

SABRI SAEED M. A. AL-SANABANI

**ANÁLISE DO GENOMA COMPLETO DAS LINHAGENS
DE HIV PREVALENTES NO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

**São Paulo
2005**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

SABRI SAEED M. A. AL-SANABANI

Análise do genoma completo das linhagens de HIV prevalentes no Brasil. / SABRI SAEED M. A. AL-SANABANI.—São Paulo, 2005. xx, 75f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Titulo em inglês: Analysis of full-length genomes of HIV-1 strains prevalent in Brazil.

1- HIV-1 subtypes. 2- Full length genome. 3- Recombination. 4-CRFs.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DISCIPLINA DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS
(DIPA)

Chefe do departamento: Prof. Dr. Antonio Roberto Chacra

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Arnaldo-Lopes
Colombo

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Sorologia, Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo. O Projeto foi financiado pelo Grant 0110719-5 da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (Nº 0561/04).

SABRI SAEED M. A. AL-SANABANI

**ANÁLISE DO GENOMA COMPLETO DAS LINHAGENS DE
HIV PREVALENTES NO BRASIL**

Presidente da banca: Prof. Dr. _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Aprovada em: ____ / ____ / ____

DEDICATÓRIA

*“To my parents and beloved family for their
encouragement and support”*

AGRADECIMENTOS

I would like to express my gratitude to all those who have helped me during this study. Particularly I wish to acknowledge:

Dr Ester Sabino, my course supervisor, for giving me the opportunity to work with the HIV virology. Thanks for giving me the best guidance and environment to grow as an independent researcher. Your patience, calm amazing, and familiar consort were unforgettable.

Dr Ricardo Dias, head of the retrovirology laboratory at the UNIFESP, for allowing me to use your lab and fruitful discussions.

Dr Luis Mario Janini, retrovirology laboratory at the UNIFESP, for always being available for questions and delectable collaboration.

Walter Kliene Neto, Fundação Pro-Sangue, for being such a nice friend, for the scientific-philosophical sometimes wild idea and theories, and a lot of non sense discussions. Your wonderful friendship and good sense of humor make me feel at home.

Sueli da Silva Aquino, Fundação Pro-Sangue, for her secretarial assistance on all problematic issues

Mirian Amaral Freitas, Secretaria da PG – DIPA, for her tolerance, support and careful attention

Antonio Charlys da Costa, Retrovirology lab at the UNIFESP, for always offering fast and efficient help whenever I need it. Thank you for making my life easy.

Colleagues at the Tumor biology laboratory, Fundação Pro-Sangue, for creating a warm and friendly atmosphere. Thank you for making life worth living.

My Parents, the one I ought to thank most. Thank you for giving me enough enthusiasm to look forward and enough determination to make each day better than yesterday.

My Wife & Daughter, for your unconditional encouragement, understanding and patience during writing of this thesis and particularly when few minutes in the lab that routinely turned into hours. Without you, I might have never found the time and mental strength to complete this work.

LISTA DE FIGURAS

1.	Mapa Genômico do HIV-1.....	5
2.	Mudança de moldes recombinogênicos durante a transcrição reversa.....	9
3.	Recombinação de acordo com o modelo de escolha de cópia	10
4.	Síntese de DNA provírus pela Transcrição Reversa	13
5.	Esquema de classificação do HIV	15
6.	Distribuição geográfica dos subtipos de HIV-1 em escala global	21
7.	Diagrama mostrando o mapa de localização dos 5 fragmentos sobrepostos amplificados relativos às posições do HIV-1 cepa HXB2	28
8.	Distribuição dos primers usados para seqüenciar as fitas Complementares	32
9.	Relacionamento filogenético gerado pelo genoma completo das seqüências de HIV dos 14 isolados brasileiros identificados neste estudo	35
10-A	Árvore filogenética do HIV-1 subtipo B baseada no genoma completo	37
10-B	Árvore filogenética do HIV-1 subtipo F baseada no genoma completo	38
10-C	Árvore filogenética do HIV-1 subtipo C baseada no genoma completo	39
11-A	Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de <i>gag</i> do subtipo C	40
11-B	Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de <i>pol</i> do subtipo C	41
11-C	Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de <i>env</i> do subtipo C	42
12	Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de <i>gag</i> (A) <i>pol</i> (B) e <i>env</i> (C) de subtipo F.....	43

13	Análise de similaridade de <i>plot</i> dos genomas completos dos 8 vírus BF recombinantes	45
14	A análise da decomposição dividida (split decomposition)	46
15	Análise de <i>bootscan</i> dos genomas completos dos 8 vírus BF recombinantes	49
16	Representação esquemática da estrutura genética completa e pontos de quebra dos 8 isolados BF recombinantes	50
17	Análise da árvore exploratória dos isolados 04BR047 e 04BR226	51
18	Análise da árvore exploratória dos isolados 04BR034 e 04BR323	52
19	Alinhamento dos domínios funcionais importantes na proteína <i>gag</i>	55
20	Alinhamento da proteína protease completa	56
21	Alinhamento dos domínios funcionais importantes da proteína <i>vif</i>	56
22	Alinhamento dos aminoácidos da região V3	58

LISTA DE TABELAS

1-	Proteínas do HIV e suas funções	6
2-	Pares de primers usados para as ampliações	27
3-	Primers usados para o seqüenciamento dos 5 fragmentos sobrepostos cobrindo o genoma completo do HIV-1	31
4-	Isolados de HIV-1 caracterizados pelo seqüenciamento do genoma completo.....	34
5-	Resultados das análises dos pontos de quebra de 8 seqüências recombinantes.....	53

LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. Ferreira, S., **Sanabani, S.**, Reis, A.D., Chamone, D.F., Sabino, E.C., 2003. Human herpesvirus type 8 among Brazilian blood donors. Transfusion 43, 1764-1765.
2. Sa Filho, D.J., **Sanabani, S.**, Diaz, R.S., Munerato, P., Brunstein, A., Fusuma, E., Sabino, E.C., Janini, L.M., 2005. Analysis of full-length human

LISTA DE ABREVIações

°C	Graus Celsius
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
bp	Pares de Bases
CD4	Cluster de Diferenciação; receptor (4)
COMA	Combinatorial DNA Melting Assay
cPPT	Central Polypurine Tract
CTS	Central Termination Signal
DNA	Ácido Deoxiribonucleico
dNTP	Deoxynucleotidio Trifosfato
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
F84	Felsenstein 1984
gp	Glicoproteína
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
HMA	Ensaio de Mobilidade Heteroduplex
IDU	Usuários de drogas intravenosas (Intravenous Drug User)
kb	Kilobase
Kimura -2P	Kimura 2 Parameter
LTR	Long Terminal Repeat
MSM	Homens que Fazem Sexo com Homens (Men who have Sex with Men)
min	Minutos
mM	Milimolar
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NJ	Neighbor Joining
ORF	Open Reading Frame
PBS	Sítio de Ligação do Primer (Primer Binding Site)
PCR	Reação de Polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction)
PPT	Polypurine Tract
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ácido Ribonucléico (Ribonucleic Acid)
RT	Enzima Transcriptase Reversa (Reverse Transcriptase Enzyme)
s	Segundos
SI, NSI	Syncytium, Non-Syncytium Inducing
ssDNA	Single Stranded Deoxyribonucleic Acid
tRNA	Ácido Ribonucleico Transportados (Transfer Ribonucleic Acid)
U3	Unique domain at the 3' end
U5	Unique domain at the 5' end
μg	Micogramas
μL	Microlitros
μm	Micromolar
USA	United States of America
UV	Ultravioleta
V3	Terceira Região Variável do Gen <i>env</i>
&	e

RESUMO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) exibe uma enorme variabilidade genética. Tal característica é criticamente importante para que o vírus possa se adaptar às mudanças ambientais e escapar ao sistema imune do hospedeiro, desenvolver resistência à drogas e impedir o sucesso de eventuais vacinas. Portanto, entender esta diversidade é fundamental para se desenvolver vacinas e drogas eficientes, extremamente necessárias para se conter a epidemia de HIV/AIDS. Neste estudo, nós investigamos a magnitude da diversidade das principais variantes de HIV-1 circulante no Brasil, através de seqüenciamento e análise de genoma completo.

O DNA foi extraído de 22 amostras previamente classificadas em nosso laboratório como sendo 6 subtipos B, 8 subtipos C e 8 subtipos F, com base no seqüenciamento de pequenos *amplicons*. A reamplificação do DNA destas amostras foi realizada por PCR de fragmentos sobrepostos, seguido por seqüenciamento direto.

Duas de seis amostras identificadas parcialmente como subtipo B e seis de oito amostras identificadas parcialmente como subtipo F foram então caracterizadas como BF recombinantes pela análise de seus genomas completos. Todas as 8 amostras previamente classificadas como subtipo C apresentaram-se como cepas não recombinantes através da análise de genoma completo. Dois recombinantes BF possuem estrutura de recombinação genômica idêntica, porém diferente da cepa Argentina CRF 12_BF, e provavelmente representam uma nova forma recombinante circulante no Brasil. As análises das seqüências dos subtipos C e F revelaram uma linhagem distinta altamente suportada pela filogenia, cada qual correspondendo a sua cepa de referência brasileira. Nossos dados indicam fortemente que a atual epidemia Brasileira de HIV-1 com as cepas dos subtipos C e F foi introduzida no país por um único evento, e não por fontes múltiplas. Além disso, a evidencia da recombinação BF obtida pela análise do genoma completo do HIV, indica uma disseminação dos recombinantes BF em nossa população de infectados pelo HIV-1 que pode representar força significativa na evolução do vírus.

1 INTRODUÇÃO

Variações genéticas substanciais existem na família dos vírus da imunodeficiência humana (HIV-1&HIV-2), e estudos filogenéticos das cepas do HIV-1 obtidas de diferentes localizações geográficas revelaram a existência de três grupos principais de cepas virais: M (principal), O (exterior) e N (Non-O ou novo) (De Leys *et al.*, 1990; Gurtler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998). O grupo M foi dividido em 9 subtipos designados como A-D, F-H, J e K. Estes subtipos têm a distribuição diferente em torno do mundo (Novitsky *et al.*, 2001).

A diversidade de HIV-1 é gerada pelo menos por dois mecanismos distintos. Primeiramente as mutações, incluindo acumulativas mutações pontuais, inserções, e deleções que podem ser introduzidos no genoma durante a síntese proviral do DNA pela enzima transcriptase reversa (RT) codificada pelo vírus (Roberts *et al.*, 1988; Mansky & Temin 1995). O segundo mecanismo significativo da mudança genética é através da recombinação, que se torna possível pelo fato de que os retrovirus são diplóides, contendo duas moléculas do RNA dentro das partículas virais. Conseqüentemente, a infecção da célula hospedeira por dois subtipos diferentes pode resultar em partículas virais heterozigotas. Isto, de fato, oferece uma oportunidade para a recombinação ocorrer durante a transcrição reversa (Goodrich & Duesberg 1990; Vartanian *et al.*, 1991).

A classificação dos subtipos de HIV-1 através do sistema filogenético existe desde 1992 e foi baseada inicialmente nos dados gerados de seqüenciamento de pequenos fragmentos, principalmente dos genes *gag* e *env*. Entretanto, tal método de classificação não é mais suficiente para reconhecer as recombinações intersubtipo.

Nosso objetivo neste estudo foi caracterizar em detalhes as principais variantes de HIV-1 circulante no Brasil, através de seqüenciamento e análise de seus genomas, que podem ser essenciais para o desenvolvimento de vacinas bem sucedidas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1

Os primeiros casos de AIDS ocorreram nos EUA no início dos anos 80, entre homens homossexuais e os usuários de droga intravenosas que de repente desenvolveram sarcoma de Kaposi e um tipo raro de pneumonia causado pelo *Pneumocystis carinii* (CDC; MMWR 1981; Gottlieb *et al.*, 1981). Todos os casos tinham baixas contagens de células T CD4+, sugerindo forte associação com deficiências imunes (Masur *et al.*, 1981). Logo após, sintomas idênticos foram relatados em outros grupos da população como os hemofílicos (CDC; MMWR 1982) e receptores de transfusão de sangue (CDC; MMWR 1982). A doença nova foi chamada em 1982 como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Marx 1982). Em 1983, o HIV-1 foi identificado como uma causa do AIDS por Luc Montagnier e colegas no instituto de Pasteur, Paris (Barre-Sinoussi, 1983), e então o vírus foi caracterizado inteiramente em 1984 por Robert Gallo em Washington e por Jay Ley em São Francisco (Marx 1984). Em 1986, uma segunda variante antigênica do HIV foi isolada no oeste da África e designada HIV-2 (Clavel *et al.*, 1986).

2.2

O HIV-1 é um lentivírus que pertença à família retroviridae, baseado na homologia da seqüência genômica, morfologia e no ciclo de reaplicação. A partícula do vírus consiste em duas fitas idênticas do RNA, cada uma aproximadamente com 9.8 kb, empacotados dentro de centro de proteínas viral e envolvidos por uma bicamada de fosfolipídeos com glicoproteínas de superfície. O ciclo reprodutivo do vírus começa quando o virion do HIV infecta uma célula, como consequência as enzimas de dentro do complexo de nucleoproteínas tornam-se ativas. O complexo de nucleoproteínas do vírus rompe-se e a RT transcreve a única fita genômica do RNA em dupla fita de DNA.

A integrase viral também entra no núcleo da célula hospedeira e catalisa a integração do DNA viral no genoma. A forma integrada do DNA, chamado provirus, é então transcrito pela polimerase da célula hospedeira e passa às células filhas cada vez que a célula alvo replica o DNA viral (Vaishnav & Wong-Staal 1991; Kuby 1997).

O genoma do HIV é composto de 9 “*Open Reading Frames*” (ORFs) como mostrado em **Figura-1**. Três de seus principais genes de ORF, denominados *gag*, *pol*, e *env*, são comuns a todos os retrovirus conhecidos; entretanto, outros seis genes de ORF são únicos ao HIV. O “*Long Terminal Repeat*” (LTR), necessário para regular a transcrição dos genes de DNA provirais integrados, flanqueia ambas as extremidades do genoma viral.

