256, 2002.

PAREKH, B.; PHILLIPS, S.; GRANADE, T. C.; BAGGS, J.; HU, D. J.; RESPESS, R. Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 15, n. 2, p. 133-142, 1999.

PASQUIER, C.; MILLOT, N.; NJOUOM, R.; SANDRES, K.; CAZABAT, M.; PUEL, J.; IZOPET, J. HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of pol gene sequences. **J Virol Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 45-54, 2001.

PEETERS, M.; SHARP, P. M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. **Aids**, v. 14 Suppl 3, n. p. S129-140, 2000.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual de HIV/AIDS**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

RAMOS, A.; TANURI, A.; SCHECHTER, M.; RAYFIELD, M. A.; HU, D. J.; CABRAL, M. C.; BANDEA, C. I.; BAGGS, J.; PIENIAZEK, D. Dual and recombinant infections: an integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 5, n. 1, p. 65-74, 1999.

RIOS, M.; FERNANDEZ, J.; JARAMILLO, P.; PAREDES, V.; SANCHEZ, J. L.; LAGUNA-TORRES, V. A.; CARR, J. K.; RAMIREZ, E. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Chile: differential geographic and transmission route distribution of B and F subtypes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21, n. 10, p. 835-840, 2005.

RODENBURG, C. M.; LI, Y.; TRASK, S. A.; CHEN, Y.; DECKER, J.; ROBERTSON, D. L.; KALISH, M. L.; SHAW, G. M.; ALLEN, S.; HAHN, B. H.; GAO, F. Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 17, n. 2, p. 161-168, 2001.

ROSSINI, M. A.; DIAZ, R. S.; CASEIRO, M.; TURCATO, G.; ACCETTURI, C. A.; SABINO, E. C. HIV-1 subtypes among intravenous drug users from two neighboring cities in Sao Paulo State, Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 1, p. 45-47, 2001.

RUSSELL, K. L.; CARCAMO, C.; WATTS, D. M.; SANCHEZ, J.; GOTUZZO, E.; EULER, A.; BLANCO, J. C.; GALEANO, A.; ALAVA, A.; MULLINS, J. I.; HOLMES, K. K.; CARR, J. K. Emerging genetic diversity of HIV-1 in South America. **Aids**, v. 14, n. 12, p. 1785-1791, 2000.

SA FILHO, D. J.; SANABANI, S.; DIAZ, R. S.; MUNERATO, P.; BRUNSTEIN, A.; FUSUMA, E.; SABINO, E. C.; JANINI, L. M. Analysis of full-length human

immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in Sao Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21, n. 2, p. 145-151, 2005.

SABINO, E. C.; SHPAER, E. G.; MORGADO, M. G.; KORBER, B. T.; DIAZ, R. S.; BONGERTZ, V.; CAVALCANTE, S.; GALVAO-CASTRO, B.; MULLINS, J. I.; MAYER, A. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J Virol**, v. 68, n. 10, p. 6340-6346, 1994.

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; CAVALLI, S. A.; MACHADO, M. O.; HIRATA, R. D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem**, v. 44, n. 8 Pt 1, p. 1748-1750, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTORO-LOPES, G.; HARRISON, L. H.; TAVARES, M. D.; XEXEO, A.; DOS SANTOS, A. C.; SCHECHTER, M. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: is B different from B-Br? **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, n. 10, p. 953-958, 2000.

SECRETARIA DO ESTADO DE SANTA CATARINA. **Boletim epidemiológico**, 2002. Disponível em: <<http://www.saude.sc.gov.br>>. Acesso em: 14 de fev. 2005.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. 13. HIV-1 infection. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S582-592, 2003.

SMITH, M.; GERETTI, A. M.; OSNER, N.; EASTERBROOK, P.; ZUCKERMAN, M. High levels of discordance between sequencing and serological subtyping in a predominantly non-B subtype HIV-1 infected cohort. **J Clin Virol**, v. 33, n. 4, p. 312-318, 2005.

SOARES, E. A.; MARTINEZ, A. M.; SOUZA, T. M.; SANTOS, A. F.; DA HORA, V.; SILVEIRA, J.; BASTOS, F. I.; TANURI, A.; SOARES, M. A. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **Aids**, v. 19 Suppl 4, n. p. S81-86, 2005.

SOARES, E. A.; SANTOS, R. P.; PELLEGRINI, J. A.; SPRINZ, E.; TANURI, A.; SOARES, M. A. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n. 5, p. 520-526, 2003.