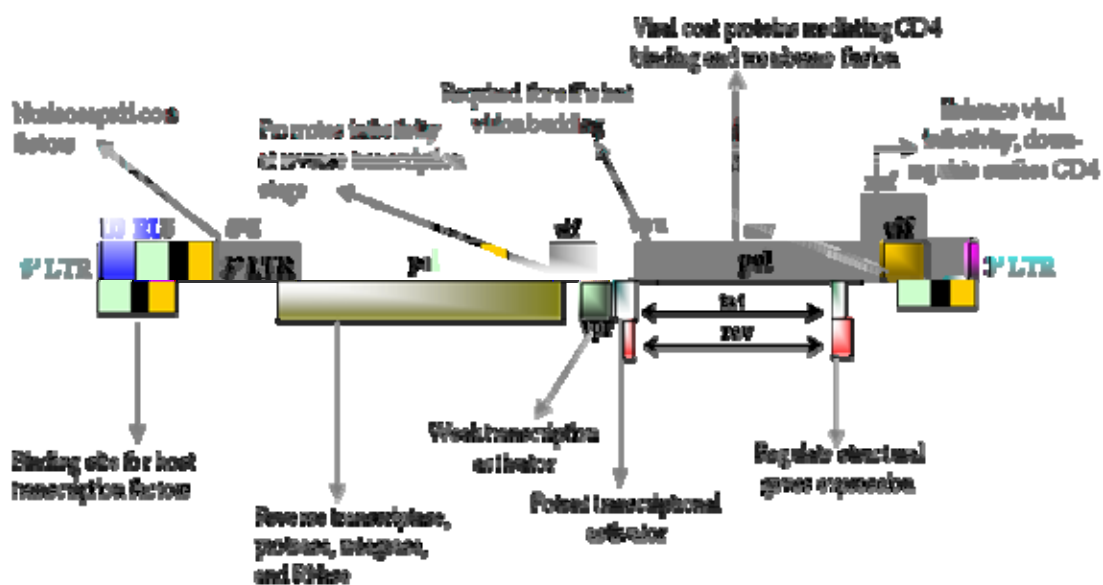


Figura-1- Mapa genômico do HIV-1

Os genes do HIV ORF expressam 15 proteínas (**Tabela-1**). Algumas destas proteínas são essenciais para a estrutura viral, como a *gag*, o *pol*, e os produtos do *env*, enquanto outros genes são necessários para regular as replicações do HIV em diferentes estágios.

Tabela 1 Proteínas do HIV e suas funções:

Gene	Size	Location	Function
Gag	p17	790-1186	-Matrix (MA); undergoes myristylation that helps target Gag polyprotein to lipid rafts -Implicated in nuclear import of HIV pre-integration complex
	p24	1186-1921	Capsid (CA): Structural protein binds cyclophilin A
	p7	1921-2134	Nucleocapsid (NC); RNA binding protein
	p6	2134-2292	Interacts with vpr; contains late domain (PTAP) that binds TSG101 and play role of virion budding
Polymerase (pol)		2085-5096	Encode different HIV enzymes
-Protease (PR)			
-RT & RNase	p10	2253-2550	Posttranslational processing of viral proteins
-Integrase (IN)	p66\pp51	2550-4230	Reverse transcriptase
assembly and budding			

Diversos estudos foram conduzidos para demonstrar os mecanismos moleculares responsáveis pela extrema variabilidade genética do HIV. Mostrou-se que as mutações (Roberts *et al.*, 1988; Pathak & Temin 1990; Sharp *et al.*, 1994; Mansky *et al.*, 1995) e as recombinações são os mecanismos principais para a diversificação genética do HIV.

A alta taxa de mutações do HIV ocorre devido às altas incidências de erro da transcriptase reversa viral, que resulta em uma taxa estimada de substituição de um nucleotídeo no genoma do HIV por cada ciclo replicativo (Williams & Loeb 1992; Caixão 1996a). Conseqüentemente, o isolamento de cepas idênticas dentro da população do HIV é muito raro. Tem sido relatado que os erros genéticos existentes podem ser reposicionados e os erros novos podem ser gerados através do processo de recombinações (Peliska & Benkovic 1994). O HIV-1 exibe alta taxa de transição de G para A, tal processo mutacional é conhecido como o hipermutação e acredita-se derivar da ação de erros predispostos pela transcriptase reversa (Pathak & Temin 1990; Vartanian *et al.*, 1991). Uma razão para a pobre fidelidade do RT é que falta a 3'-5' exonuclease capaz de realizar a leitura de prova. A fidelidade de diversas RT purificadas tem sido medida em sistemas livres de células e as taxas de misincorporação variam de 0.5×10^{-4} a 1.5×10^{-4} (Skalka & Goff (eds) (1993)).

Recombinação é um importante mecanismo que contribui e mantém a diversidade genética nas populações do HIV-1. O processo é possível se os dois RNAs do vírus provenientes de dois subtipos diferentes de HIV (heterotípicos) infectam a mesma célula durante a interação da célula com o vírus (Hu & Temin, 1990). A recombinação do HIV geralmente ocorre durante a transcrição

reversa, onde a RT pode mudar de um molde para outro, resultando em um novo mosaico genômico do HIV, contendo informações genéticas de ambos os RNAs. A ocorrência de recombinação entre os subtipos de HIV tem sido relatada mais frequentemente nas regiões *gag* e *env* (Kampinga *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1995).

As recombinações podem ser indetificadas quando as regiões com “pontos de quebra” que não interrompem a expressão do gen estão envolvidos. Alguns vírus recombinantes de HIV-1 se tornam fixos na população humana e são denominados como formas recombinantes circulantes (CRFs) (Peters & Sharp 2000). Algumas destas linhagens de CRFs predominam em localizações geográficas específicas onde dois ou mais subtipos são prevalentes, sugerindo que a recombinação tenha uma importante influência na dinâmica da população de HIV pelo mundo (Gao *et al.*, 1996; Liitsola *et al.*, 1998; McCutchan *et al.*, 1999).

A recombinação é introduzida na maioria dos genomas retrovirais durante a síntese do DNA proviral devido à cópia de parte de um genoma viral e então a mudança para uma região homóloga de um segundo genoma pela enzima RT do vírus (Coffin 1996b). O diagrama esquemático do processo de recombinação está descrito na **Figura 2**.

Estudos com o objetivo de compreender como a recombinação retroviral ocorre, propõem duas abordagens (Telesenitsky & Goff 1997). A primeira abordagem é conhecida como assimilação da deslocação da fita (*strand displacement assimilation*) e propõe que fragmentos de DNA sejam deslocados durante a síntese da fita positiva de um molde e subsequente assimilação pela fita positiva de DNA sintetizada por outro molde, assim resultando em recombinação durante a síntese da fita positiva (Hunter 1978; Jones *et al.*, 1994). A segunda abordagem é o modelo de escolha de cópia (*copy choice*

model), que propõe que a maioria das recombinações retrovirais ocorre durante a síntese da fita negativa (**Figura-3**) (Hunter 1978; Jones *et al.*, 1994).

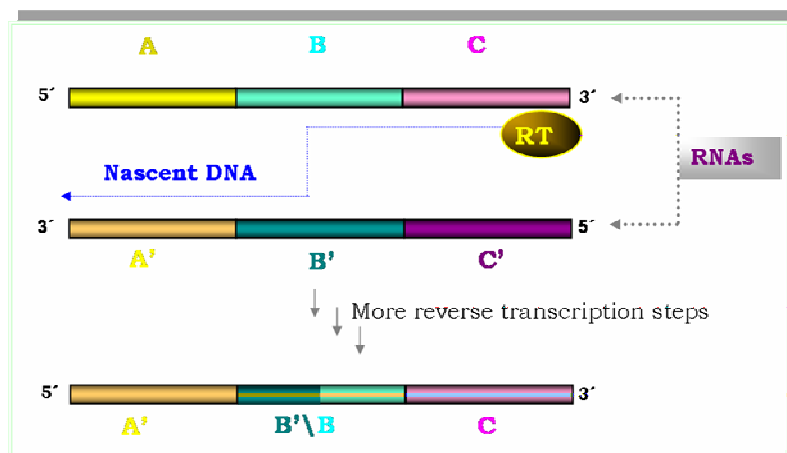


Figure-2 Recombinogenic templates switching during reverse transcription.

Atualmente existem vários métodos disponíveis para detectar ou caracterizar o histórico de recombinação de HIV a partir de um grupo de seqüências de DNA alinhadas. Geralmente os métodos de recombinação podem ser classificados em quatro categorias, dependendo da abordagem usada no seu algoritmo, como pode ser observado adiante:

2.4.2.2.1

Os métodos de distância usam a quantidade de dissimilaridade (distância) entre seqüências alinhadas para gerar árvores (Weiller 1998). Estes métodos geralmente resumem as informações em formato de janela e computam a distância entre as seqüências de acordo com alguma medida estatística, então descartam os dados atuais e usam somente distâncias fixas para estimar a recombinação. Uma vez que eles não requerem filogenia, os métodos de distância são computacionalmente rápidos e dependem fortemente na escolha das seqüências de referência (revisto por David Posada 2002). A aplicação de

tais métodos inclui SIMPLOT (Lole *et al.*, 1999), PHYPRO (Weiller, 1998) e TOPALi (Milne *et al.*, 2004).

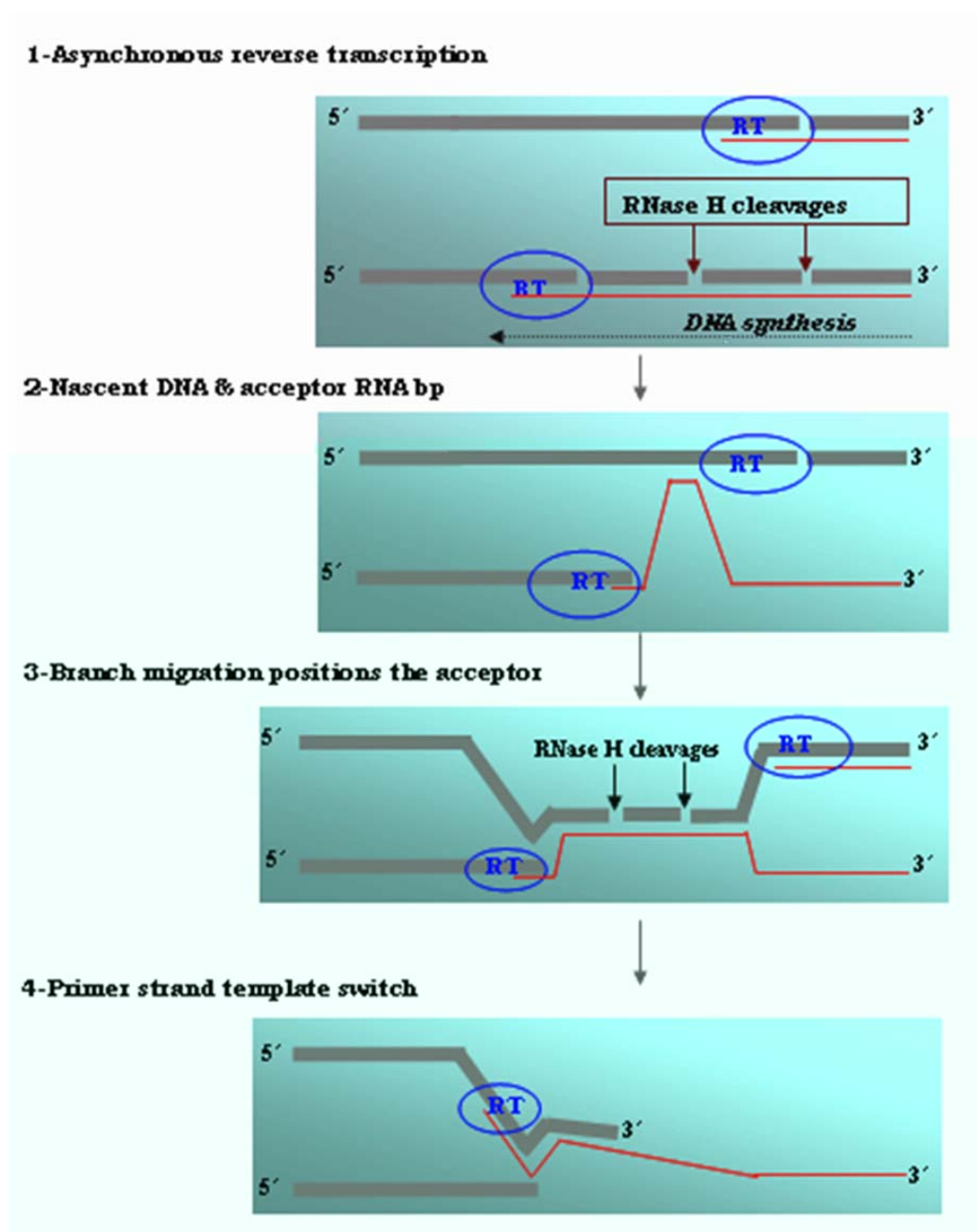


Figure 3. Recombinação de acordo com o modelo de escolha de cópia

2.4.2.2.2

Os métodos de árvores filogenéticas atuais assumem que exista uma única topologia de árvore de diferentes partes do genoma do HIV. A presença de recombinação pode violar esta hipótese e pode resultar na topologia de árvores diferentes. Recombinações nas árvores filogenéticas podem ser identificadas pelo comprimento dos ramos terminais, onde os comprimentos totais dos ramos são maiores e os tempos do ancestral comum mais recente menor que para uma árvore reconstruída de uma seqüência não recombinante (Schierup & Hein 2000). Se as características anteriores resultarem na imposição de uma única filogenia em diferentes locais do genoma do HIV-1 sob investigação, então existe uma forte evidência de recombinação (Lole *et al.*, 1999; Martin & Rybicki 2000). Aplicação de métodos usados para a procura por informações filogenéticas conflitantes inclui LARD (Holmes *et al.*, 1999), PLATO (Grassly & Holmes 1997), e BOOTSCAN (Salminen *et al.*, 1995).

2.4.2.2.3

Estes métodos somente consideram locais informativos parcimoniosamente e não precisam de filogenia para o conhecimento das seqüências (Drouin *et al.*, 1999). Eles podem ser usados para identificar a localização de regiões convertidas e a direção dos eventos de conversão. RETICULATE (Jakobsen & Easteal, 1996) é uma das aplicações que calcula a compatibilidade de matrizes.

2.4.2.2.4

O conceito destes métodos é baseado em identificar estatisticamente segregações de substituições na seqüência de DNA ou que as substituições são conforme as características de uma distribuição da probabilidade esperada (Stephens, 1985; Sawyer, 1989).

2.4.3

A chave da recombinação do HIV pode facilmente ser explicado pela compreensão da síntese do HIV provírus. Diversos alvos são necessários para intervir na síntese do DNA proviral do HIV. Isto inclui a ligação do primer de tRNA, degradação de RNA pelo domínio RNase H da RT e a síntese da segunda fita pela RT (**Figura-4**). Logo que o vírus do HIV invade a célula, as enzimas do complexo de nucleoproteínas tornam-se ativas, o centro do vírus se rompe e então o genoma (RNA) começa a ser transcrito. O processo começa quando os *primers* de tRNA se ligam ao sítio de ligação específico (PBS) na região 5' terminal do genoma onde a enzima RT inicia a transcrição do curto DNA (U5&R) que compreende o LTR (**Figura 4-I**). O produto deste passo é chamado de (*minus strand strong stop DNA template*). A pequena cópia de DNA hibridiza com a região R no 3' terminal do genoma (De Stefano *et al.*, 1991) (**Figura 4-II**). A síntese da fita negativa do DNA é continuada, acompanhada pela degradação pela RNase de todos os moldes de RNA copiados, exceto os dois curtos tratos polipurinos (*short polypurine tracts - PPT*) que são usados como *primers* para a síntese da fita positiva (**Figura 4-III**). A síntese da fita positiva começa com o uso do PPT, localizado próximo ao U3 do LTR 3', e continua para o final 5' do molde, resultando em um produto conhecido como *strand positive strong stop DNA template* (Charneau *et al.*, 1991; Chaneau *et al.*, 1992). Este produto então pula para o final 3' do molde e hybridiza com o PBS complementar como mostrado na **Figura 4-IV**. A Transcrição termina no sinal de terminação central (CTS, localizado próximo do final 3' da *pol*). A síntese começa a partir do trato polipurino central (cPPT) , localizado no final da região *pol*, prossegue para o final 3' da fita negativa. A síntese das duas fitas é então completa no final cego com um longo terminal *repeat* am ambas as pontas. (**Figura 4-V**)

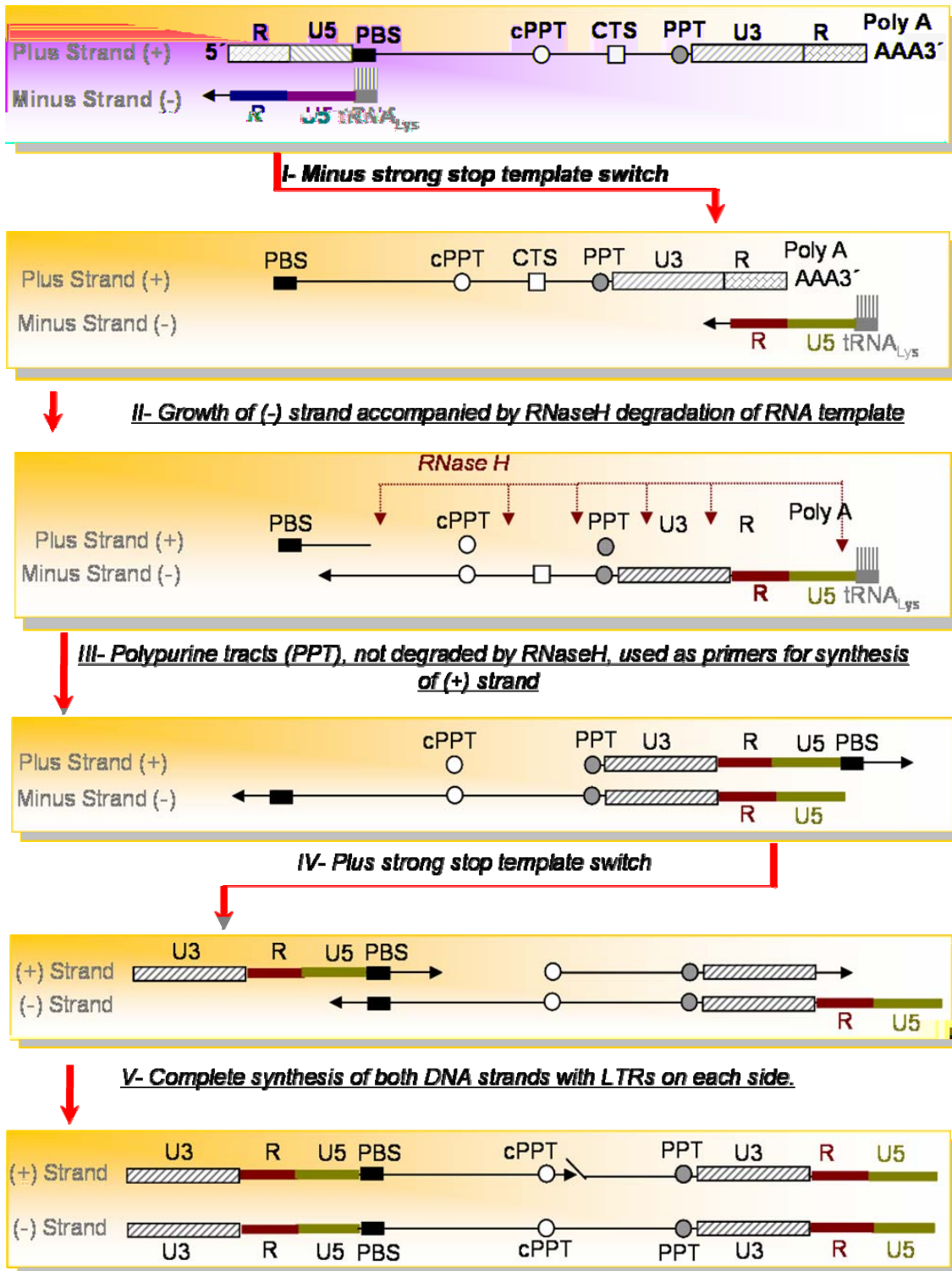


Figura 4. Síntese de DNA provirus pela Transcrição Reversa (figura com pequena modificação retirada de Wenfeng & Telesnitsky 2002).

2.5

A família do HIV tem sido classificada em dois vírus relacionados distantemente, HIV-1 e HIV-2, que diferem entre si por 50 a 60% no nível de nucleotídeos. Estudos iniciais de seqüenciamento do HIV forneceram uma evidência de uma extraordinária variabilidade genética entre o HIV-1 e HIV-2 (Hahn & Shaw 1986; Srinivasan *et al.*, 1987; Clavel *et al.*, 1986). A análise filogenética dos dados gerados da seqüência de nucleotídeos de *env* e *gag* do HIV-1 identificaram a existência de 3 grupos principais, designados como grupo M, O, e N do HIV-1, conforme mencionado previamente. Dentro do grupo M, 9 subtipos (A-D, F-H, J e K) diferem entre si na composição de aminoácidos em pelo menos 20% na região *env* e 15% na região *gag*. Diferenças intrasubtipos podem ser de até 10% na região *env* e até 8% na região *gag* (Myers 1994). Estes subtipos genéticos são aproximadamente eqüidistantes entre si, embora o subtipo B e D pareça ser relacionado mais proximamente. Grupo O foi identificado inicialmente em pacientes de Camarão em 1990 (De Leys *et al.*, 1990), mas a sua epidemia foi relatada datar de antes de 1960 (Josassen *et al.*, 1997). Em estudos recentes sobre a heterogeneidade do grupo O foram identificados 5 clusters filogenéticos (A-E), e um isolado inclassificável (U) com um nível de diversidade genética similar àquele do grupo M (Yamaguchi *et al.*, 2002). A classificação das linhagens de HIV existentes até o momento presente pode ser vistas na **Figura-5**.

2.5.1

Os métodos de tipagem e subtipagem do HIV empregam tanto técnicas moleculares, que comparam diretamente a composição de nucleotídeos dos diferentes isolados, quanto um ensaio sorológico indireto, para identificar epítopos antigênicos únicos.

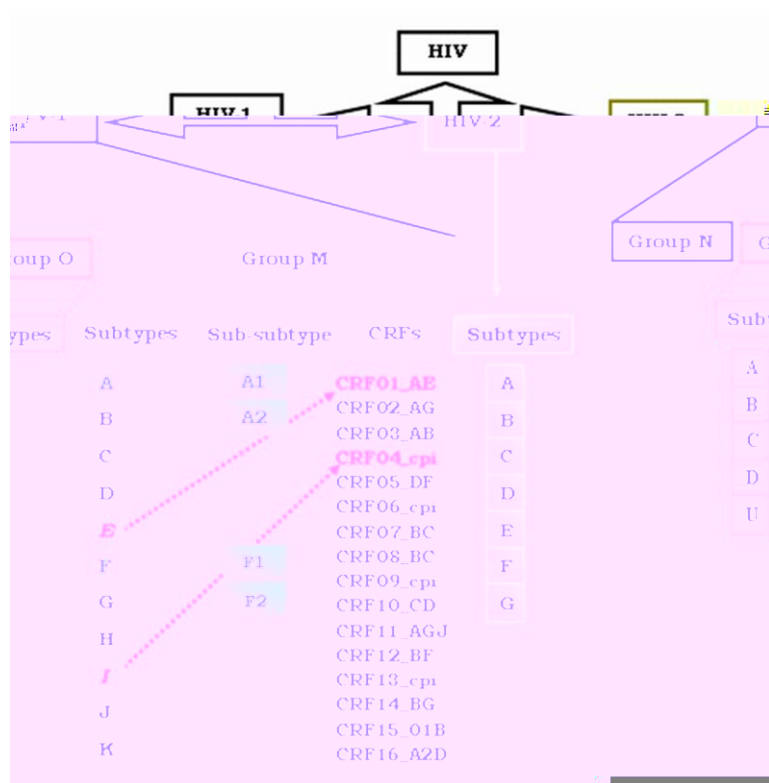


Figura-5 Esquema de classificação do HIV

2.5.1.1

O ensaio é baseado em um sistema onde os produtos de PCR amplificados (ssDNA) de uma importante parte do genoma de HIV-1, são hibridizados a uma única sonda específica do subtipo do HIV-1 imobilizada em tiras de membrana de nitrocelulose ou na superfície de orifícios de placas de microtitulação por uma ligação biotina-streptoavidina. As reações dos produtos amplificados com sondas específicas para as regiões do HIV podem ser detectadas com um anticorpo anti-DNA. A ligação do anticorpo pode ser detectada então por uma reação imunoenzimática colorimétrica. Este método tem sido relatado ser eficaz para um rápido *screening* das variantes prevalentes de HIV-1 por vários estudos (Rayfield *et al.*, 1998; Subbarao *et al.*, 1998; Plantier *et al.*, 2002). Entretanto, a alta taxa de evolução do HIV-1 e a sua ampla distribuição pelo mundo requer uma definição e uma regular re-avaliação das sondas adaptadas a um contexto

regional. Além disso, este ensaio é baseado na análise de seqüências curtas de uma única região de uma relevante parte do genoma de HIV, isto pode resultar em ausência de hibridização se um vírus recombinante for avaliado.

2.5.1.2

Esta técnica foi desenvolvida baseando-se na análise do RFLP do ORF *gag*, uma região já usada para distinguir entre diferentes linhagens virais (van Harmelen, *et al.*, 1999). O método se baseia na identificação da endonuclease de

2.5.1.4

Além da detecção, o método de PCR foi adaptado para ser usado como instrumento de tipagem. A escolha da sequência de *primers* é o parâmetro mais crucial e deve ser desenhada baseando-se em seqüências conhecidas. Os subtipos do HIV podem ser determinados pelo uso de pares de *primers* que devem ser capazes de amplificar uma seqüência alvo específica para cada subtipo e permitam a separação de subtipos baseando-se na ausência ou presença de produtos específicos de PCR amplificados, com diferentes tamanhos, por eletroforese em gel de agarose. O método tem demonstrado ser eficiente para uma rápida tiragem do subtipo prevalente na Tailândia e muitos países do sudoeste asiático (subtipos CRF AE & B) e na China (subtipos B, C, CRF01-AE, CRF07-BC, and CRF08-BC) (Chen *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2004). Embora o método seja fácil de ser realizado e possa ser aplicado em estudos de grande escala, ele discrimina poucos subtipos.

2.5.1.5

Este ensaio foi descrito por Kostrikis *et al.*, em 1998 e determina subtipos genéticos do HIV analisando as seqüências que codificam a região *env*. O COMA se baseia na cinética de denaturação diferencial de heteroduplex longo de DNA. A técnica trabalha com a combinação de produtos referência de PCR amplificados e seqüências conhecidas de nucleotídeos com a complementar fase-solução e DNA marcado antigenicamente com seqüências desconhecidas. Tais reações permitem a formação do heteroduplex combinatorial de DNA. Diferenças na curva de denaturação da fita heteroduplex de DNA nas aplicações práticas são devido a diversidade genética de seqüências conhecidas e desconhecidas. O ensaio pode ser aplicado para uma rápida triagem dos subtipos de HIV em amostras de grande escala (Robbins *et al.*, 1999). Uma principal desvantagem do COMA é que ele é menos informativo e deve ser complementado com outros métodos.

2.5.1.6

Em contraste com outros métodos de subtipagem, o seqüenciamento de DNA é considerado a subtipagem de HIV de padrão ouro. Este método tem um poder discriminatório muito maior para identificar os subtipos de HIV. Geralmente a técnica começa com uma amplificação por PCR de uma amostra de DNA dirigida à uma região genética do HIV de interesse, seguida pela reação de seqüenciamento com os produtos do PCR. Os dados gerados do seqüenciamento do DNA podem ser analisados por métodos filogenéticos. O sistema filogenético é usado para agrupar seqüências de HIV que possuem uma origem evolucionária similar. A história evolucionária inferida pela análise filogenética é usualmente representada como diagrama de ramos que representam um tipo de estirpe das relações herdadas entre as seqüências virais. A subtipagem do HIV através das análises filogenéticas foi descrita inicialmente em 1992 e revelaram cinco (A-E) e quatro (A-D) subtipos de acordo com a região *env* e *gag*, respectivamente (Myers, 1992). Desde então, a classificação tem sido continuamente avaliada e atualizada conforme novos dados de novos isolados virais se tornam disponíveis.