SOARES, M. A.; DE OLIVEIRA, T.; BRINDEIRO, R. M.; DIAZ, R. S.; SABINO, E. C.; BRIGIDO, L.; PIRES, I. L.; MORGADO, M. G.; DANTAS, M. C.; BARREIRA, D.; TEIXEIRA, P. R.; CASSOL, S.; TANURI, A. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. **Aids**, v. 17, n. 1, p. 11-21, 2003.

SOTO-RAMIREZ, L. E.; RENJIFO, B.; MCLANE, M. F.; MARLINK, R.; O'HARA, C.; SUTTHENT, R.; WASI, C.; VITHAYASAI, P.; VITHAYASAI, V.; APICHARTPIYAKUL, C.; AUEWARAKUL, P.; PENA CRUZ, V.; CHUI, D. S.; OSATHANONDH, R.; MAYER, K.; LEE, T. H.; ESSEX, M. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. **Science**, v. 271, n. 5253, p. 1291-1293, 1996.

STANFIELD, R. L.; GHIARA, J. B.; OLLMANN SAPHIRE, E.; PROFY, A. T.; WILSON, I. A. Recurring conformation of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop. **Virology**, v. 315, n. 1, p. 159-173, 2003.

STEFANI, M. M.; PEREIRA, G. A.; MARTELLI, C. M.; SHINDO, N.; GALVAO-CASTRO, B. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 23, n. 2, p. 205-207, 2000.

STITES, D. P., TERR, A.I., PARSOLOW, G.T. **Imunologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SWANSON, P.; SORIANO, V.; DEVARE, S. G.; HACKETT, J., JR. Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA version 3.0. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 3, p. 862-870, 2001.

TANURI, A.; SWANSON, P.; DEVARE, S.; BERRO, O. J.; SAVEDRA, A.; COSTA, L. J.; TELLES, J. G.; BRINDEIRO, R.; SCHABLE, C.; PIENIAZEK, D.; RAYFIELD, M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 20, n. 1, p. 60-66, 1999.

TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, F. I.; TELLES, P. R.; HACKER, M. A.; BRIGIDO, L. F.; DE, F. O. C. A.; BONGERTZ, V.; MORGADO, M. G. HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity. **J Clin Virol**, v. 31, n. 3, p. 221-226, 2004.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMSON, M. M.; PEREZ-ALVAREZ, L.; NAJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 8, p. 461-471, 2002.

UNAIDS - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS / WHO. **AIDS epidemic update: December 2005**, 2005. Disponível em: <<http://www.unaids.org/Epi2005/doc/report.html>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. **Annu Rev Biochem**, v. 60, n. p. 577-630, 1991.

VICENTE, A. C.; OTSUKI, K.; SILVA, N. B.; CASTILHO, M. C.; BARROS, F. S.; PIENIAZEK, D.; HU, D.; RAYFIELD, M. A.; BRETAS, G.; TANURI, A. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 23, n. 4, p. 327-331, 2000.

WONG, J. K.; HEZAREH, M.; GUNTARD, H. F.; HAVLIR, D. V.; IGNACIO, C. C.; SPINA, C. A.; RICHMAN, D. D. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. **Science**, v. 278, n. 5341, p. 1291-1295, 1997.

ANEXOS

ANEXO A: Lista de iniciadores utilizados neste trabalho.

| Gene | Região (tamanho do fragmento) | Sequência do iniciador |
|------------|----------------------------------|---|
| <i>env</i> | V1-V5 (1.200 pb) | ED5 (5'- ATG GGA TCA AAG CCT AAA GCC ATG TG-3') ED12 (5'- AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG-3') |
| | V3-V5 (700 pb) | ES7 (5'- tgt aaa acg acg gcc agt CTG TTA AAT GGC AGT CTA GC -3') ES8 (5'- cag gaa aca gct atg acc CAC TTC TCC AAT TGT CCC TCA -3') |
| <i>env</i> | (2.000 pb) | ED3 (5'- TTA GGC ATC TCC TAT GGC AGG AAG AAG CGG- 3') ED14 (5'- TCT TGC CTG GAG CTG TTT GAT GCC CCA GAC -3') |
| | C2-C3 (640 pb) | ED31 (5'- CCT CAG CCA TTA CAC AGG CCT GTC CAA AG -3') ED33 (5'- TTA CAG TAG AAA AAT TCC CCT C-3') |
| <i>gag</i> | <i>gag</i> (830 pb) | HIG822 (5'- GCT TTC AGC CCA GAA GTA ATA CC -3') HIGHMA1317 (5'- CCA AAT TCT CCC TAA AAA ATT AGC CT -3') |
| | p24- p7 (460 pb) | H1Gag1584 (5'- AAA GAT GGA TAA TCC TGG G -3') g17 (5'- TCC ACA TTT CCA ACA GCC CTT TTT -3') |

ANEXO B: Termo de consentimento e Informação.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas - Divisão de Imunologia
88049-900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil

PROJETO DE PESQUISA: Subtipagem e caracterização do HIV em indivíduos soropositivos: um estudo parcial da epidemiologia do HIV em Santa Catarina.

RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

TERMO DE CONSENTIMENTO E INFORMAÇÃO

A AIDS é uma doença causada pelo vírus HIV e causa uma diminuição das defesas do corpo. Este vírus destrói as células responsáveis pela defesa do organismo, e assim o corpo fica sem uma proteção natural. A contaminação pelo HIV pode ocorrer através da relação sexual desprotegida, de mães grávidas para seus filhos, através da troca de seringas entre usuários de drogas e mais raramente em transfusões de sangue. No início da doença os sintomas podem ser parecidos com os de uma gripe comum. Após alguns anos, outros sintomas mais graves aparecem. Quando o exame para HIV é positivo o médico solicita constantemente outros exames, como carga viral e contagem de células CD4/CD8, para saber se a doença esta progredindo e como o vírus está reagindo aos medicamentos. O vírus HIV esta presente em várias partes do mundo e pode se apresentar de diferentes formas, que são chamadas de subtipos. Dependendo do subtipo do vírus o médico pode utilizar um tipo diferente de tratamento para o paciente. Conhecer o subtipo do vírus é também importante para tentar desenvolver novos tratamentos e vacinas, mas para isso é necessário estudar e pesquisar o vírus presente no sangue de indivíduos portadores.

Este projeto pretende pesquisar o tipo de HIV presente em portadores do Estado de Santa Catarina. É um estudo inicial e as informações aqui obtidas poderão ajudar estudos futuros a tentarem desenvolver tratamentos mais adequados e vacinas contra esta AIDS. A sua participação neste estudo é muito

importante e o senhor/a senhora não terá que pagar nada. O senhor/a senhora está sendo convidado a fazer parte deste estudo juntamente com muitas outras pessoas.

PROCEDIMENTO

Se o senhor/a senhora concordar com a participação, deverá autorizar a utilização do seu sangue em alguns testes para fins desta pesquisa. Será coletado apenas uma pequena quantidade de seu sangue (5 ml) e nada mais. Não haverá qualquer outro procedimento que possa ocasionar desconfortos para o participante a não ser o desconforto da picada da agulha que coletará o sangue. Pedimos também autorização para consultar seu prontuário médico. O benefício deste estudo poderá não ser imediato, porém fornecerá informações a pesquisadores sobre qual é o tipo de vírus que o paciente apresenta e baseado nisto poderão ser desenvolvidos novos tratamentos e vacinas para o HIV, que poderá beneficiar outros pacientes futuramente.

PARTICIPAÇÃO E CONFIDENCIALIDADE

A participação dos pacientes neste estudo é voluntária, confidencial e nenhum nome será divulgado em qualquer tipo de publicação. Caso o senhor/a senhora não queira participar, isto não influenciará o tratamento que você tem recebido. Pense bem, faça a pergunta que desejar e esclareça suas dúvidas. Todos os itens deste termo de consentimento e informação serão cumpridos e respeitados pelos pesquisadores envolvidos.

Se você tiver alguma dúvida ou mesmo depois de assinar este documento não quiser mais participar desta pesquisa, pode entrar em contato com qualquer um destes pesquisadores abaixo, comunicar sua decisão e você será excluído da pesquisa:

- Prof. Aguinaldo R. Pinto - Universidade Federal de Santa Catarina – Fone: 3331-5206

- Dayse Locateli – Universidade Federal de Santa Catarina – Fone: 3223-6975

CONSENTIMENTO

Eu recebi uma cópia e li (ou leram para mim) as informações acima descritas. Foram explicados todos os procedimentos deste estudo. Sei que posso perguntar o que desejar e compreendo exatamente que o meu sangue será utilizado para realização de pesquisas sobre o HIV. Sei também dos possíveis desconfortos e benefícios com a participação neste estudo. Sou livre para autorizar ou não a minha participação neste estudo.

DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o todo teor.

Florianópolis/SC, _____ de _____ de 20__.

Assinaturas:

Pesquisador responsável _____

Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

Pesquisador principal _____

Dayse Locateli

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](#)