2.5.1.7

A determinação dos subtipos de HIV pode ser feita indiretamente através de ensaios de sorotipagem. Os métodos são baseados na detecção de subtipos específicos de anticorpos direcionados a epitopos codificados na região imunodominante da gp41 e no C terminal da gp 120 (Zolla-Pazner *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1999). Diferentes estudos têm avaliado os ensaios quanto à execução os definem como simples, rápidos e convenientes para estudos em grande escala (Unutmaz & Littman 1997; Morgado *et al.* 1994; Casseb *et al.*, 2002). Entretanto, estes ensaios fornecem informações limitadas e dão resultados confiáveis somente quando usados para diferenciar infecções com o subtipo B do HIV-1 de infecções com outros subtipos (Murphy *et al.*, 1999).

2.6

Embora todos os tipos do HIV sejam similares, todos possam ser transmitidos por via sexual e parenteral, e causem AIDS na maioria dos indivíduos infectados, existem algumas evidências de que a classificação do subtipo possa ser refletida em diferenças fenotípicas. Tais diferenças entre os subtipos de HIV são de importância clínica não somente pela transmissão viral, mas também para a resistência à drogas e o desenho de vacinas. Os avanços no desenvolvimento do seqüenciamento do DNA têm feito esta técnica mais fácil para determinar a heterogeneidade viral em epidemias nacionais, resolver epidemias por aplicar a análise filogenética e detectar mutações associadas com resistência antiretroviral.

2.7

Os recentes avanços em seqüenciamento de DNA têm feito a caracterização do genoma completo do HIV factível e importante. O vírus foi inicialmente classificado em subtipos baseando-se na geração de dados de pequenos amplicons subgenômicos, principalmente dos genes *gag* e *env*, os quais não necessariamente dão um resultado confiável na subtipagem genética do vírus, além de não ser possível identificar recombinações possíveis. Assim, na ausência de uma completa caracterização e análise dos subtipos do HIV-1, nós corremos o risco de gastar décadas fazendo observações irrelevantes sobre linhagens pobremente caracterizadas. Ao invés disso, uma completa e bem estudada análise do subtipo genético do vírus pode elucidar a relação entre a evolução genética e as propriedades biológicas do HIV de diferentes regiões do mesmo vírus. Tais informações nos permitam uma melhor compreensão das mudanças adaptativas que ocorrem durante a evolução viral e o efeito destas mudanças na patogênese. Além disso, a resposta imune à vacinas baseada em únicos genes, com *env* tem sido limitada (Connor *et al.*, 1998) e a atenção tem

sido direcionada para vacinas multivalentes que incorporem múltiplos produtos gênicos.

Os subtipos do HIV-1 e CRFs mostram um forte padrão de distribuição na pandemia global (**Figura-6**). Países do oeste continuam a apresentar uma pandemia que é quase exclusivamente o subtipo B em todos os grupos de risco. A Tailândia originalmente mostrou forte segregação dos subtipos entre os grupos de risco, com transmissão heterossexual devido em grande parte a CRF01_AE e a transmissão em usuários de drogas injetáveis (*intravenous drug users* - IDU) devido ao subtipo B; desde então CRF01_AE tem se tornado predominante em todos os grupos de risco (Mastro *et al.*, 1997; McCutchan *et al.*, 2000; Cy *et al.*, 1993). Índia, Etiópia e África do Sul estão sofrendo uma explosiva epidemia do subtipo C (Lole *et al.*, 1999; Van Harmelen *et al.*, 1999). Recombinações intersubtipo com o subtipo C são comuns na Tanzânia e duas formas recombinantes de BC, denominadas CRF07_BC and CRF08_BC, estão circulando entre usuários de drogas intravenosas na China (revisto por Thomson *et al.*, 2002a). Todos os subtipos do HIV descritos até o momento também foram detectados na África sub-Sahara. Os vírus do subtipo A são mais prevalentes na região central e leste da África e causaram uma epidemia muito espalhada em usuários de drogas intravenosas em países do Leste Europeu, os antigos formadores da União Soviética. Outros subtipos menos freqüentes incluem principalmente o subtipo D, que ocorre no Leste da África, e o subtipo F, que foi inicialmente descrito no Brasil e na Romênia (Dumitrescu *et al.*, 1994). As linhagens de HIV predominantes no Sudeste da Ásia são uma forma de subtipo B do HIV e podem ser distinguidas daquelas do Oeste por mutações no gene *env*.

O subtipo A/E de HIV foi inicialmente descrito na Tailândia como um novo subtipo 'E'. Subseqüentes análises do genoma completo desta forma mostraram que ela é recombinante entre o subtipo A e subtipo E. Isolados desta

linhagem foram então denominado subtipo A/E. Como esta linhagem é muito prevalente na Ásia, ela foi uma das primeiras a serem renomeadas na nova nomenclatura de CRFs. Agora ela é denominada de HIV CRF01_AE.

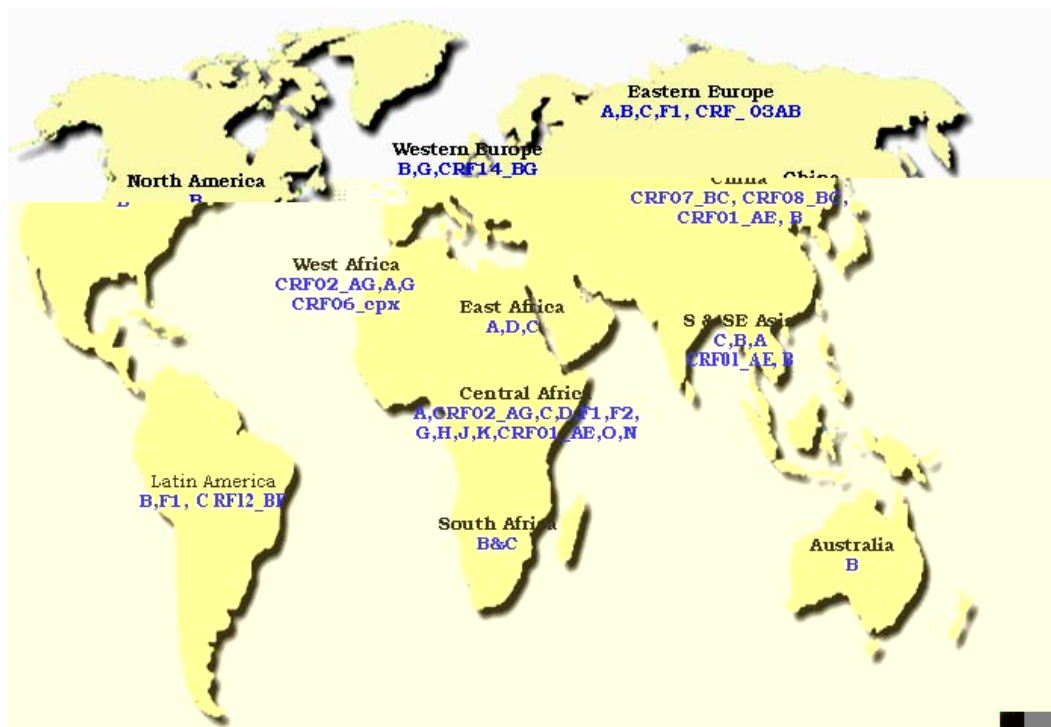


Figura-6. Distribuição geográfica dos subtipos de HIV-1 em escala global.

Tem sido estimado que no final de 2003 a América do Sul contabilizava cerca de $1,6 \pm 0,3$ milhões (8%) dos 40 ± 4 milhões de adultos e crianças com HIV/AIDS no mundo (UNAIDS/WHO 2003). A epidemia está concentrada entre pessoas pertencentes a grupos de alto risco, como usuários de drogas injetáveis e homens que fazem sexo com homens (*men who have sex with men* - MSM). Os subtipos genéticos do HIV mais prevalentes na América do Sul são o subtipo B, BF recombinante e F (Hierholzer *et al.*, 2002). CRF12_BF e sua forma recombinante relacionada são amplamente circulantes na Argentina (Carr *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2002b).

O Brasil é um dos países da América Latina que tem sido mais duramente atingido pela epidemia do HIV e tem o segundo maior número de casos de HIV-1 das Américas, depois dos estados Unidos, com um número estimado de 610.000 casos de HIV/AIDS no final de 2001 (Global AIDS program, 2004). Existe cerca de 130.000 órfãos da AIDS registrados no país. A doença matou por 10.000 vidas no ano passado. O padrão da epidemia de AIDS no Brasil tem sido similar ao dos países industrializados e tem mudado consideravelmente ao longo dos últimos anos (Castilho *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2001). A epidemia tem afetado muitos municípios brasileiros e aumentou significativamente em mulheres, pessoas pobres e setores marginalizados da sociedade. Em 2000, 59% dos municípios brasileiros relataram pelo menos um caso de AIDS. Entre 1985 e 2000 a taxa masculina/feminina de infectados mudou dramaticamente de 25/1 para 2.5/1. O contato sexual é o modo principal de transmissão para 54% dos casos de AIDS. O contato heterossexual por si só é o modo de infecção líder que mostrou um brusco aumento de 25.8% em 1991 para 56,1% em 2002, seguido por MSM e IDU. Durante os primeiros anos de epidemia mais de 90% dos casos eram entre aqueles com pelo menos 11 anos de educação formal. Nos anos de 1999/2000, 72% dos casos eram entre aqueles com um máximo de 8 anos de educação formal, incluindo pessoas analfabetas (AIDS Epidemiological Bulletin, 2003 BMH/DST/AIDS). Geograficamente, enquanto a prevalência do HIV está concentrada na região Sudoeste, a epidemia se espalhou para todos os estados no país.

Um total cumulativo de 55.772 pacientes com AIDS foram diagnosticados entre os períodos de 1980-2003 no Estado de São Paulo, destes 54.030 eram adultos e 1.742 eram crianças. O declínio na incidência anual da AIDS observado desde 1999 tem sido substancialmente acelerado nos últimos três anos pelo aperfeiçoamento da terapia. A transmissão da AIDS em São Paulo continua sendo predominantemente por contato sexual.

O subtipo B de HIV é a principal forma genética circulante no país. Entretanto, a existência de pequenas proporções de outros subtipos tais como

F, C, B/C e B/F tem sido constantemente relatadas. (Sabino *et al.*, 1994; Cornelissen *et al.*, 1996; Bongertz *et al.*, 2000; Caride *et al.*, 2000). Estudos da prevalência do subtipo B do HIV no país indicam que a presença deste subtipo é provavelmente o resultado de um iniciador derivante de uma introdução inicial seguida por uma rápida expansão da linhagem B com limitada variabilidade. O subtipo F é considerado o principal subtipo não-B circulante no país. Crescente incidência do subtipo C do HIV foi encontrada no sul e sudeste do Brasil e representa 30% dos subtipos de HIV circulantes nestas regiões (Soares *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

Os objetivos centrais deste estudo foram estabelecer um protocolo para amplificar e sequenciar o genoma completo das linhagens de HIV-1 circulante no Brasil. As informações geradas foram utilizadas para alcançar os seguintes objetivos:

- Investigar a diversidade das linhagens de HIV-1 prevalentes no Brasil por análise dos respectivos genomas completos.
- Descrever a estabilidade da classificação original de subtipos ao nível de genoma completo
- Fornecer novas informações genéticas das variantes de HIV-1 brasileiras que podem servir como material de referência para pesquisas com HIV e desenvolvimento de vacinas.
- Investigar a existência de CRFs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1

Foram selecionadas 22 amostras de pacientes previamente diagnosticados como infectados por cepas não recombinantes de HIV-1. Em todos os casos a subtipagem do HIV-1 foi baseada na informação de seqüências parciais das regiões *pol* e/ou *env* do genoma. Estas amostras foram coletadas de pacientes que residiam em três diferentes regiões do Brasil: São Paulo, Rio Grande do Sul e Manaus.

4.2

O DNA foi extraído diretamente das amostras de sangue usando-se o Kit QIAamp Blood Extration (Qiagen, Chatsworth, CA), de acordo com instruções do fabricante. Descrevendo brevemente, a lise foi feita com detergente na presença de Proteinase K por 10 minutos a 56° C. O material lisado foi aplicado a uma coluna contendo uma membrana com sílica-gel, centrifugado e lavado. O DNA purificado foi eluído das colunas em 200 µL de tampão Tris-HCl (10mM, pH 8,0) e estocado a - 20° C para amplificação por PCR.

O procedimento de extração de DNA foi realizado sob condições criteriosas laboratoriais para se evitar contaminação da PCR. Alíquota de todos os reagentes, de extração, pré PCR e as etapas de manipulação de pós PCR foram feitas em ambientes fisicamente separados contendo cabines de fluxo laminar com descontaminação Ultra-Violeta. Para testar possível contaminação das reações, foram realizadas extrações e PCR negativas em todos os experimentos. Outras medidas de precaução foram adotadas, como o uso de ponteiros resistentes a aerosol e materiais plásticos descartáveis.

A concentração do DNA genômico extraído das amostras sob investigação foi determinada pela comparação das bandas das mesmas em relação ao

tamanho e intensidade das bandas do marcador High DNA mass ladder (Invitrogen), usando-se gel de agarose 0,5 a 1% (Promega). Todo DNA genômico extraído foi submetido a amplificação de um gene para controle interno (β -globina) com os primers PC03 e PC04 (Marchioli *et al.*, 1996) para avaliar a integridade do DNA e excluir a presença de inibidores de PCR.

4.3

Nós inicialmente tentamos amplificar o DNA proviral do HIV-1 por nested PCR usando-se os primers e métodos descritos por Thomson *et al.*, 2002b que resultaria em um conjunto de 4 fragmentos subgenômicos sobrepostos, denominados A, B, C e D. Entretanto, esta estratégia falhou ao amplificar o fragmento B de todos os isolados. Então, este fragmento foi dividido em dois sub-fragmentos sobrepostos (B1 & B2) e novos primers internos foram desenhados especialmente para sua amplificação. Os primers usados para amplificar o genoma completo do HIV estão descritos na **tabela 2**. As características e as localizações aproximadas dos fragmentos amplificados de acordo com o sistema de numeração de bases da cepa de HIV-1 HXB2 são mostradas na **figura 7**.

As PCRs foram realizadas em duplicata para eliminar possíveis artefatos, garantindo que os genomas completos seqüenciados não foram gerados de alvos de DNA heterogêneos. As reações foram preparadas em um volume final de 50 μ L, e cada mistura de reação continha 0,5 - 1,5 μ g de DNA, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer, 2,0 mM de $MgCl_2$, 10 mM Tris HCl (pH 8,3) e 0,50 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A ciclagem térmica foi sempre de início quente a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 seg, 58,5°C por 30 seg e 72°C por 3 min, e uma extensão final de 72°C por 10 min (Mastercycler Gradient Thermocycler; Eppendorf Scientific).

Os produtos de PCR de primeiro round (alíquotas de 2 μ L) foram amplificados com os primers de nested sob as mesmas condições. A eficiência da amplificação de PCR foi otimizada pela alteração da concentração de $MgCl_2$ e

temperaturas de anelamento usando-se o ciclo de PCR por gradiente (termociclador Eppendorf).

Tabela-2 Pares de primers usados na amplificação por PCR neste estudo.

Primer	Nucleotide Sequence (5'-3')	Location*	Orientat ^a
Fragment A			
SC-AOS	AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG G	521-554	Forward ¹
SC-AOA	TTTATGGCAAATACTGGAGTATTGTATGGA	2711-2740	Reverse ¹
SC-ANS	GC'TTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTG	546-570	Forward ²
SC-ANA	C'TTTGGGCCATCCATTCTCTG	2590-2610	Reverse ²
Fragment B-I			
SC-BOS	GCTAA'TTTT'TAGGGAAGATCTGGCCTT	2080-2107	Forward ¹
IN-B02R	AAATCAC'TAGCCATTGCTCTCCA	4284-4306	Reverse ¹
SC-BNS	AGCCCCACCAGAAGAGAGCTT	2157-2177	Forward ²
IN-B01R	CCACTCAGGAATCCAGGTGG	3772-3791	Reverse ²
Fragment B-II			
IN-B2OS	CTCARGACTT YTGGAAGTT C	2800-2820	Forward ¹
SC-BOA	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATATGT	5242-5267	Reverse ¹
IN-B01S	GATGGGTTATGAACTCCATCCTG	3772-3791	Forward ²
C-BNA	CCCTAGTGGGATGTGTACTTCTGAACTTA	5192-5220	Reverse ²
Fragment C			
SC-COS	TACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGACATAA TA	4809-4841	Forward ¹
SC-COA	TGTCTGGCCTGTACCGTCAGCG	7831-7852	Reverse ¹
SC-CNS	CAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACA	4890-4917	Forward ²
SC-CNA	GCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACC	7786-7808	Reverse ²
Fragment D			
SC-DOS	TTGAACCAAYTAGGAGTAGCACCCAC	7696-7720	Forward ¹
SC-DOA	AGAGAGACCCAGTACAGGCAAAAGC	9523-9548	Reverse ¹
SC-DNS	ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTG	7719-7742	Forward ²
SC-DNA	GTACAGGCAAAAAGCAGCTGCTTATATG	9510-9537	Reverse ²

*Posições nucleotídicas referentes a cepa HXB2.

-¹ primers externos, ² primers internos.

4.4

Os produtos do nested foram detectados pela aplicação de 2 µL dos mesmos em 2 - 4 µL de tampão de corrida padrão dentro de cada poço do gel. Um gel de agarose a 1% para eletroforese foi feito com tampão Tris borato 0,5X contendo EDTA. A corrida eletroforética foi a 100 volts por um período de 30 minutos, no mesmo tampão. A detecção foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (concentração final 0,5 µg / mL) e visualizada sob iluminação Ultra-Violeta. Os produtos amplificados foram preparados para seqüenciamento

de DNA removendo-se o excesso de primers e dNTPs que sobram na solução utilizando-se o Kit QIAquick PCR purification (Qiagen Inc., Valência, CA).

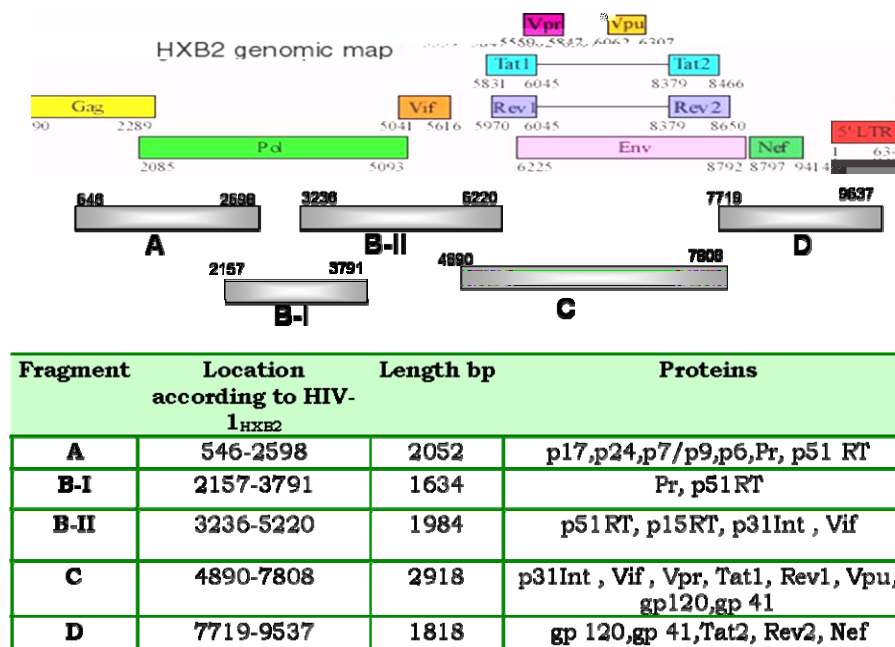


Figura 7. Diagrama mostrando o mapa de localização dos 5 fragmentos sobrepostos amplificados relativos as posições do HIV-1 cepa HXB2.

4.5

Os produtos de PCR foram diretamente seqüenciados através dos primers por nós desenvolvidos e outros primers internos publicados (**Tabela 3**) que determinam as seqüências nucleotídicas de ambas as fitas como mostra a **figura 8**. As reações de seqüenciamento consistiam em 50 - 100 ng de produto de PCR, 1 µL de BigDye Terminator (Versão 2.0; Applied Biosystems), 1,5 pmol de primer, 3 µL de um tampão de diluição (400mM de Tris HCl, 10mM MgCl₂, pH 9,0) em um volume final de 10 µL. A reação de seqüenciamento foi realizada em placas com 96 wells onde a ciclagem consistia em 25 ciclos de 96°C por 10 Seg., 50°C por 5 Seg. e 60°C por 4 min. As reações de seqüenciamento foram purificadas pela precipitação com isopropanol. Os produtos precipitados foram ressuspensos em tampão de corrida para amostras (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) e analisados usando-se o sistema de eletroforese em capilar ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

Os dados dos fragmentos seqüenciados foram editados, alinhados em seqüências contíguas numa sobreposição mínima de 30 pb com uma combinação mínima de 99 - 100% e o consenso de ambas as fitas foi formado pelo programa Sequencher (Gene Code Corp., Ann Arbor, Mich.). Cada critério de alinhamento previne qualquer sobreposição errada de fragmentos se estes não derivarem da mesma variante. Todas as seqüências foram checadas para contaminação através da procura pelo BLAST contra o banco de dados de seqüências de HIV-1 e entre elas mesmas.

4.6

O alinhamento de múltiplas seqüências, incluindo seqüências referencia representativas dos subtipos A-D, F-H, J e K (<http://hiv-web.lanl.gov>), foi realizado pelo programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) com o parâmetro de alinhamento padrão "slow-accurate" e a tabela de peso residual Gonnet250. As seqüências alinhadas foram manualmente editadas e ajustadas para o tamanho mínimo comportado pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999).

As lacunas das seqüências alinhadas foram triadas para a presença de recombinações padrões pelo programa SIMPLOT (Lole et al., 1999), um método que identifica posições putativas de recombinação pela porcentagem de plotting visualizada de arvores permutadas ao logo do tamanho de cada seqüência.

Seqüências com sugestiva recombinação foram comparadas ao painel de referência, e subseqüentemente analisadas pela decomposição dividida (split decomposition) para investigar a influencia da recombinação na evolução de amostras recombinantes usando-se o SPLITSTREE versão 3.2 (Huson 1998). A decomposição dividida é um método de parcimônia que não força os dados em um ramo bifurcado ou em uma arvore filogenética. O método resulta em uma arquitetura ou estrutura em rede de nós como uma indicação de recombinação inter-subtipo. A análise foi realizada usando-se F84 distance (Maximum

Likelihood), com igual comprimento das extremidades e 100 bootstrap replicates. A transformação da distancia foi computada pelo Neighbor - Net network (Bryant & Moulton 2001). O método de filogenia pelo bootscaneamento foi posteriormente usado para determinar a posição dos breakpoints (Salminen., *et al* 1995). Para ambos os métodos (Simplot e Bootscan), as distancias nucleotídicas foram calculadas em uma janela deslizante de 500 pb movendo-se em etapas de 20 pb pelo modelo F84 de evolução, transição/transversão relação 2.0. Um valor de corte de 70% de bootstrap foi considerado decisivo para atribuição do parentesco. Regiões recombinantes do alinhamento determinadas pelos pontos cruzados do bootscaneamento foram avaliados separadamente por análise filogenética.

O parentesco filogenético foi estabelecido pelo programa MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) e análise pelo método neighbor joining usando-se o modelo evolucionário Kimura 2-P e 1000 replicações de bootstrap para todas as seqüências. Entretanto, existem outros modelos avançados para estimar o distanciamento genético do HIV, a combinação entre neighbor joining e o modelo Kimura 2-P, aqui usado, tem pequeno efeito na acuracia da construção da árvore (diferença nucleotídica < 10%). O efeito do modelo Kimura 2-P pode tornar-se significativo se as seqüências na árvore exibirem diferenças maiores

Tabela 3: primers usados para sequenciar os 5 fragmentos sobrepostos cobrindo o genoma inteiro do HIV.

Primer	Nucleotide Sequence (5'-3')	Location*	Orientata
Fragment A			
SC-ANS	GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTG	546-570	Forward
+ 04	CAGTAGCAACCCTCTATTGTGT	1031-1052	Forward
+ 06	ATGAGGAAGCTGCAGAATGGG	1406-1426	Forward
+ 08	TAGAAGAAATGATGACAG	1817-1834	Forward
+ 10	ACCAGAGCCAACAGCCCC	2145-2162	Forward
- 01	ATGCTGAAAACATGGGTA	1295-1312	Reverse
- 03	GAAGGGTACTAGTAGTTC	2264-2281	Reverse
- 05	ATTGCTTCAGCCAAAACCTCTGC	1867-1889	Reverse
- 07	GTTCCCTGAAGGGTACTAGTAGTTC	1502-1525	Reverse
SC-ANA	CTTTTGGGCCATCCATTCTCTG	2590-2610	Reverse
Fragment B			
+ 12	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC	2519-2539	Forward
+ 14	CTCARGACTT YTGGAAGTT C	2800-2820	Forward
+ 16	GATGGGTTATGAACCTCCATCCTG	3236-3258	Forward
+ 18	CTGGATTCTGAGTGGGAGTT	3776-3796	Forward
+ 20	AAATGAACAAGTAGATAAATTAGT	4181-4204	Forward
+ 22	CAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	4658-4678	Forward
SC-BNS	AGCCCCACCAGAAGAGAGCTT	2157-2177	Forward
- 11	CCATTCTGCTTTAATTTTACTGGTA	2572-2598	Reverse
- 13	GTATGTCATTGACAGTCCAGC	3301-3321	Reverse
- 15	GCATCHCCCACATCYAGTACTG	2869-2890	Reverse
- 17	CCACTCAGGAATCCAGGTGG	3772-3791	Reverse
- 19	AAATCACTAGCCATTGCTCTCCA	4284-4306	Reverse
- 21	TAAGATGTTTCAGCTGATCTC	4726-4746	Reverse
SC-BNA	CCCTAGTGGGATGTGTACTTCTGAACTTA	2157-2177	Reverse
Fragment C			
+ 26	TGGGTCAGGGAGTCTCCAT	5282-5300	Forward
+ 28	TGAAGCTGTTAGACATTTTCC	5642-5662	Forward
SC-CNS	CAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACA	4890-4917	Forward
+ 32	ACAAATTATAAACATGTGGCAG	7487-7508	Forward
+ 34	TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG	5957-5986	Forward
+ 36	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG	6817-6845	Forward
+ 38	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6557-6582	Forward
+ 40	CTGTTAAATGGCAGTCTAGC	7002-7021	Forward
- 25	CTCCATTCTATGGAGACTCC	5290-5309	Reverse
- 27	TCCTGCCCCAAGTATCCCC	5709-5726	Reverse
- 29	CCTGCCATAGGAGATGCCTAA	5957-5977	Reverse
- 31	GTACATTGTACTGTGCTGACAT	6946-6967	Reverse
SC-CNA	GCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACC	7786-7808	Reverse
- 35	GGGGTCTGTGGGTACACAGGCATGTGT	6435-6461	Reverse
- 37	TTACAGTAGAAAAATTCCTCTC	7360-7381	Reverse
- 39	CACTTCTCCAATTGTCCCTCA	7648-7668	Reverse

Primer	Nucleotide Sequence (5'-3')	Location*	Orientat ^a
Fragment D			
+ 42	CTGGAAAACTCATCTTGCACCA	8020-8040	Forward
+ 44	CCTCTTCAGC TACCGCC	8516-8532	Forward
+ 46	TTTCCAGTCAGACCTCAGGT	8998-9017	Forward
SC-DNS	ACCAAGGCCAAAGAGAAGAGTGGTG	7719-7742	Forward
- 41	CCACTCCATCCAGGTCATG	8099-8117	Reverse
- 43	TCCCAGAAGTTCCACAATCCT	8562-8582	Reverse
- 45	ATTGGTCTTAAAGGTACCTG	9013-9032	Reverse
SC-DNA	GTACAGGCCAAAAGCAGCTGCTTATATG	9510-9537	Reverse

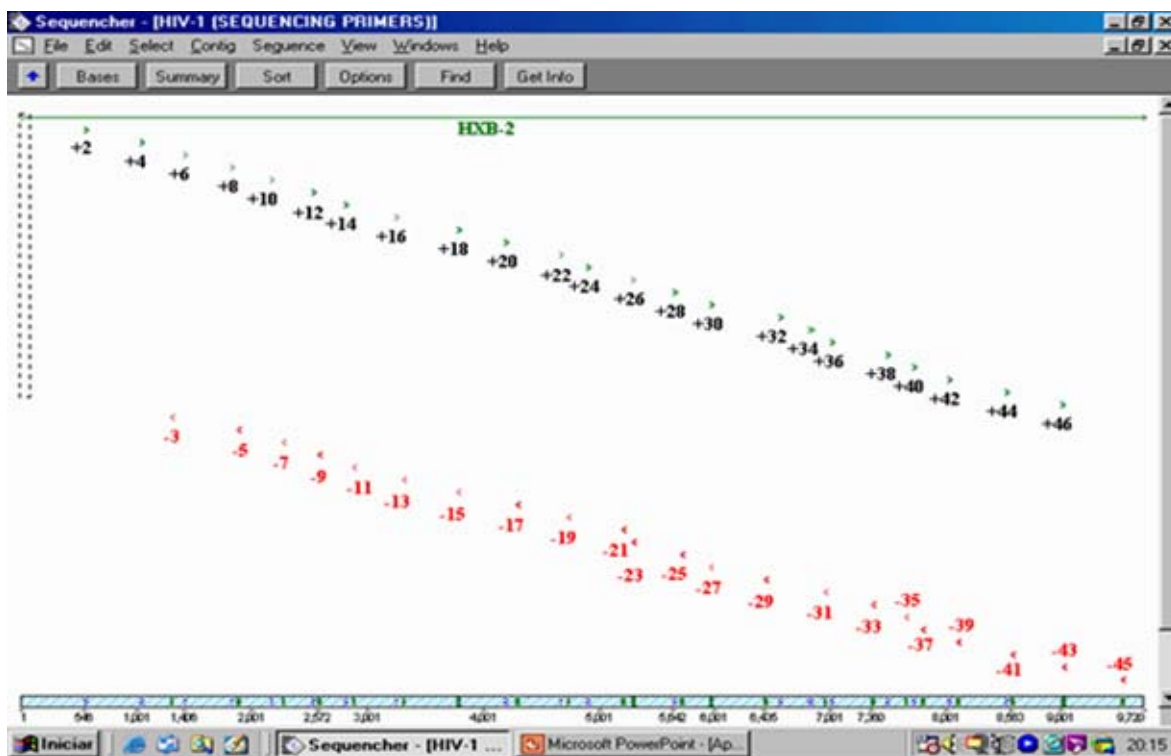


Figura 8: Distribuição dos primers usados para sequenciar as fitas complementares.

5 RESULTADOS

As re-análises dos subtipos de HIV-1 foram determinadas por 22 amostras com genoma completo sequenciado. Não foi observada evidencia de contaminação durante a pesquisa pelo BLAST, que mostrou divergência de 5 a 10% entre cada seqüência em relação aquelas do banco de dados. As ORFs estavam intactas e abertas em todos os isolados; exceto pela assinatura truncada no segundo exon *rev*, característica típica identificada nas cepas do subtipo C devido a um stop codon prematuro na posição 108 (Salminen *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1998; Papathanasopoulos *et al.*, 2002). Todas as amostras foram previamente caracterizadas em nosso laboratório pelo seqüenciamento do genoma parcial das regiões *pol* e/ou *env* que revelaram 6 seqüências segregando com o subtipo B, 8 com subtipo F e 8 com subtipo C, como mostrado na **tabela 4**. A similaridade de plot de genoma completo de todos os isolados revelou que 4 daqueles previamente classificados como subtipo B eram puros e dois eram BF recombinantes. Dos 8 isolados previamente identificados como subtipo F apenas dois isolados eram puros e os outros 6 BF recombinantes. Além disso, todos os isolados que inicialmente foram identificados como subtipos C não apresentaram evidencia de recombinação em todas as análises de seus genomas completos.

As árvores NJ foram construídas de isolados que não apresentaram evidencia de recombinação pela análise de similaridade de plot. A **figura 9** descreve a árvore filogenética de 51 seqüências de HIV-1 incluindo os 14 isolados do atual estudo e 37 cepas referência (Los Alamos database) representando os subtipos A-D, F-H, J e K. A distancia total computada entre estes 14 isolados foi de 4,7 - 16,5%, baseado em 8260 nucleotídeos. Quatro isolados agruparam-se com o grupo de referencia do subtipo B (bootstrap de 100%), mostrando distancias nucleotídicas de 6,8 - 8,1%.

Os isolados 04BR087 e 04BR125 agruparam-se com o grupo de referencia do subtipo F1 em arvores com bootstrap de 100% e distancias de 6,0 - 8,9%. Os últimos oito isolados agruparam-se com cepas do subtipo C, exibindo distancias nucleotídicas de 4,0 - 8,5%.

Tabela 4: Isolados do HIV-1 que foram caracterizados neste estudo através do seqüenciamento de seus genomas completos

Sample Nº	City	Isolation year	Subtype Identification	
			Partial genome	Complete genome
04BR005	São Paulo	2003	B	BF
04BR006	São Paulo	2003	B	BF
04BR008	São Paulo	2003	B	B
04BR011	São Paulo	2003	B	B
04BR013B	São Paulo	2003	B	BF
04BR033	São Paulo	2003	F	BF
04BR034	São Paulo	2003	F	BF
04BR042	São Paulo	2001	F	BF
04BR047	São Paulo	2001	F	BF
04BR087	São Paulo	2001	F	F
04BR125	São Paulo	2001	F	F
04BR226	São Paulo	2001	F	BF
04BR323	São Paulo	2001	F	BF
04BR13C	Rio Grande do Sul	2002	C	C
04BR021	São Paulo	2001	C	C
04BR038	Rio Grande do Sul	2002	C	C
04BR073	Manaus	2001	C	C
04BR122	Rio Grande do Sul	2002	C	C
04BR137	Rio Grande do Sul	2002	C	C
04BR142	Rio Grande do Sul	2002	C	C
04BR267	Rio Grande do Sul	2002	C	C

Os isolados foram então agrupados de acordo com suas referencias e comparados com base em suas distancias genéticas. A variabilidade genética máxima entre os vírus do subtipo B foi 7,9%, entretanto, os subtipos C e F, incluindo as cepas brasileiras de referencia F1, variaram acima de 5,3% e 5,5%, respectivamente. A variação média entre todos os três subtipos foi de 14,9 - 15,5%. Para aumentar o nível de detalhamento a cerca da segregação padrão de nossos isolados e para definir suas relações genéticas com seqüências de referência correspondentes de vários países, outras árvores filogenéticas foram construídas, independentemente para cada subtipo como mostra a **figura 10**.

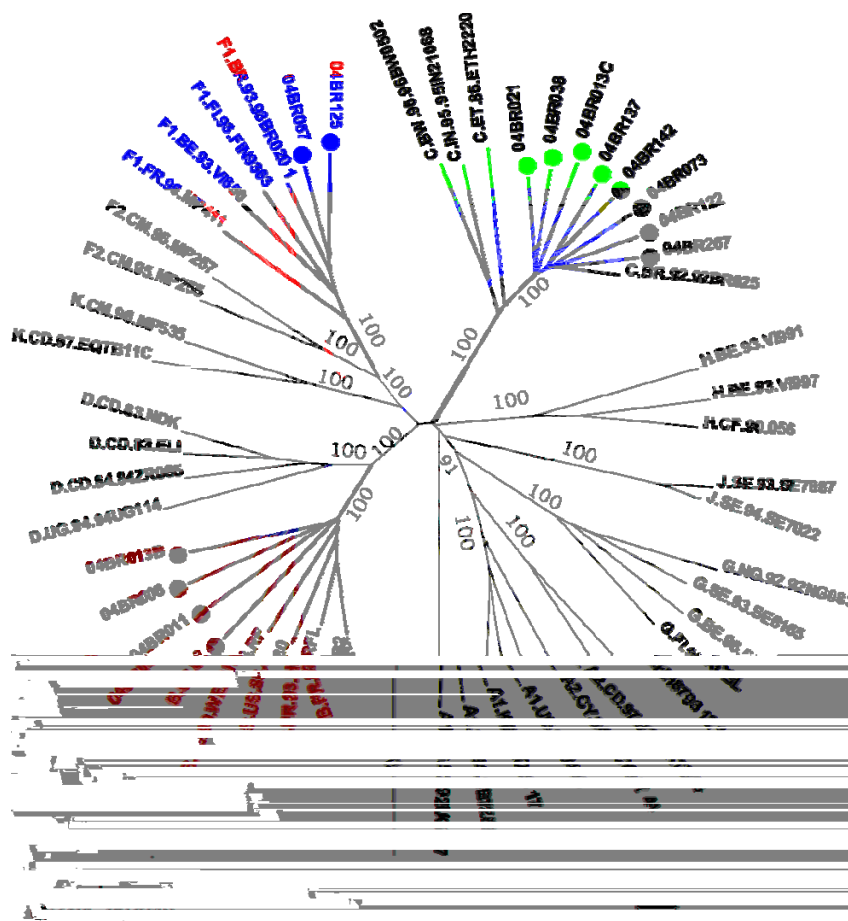


Figura 9: Relacionamento filogenético gerado pelo genoma completo das seqüências de HIV dos 14 isolados brasileiros identificados neste estudo (marcados com círculo). As seqüências nucleotídicas foram comparadas com cepas referencia do subtipo A-D, F-H, J e K (<http://hiv-web.lanl.gov>). A Árvore enraizada foi construída pelo método de neighbor joining, com distancias nucleotídicas calculadas pelo modelo Kimura 2-P e 1000 replicações. O SIV CPZGAB foi usado como grupo de fora para enraizar a árvore. A barra de escala representa 0,01 substituição nucleotídica por sítio.

Isolados do subtipo B e uma seqüência da Argentina formaram um ramo separado suportado por um valor de bootstrap de 59% (**Figura 10-A**). A pequena distancia interisolados (0,0 - 1,3%) entre as seqüências de um mesmo país foi observada nas cepas espanholas, onde todas as seqüências formaram um único ramo suportado por um valor de bootstrap de 100%. Entretanto, as seqüências do subtipo B da Argentina e Colômbia apresentaram uma alta

distancia interisolados com um valor máximo de 10,8%. Além disso, as árvores NJ das seqüências de genoma completo dos subtipos F identificados neste estudo mostraram forte segregação (bootstrap de 100%) com as cepas referencia do subtipo F brasileiro (**Figura 10-B**). As distancias genéticas foram calculadas com base na existência de um pequeno número de seqüências de genoma completo do subtipo F disponíveis no banco de dados. Os resultados mostrados das distancias genéticas médias entre nossos isolados e as cepas da Finlândia, Bélgica e França foram 7,2%, 7,5% e 8,9%, respectivamente. Os isolados do subtipo C, incluindo todas as cepas de referencia brasileiras de subtipo C genoma completo, agruparam-se no mesmo ramo monofilético, como mostra a **figura 10-C**, suportado por um valor de bootstrap de 100%. As distancias nucleotídicas interisolados de nossas cepas de subtipo C foram computadas e comparadas cepas de referencia de subtipo C de outros países. Os resultados mostraram que nossos isolados diferem das cepas de subtipo C da Etiópia, Índia, Tanzânia, Botswana e África do sul com distancias nucleotídicas de 8,8%, 8,4%, 8,6%, 8,9% e 8,5%, respectivamente, indicando que todos são diferentes das cepas de subtipo C globalmente circulantes. A pequena distancia interisolados entre seqüências de um único país (3,9%) foi observada em cepas de subtipo C indianas. Uma alta distancia genética interisolados dentro de um mesmo país foi detectada entre isolados da Etiópia (8,3%) e de Botswana (8,2%).

Para testar a estabilidade da segregação monofilética de nossos isolados de subtipo C e F, árvores NJ foram independentemente construídas usando-se as seqüências de *gag*, *pol* e *env* do HIV-1 das mesmas cepas de referencia como descrito nas figuras 11 (A & C) e 12. A habilidade dos isolados do subtipo C brasileiros para formar um ramo distinto permaneceu inalterada em todas as três regiões e apresentou resultados consistentes com aqueles obtidos através de árvores de genoma completo.

As árvores subgenômicas dos isolados do subtipo F identificados neste estudo revelaram agrupamento, na região *gag*, com as seqüências referencia de subtipos F brasileiros suportado por um valor modesto de bootstrap (65 - 69%),

como mostrado na **figura 12**. Entretanto, as análises das regiões *pol* e *env* revelaram um ramo monofilético, como observado na árvore de genoma completo, altamente suportado por bootstraps de 99% e 100%, respectivamente.

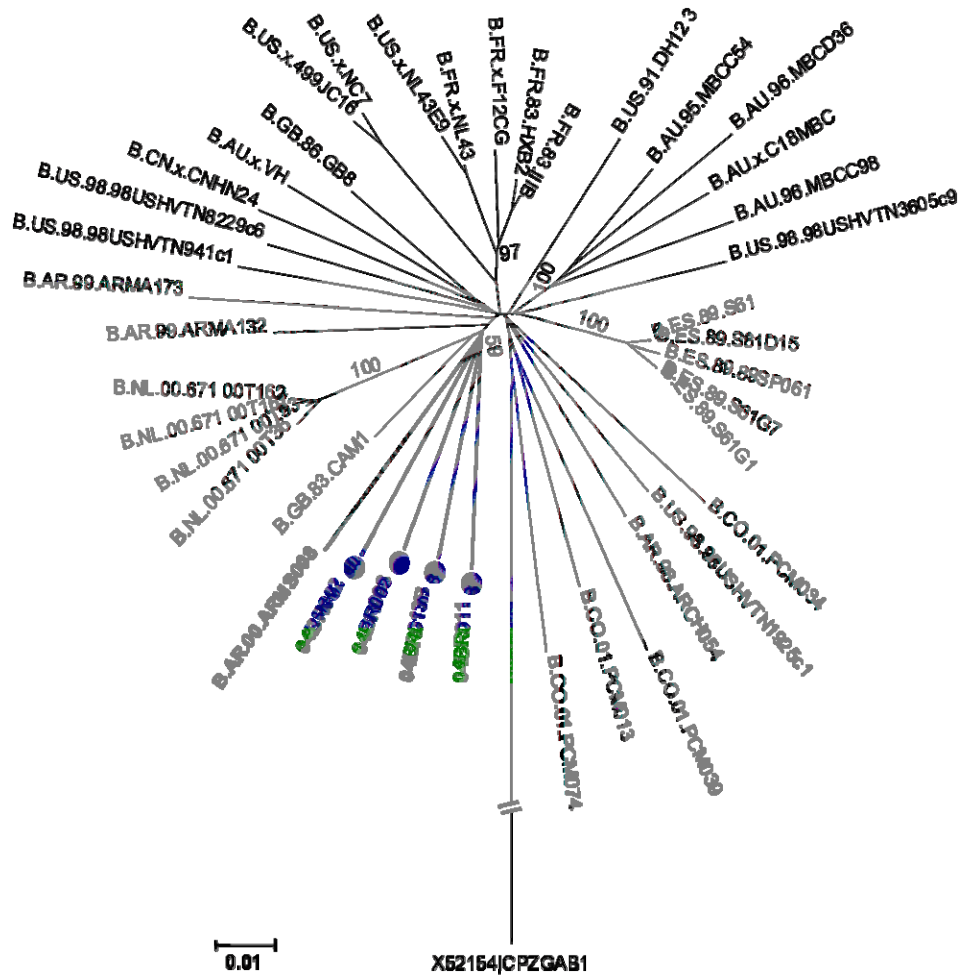
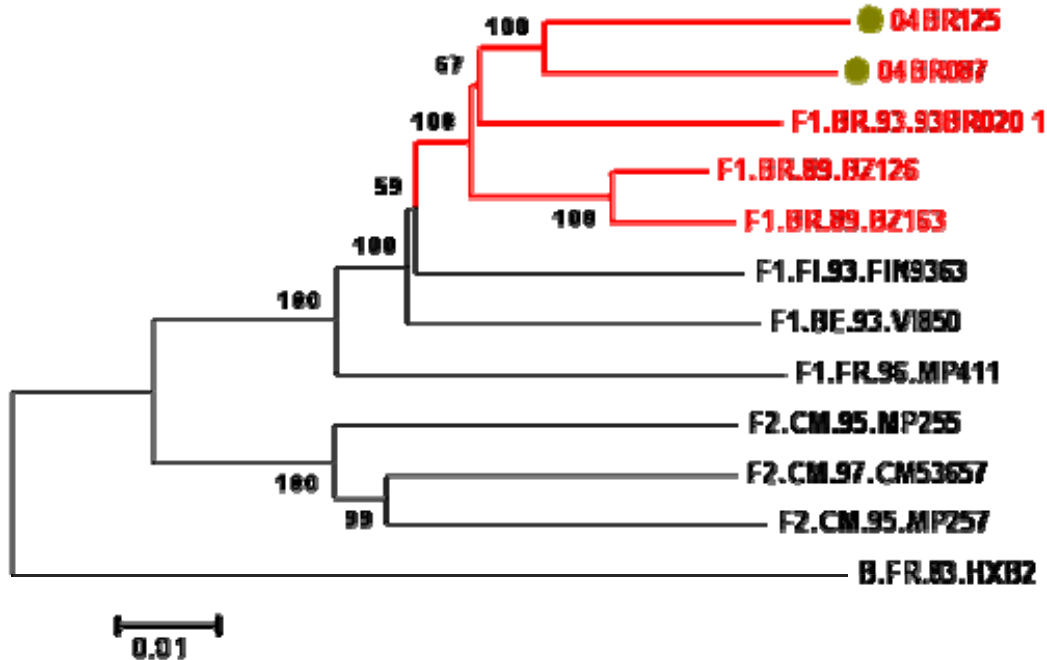


Figura 10(A): Árvore filogenética do HIV-1 subtipo B baseada no genoma completo usando-se o método de neighbor joining. Sequências completas publicadas previamente que representam o subtipo B de vários países, marcados de acordo com suas origens, foram obtidos do banco de dados (<http://hiv-web.lanl.gov>) e usadas para comparar com as 4 seqüências de subtipo B geradas neste estudo (indicado com círculo). Os valores de bootstraps foram aplicados nas árvores usando-se o modelo Kimura 2-P e 1000 replicações de bootstrap. A barra de escala representa 0,01 substituição nucleotídica por sítio.



10(B): Árvore filogenética do HIV-1 subtipo F baseada no genoma completo usando-se o método de neighbor joining. Sequências completas publicadas previamente que representam o subtipo F de vários países, marcados de acordo com suas origens, foram obtidos do banco de dados (<http://hiv-web.lanl.gov>) e usadas para comparar com as 2 sequências de subtipo F geradas neste estudo (indicado com círculo). Os valores de bootstraps foram aplicados nas árvores usando-se o modelo Kimura 2-P e 1000 replicações de bootstrap. A cepa HXB2 de HIV-1 foi usada como grupo de fora. A barra de escala representa 0,01 substituição nucleotídica por sítio.

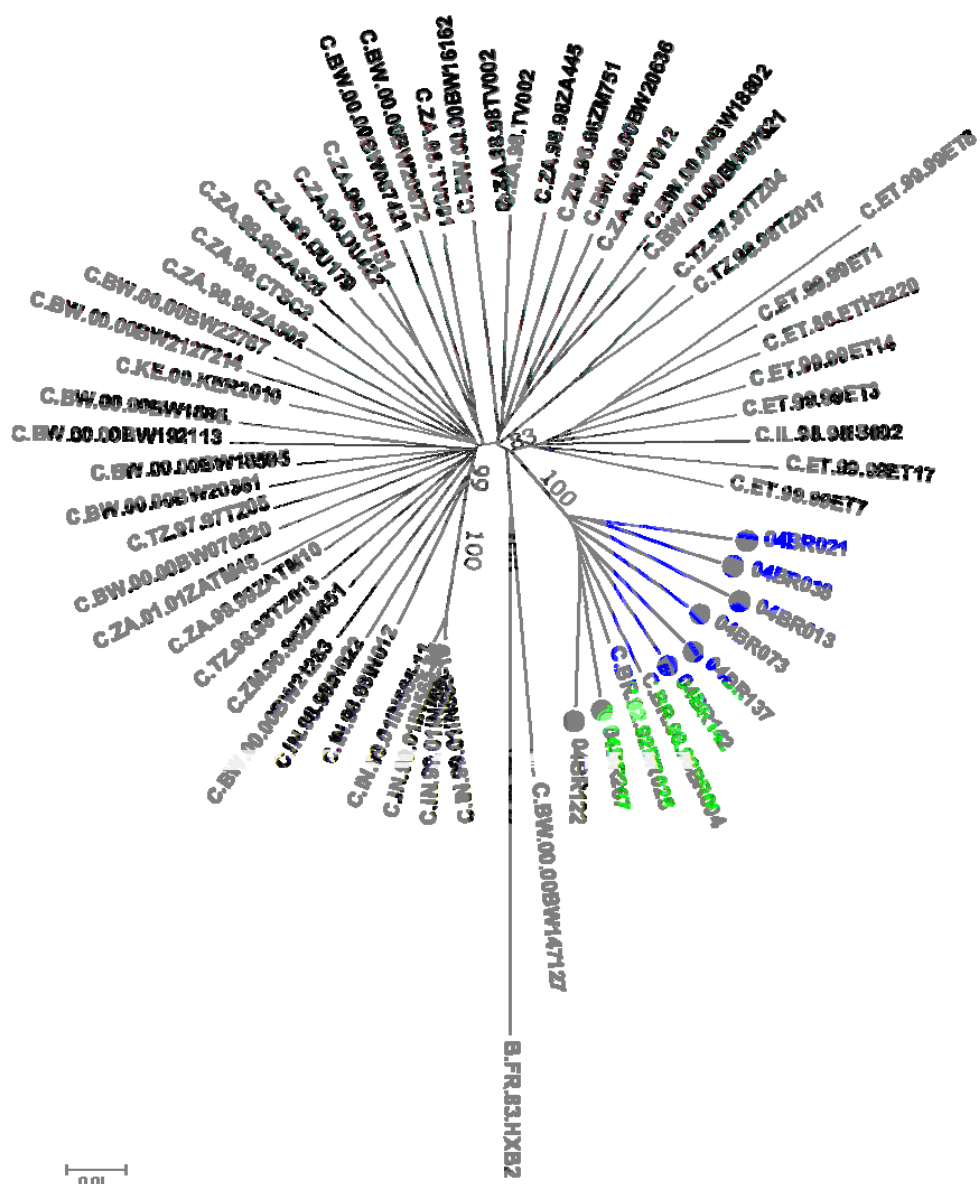


Figura 10(C): Árvore filogenética do HIV-1 subtipo C baseada no genoma completo usando-se o método de neighbor joining. Sequências completas publicadas previamente que representam o subtipo C de vários países, marcados de acordo com suas origens, foram obtidos do banco de dados (<http://hiv-web.lanl.gov>) e usadas para comparar com as 8 sequências de subtipo C geradas neste estudo (indicado com círculo). Os valores de bootstraps foram aplicados nas árvores usando-se o modelo Kimura 2-P (e 1000 replicações de bootstrap). O SIV CPZGAB foi usado como grupo de fora para enraizar a árvore. A barra de escala representa 0,01 substituição nucleotídica por sítio.

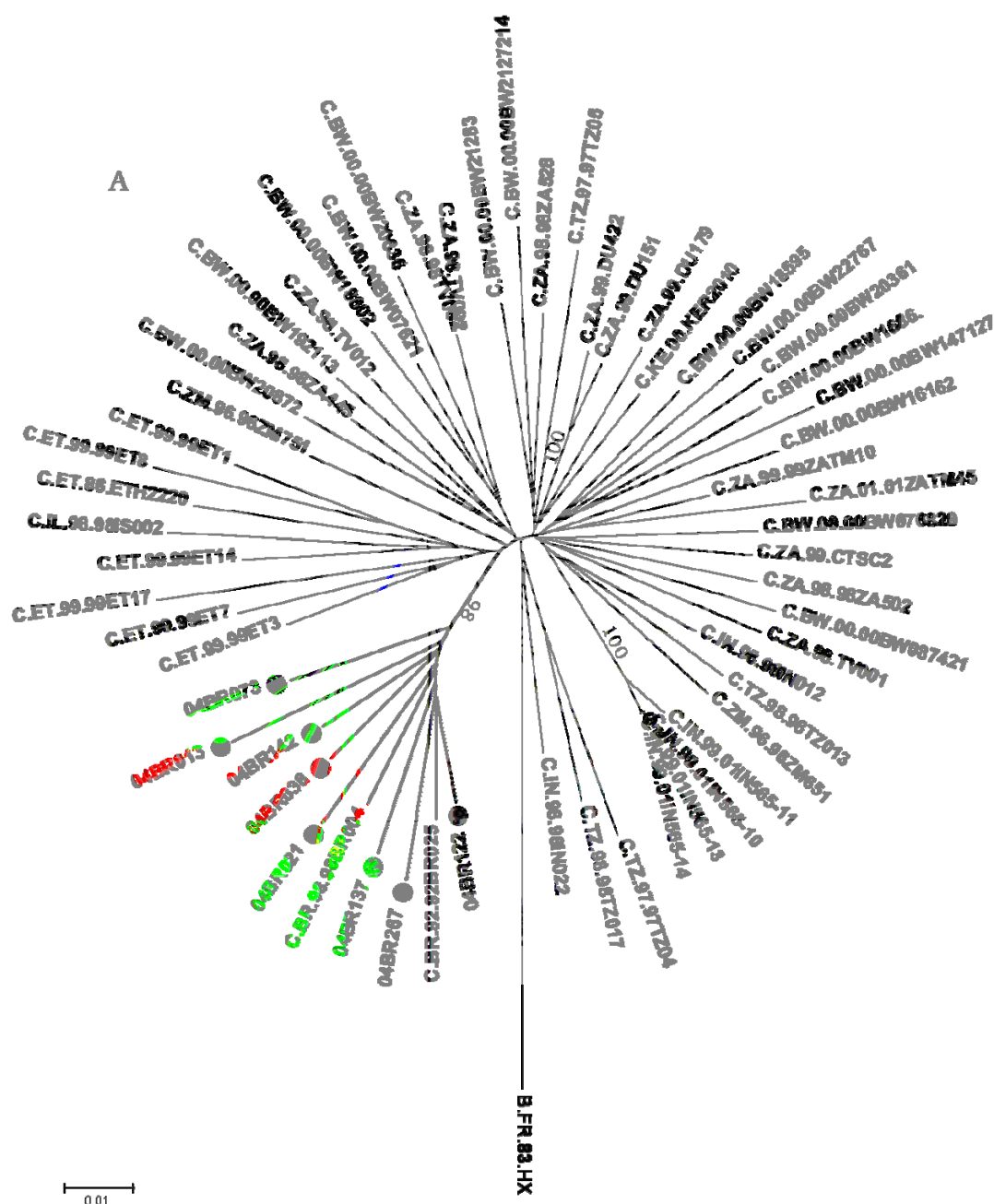


Figura 11 (A): Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de *gag* do subtipo C. NJ e Kimura 2-P foram usados para computar a matriz de distancia. Os valores nos ramos indicam as porcentagens de bootstrap com 1000 replicações (apenas bootstraps maiores ou iguais a 70% são mostrados). As árvores foram enraizadas usando-se a cepa HXB2 de HIV-1. Os 8 isolados brasileiros são indicados pelo círculo azul. O tamanho dos ramos estão descritos na escala.

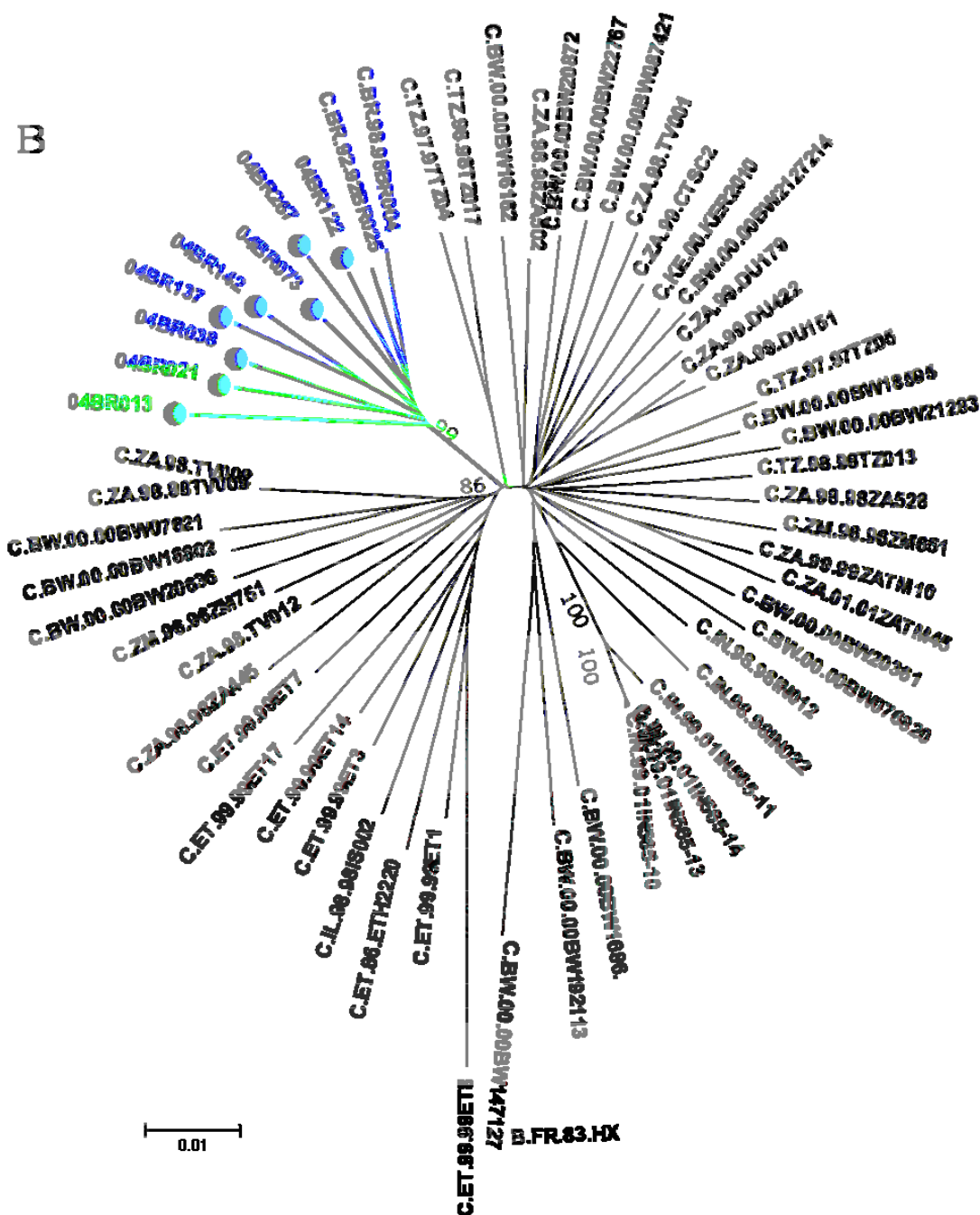


Figura 11 (B): Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de *pol* do subtipo C. NJ e Kimura 2-P foram usados para computar a matriz de distancia. Os valores nos ramos indicam as porcentagens de bootstrap com 1000 replicações (apenas bootstraps maiores ou iguais a 70% são mostrados). As árvores foram enraizadas usando-se a cepa HXB2 de HIV-1. Os 8 isolados brasileiros são indicados pelo circulo azul. O tamanho dos ramos estão descritos na escala.

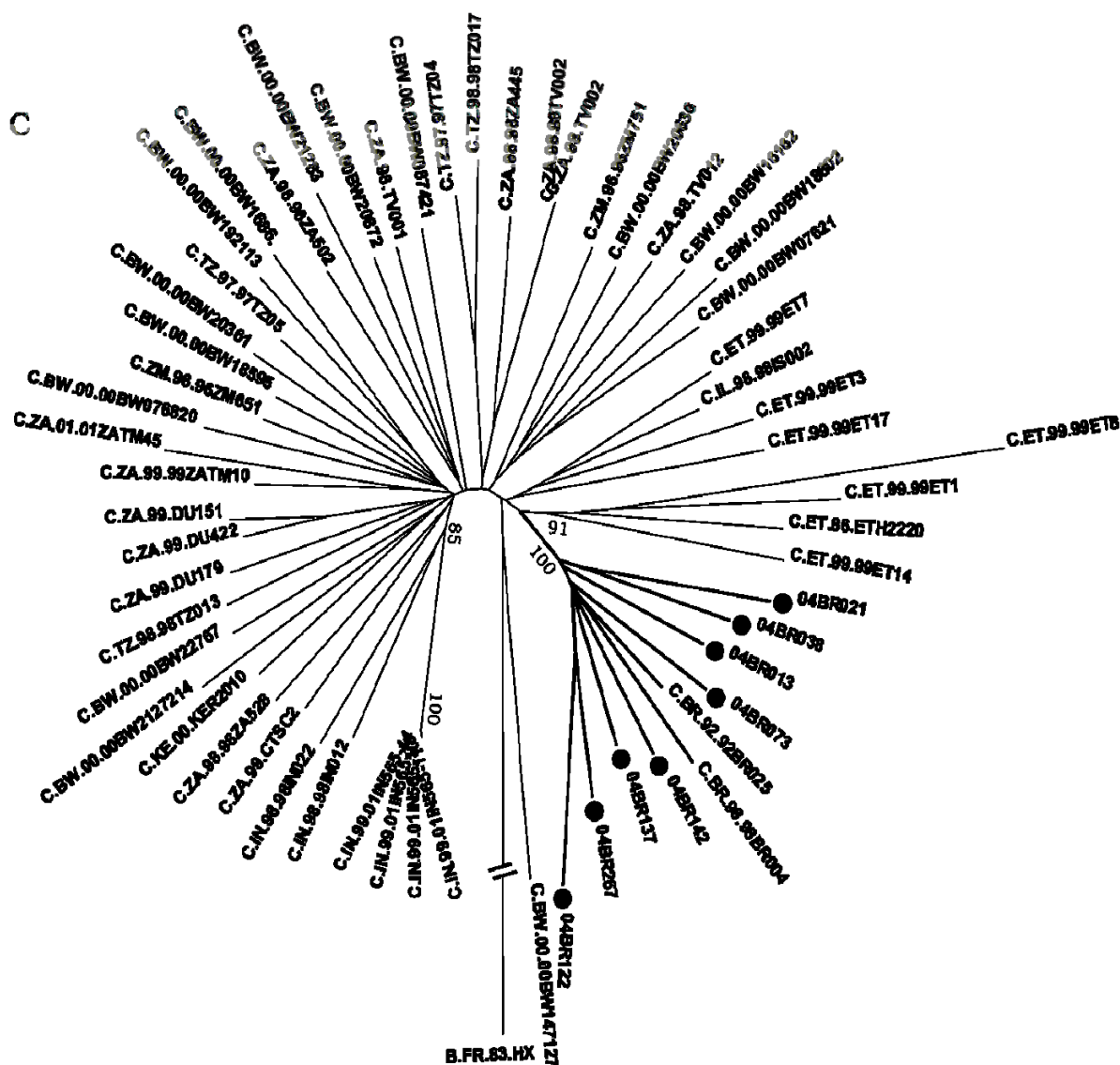


Figura 11 (C): Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de *env* do subtipo C. NJ e Kimura 2-P foram usados para computar a matriz de distancia. Os valores nos ramos indicam as porcentagens de bootstrap com 1000 replicações (apenas bootstraps maiores ou iguais a 70% são mostrados). As árvores foram enraizadas usando-se a cepa HXB2 de HIV-1. Os 8 isolados brasileiros são indicados pelo círculo azul. O tamanho dos ramos estão descritos na escala.

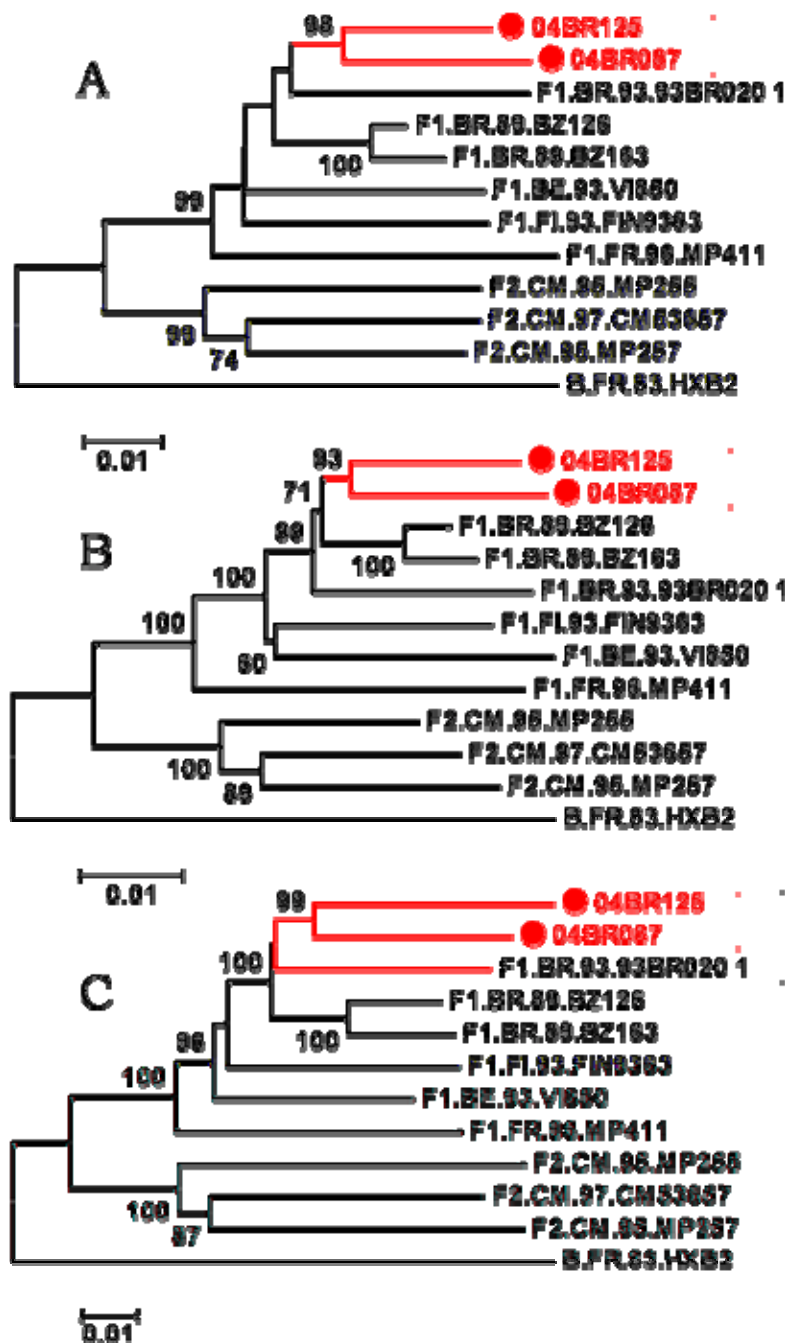


Figura 12: Parentesco filogenético da estrutura de leitura completa de *gag* (**A**), *pol* (**B**) e *env* (**C**) de subtipo F. NJ e Kimura 2-P foram usados para computar a matriz de distancia. Os valores nos ramos indicam as porcentagens de bootstrap com 1000 replicações (apenas bootstraps maiores ou iguais a 65% são mostrados). As árvores foram enraizadas usando-se a cepa HXB2 de HIV-1. Os 8 isolados brasileiros são indicados pelo circulo azul. O tamanho dos ramos estão descritos na escala.

Os dados da análise por similaridade de plot sugeriram que oito isolados previamente caracterizados como subtipos B e F possuíam produtos de eventos evolucionários de recombinação entre os subtipos B e F (**Figura 13**). Os isolados 04BR033, 04BR042, 04BR047 e 04BR226 exibiram tamanhos iguais de fragmentos alternados de B e F em seus genomas. Para confirmar estes resultados, os isolados foram posteriormente submetidos à análise por decomposição dividida (split decomposition), baseada no alinhamento de seus genomas completos (**Figura 14-A**). A arquitetura da rede mostrou no gráfico dividido (split graph) eventos de recombinação que se alternam entre subtipo B e F, consistente com os resultados apresentados pela análise de similaridade de plot. A porcentagem das distâncias (fit index), demonstrada pelo gráfico, foi de 98,8% indicando a veracidade do dado. Duas outras árvores divididas (split trees) independentes foram construídas para os isolados 04BR005 e 04BR006 usando-se as regiões superiores (upstream) e inferiores (downstream) das extremidades 5' das seqüências dos breakpoints como definido pelo SIMPLOT. Novamente, os resultados dos dois isolados providenciaram forte evidencia para evolução da rede entre os subtipos B e F, suportados por um alto valor de bootstrap (**Figura 14 B & C**). Os fit index do gráfico computado foram de 97,9% e 97,4% para os isolados 04BR005 e 04BR006, respectivamente.

Nós então nos dedicamos a explorar inteiramente as estruturas em mosaico para identificar de maneira acurada as posições de sítios cruzados pelo escaneamento de todas as seqüências contra um painel de cepas referencia de subtipos conhecidos usando-se análise de bootscan (**Figura 15**) e maximização de x^2 entre os sítios informativos (Robertson *et al* 1995).

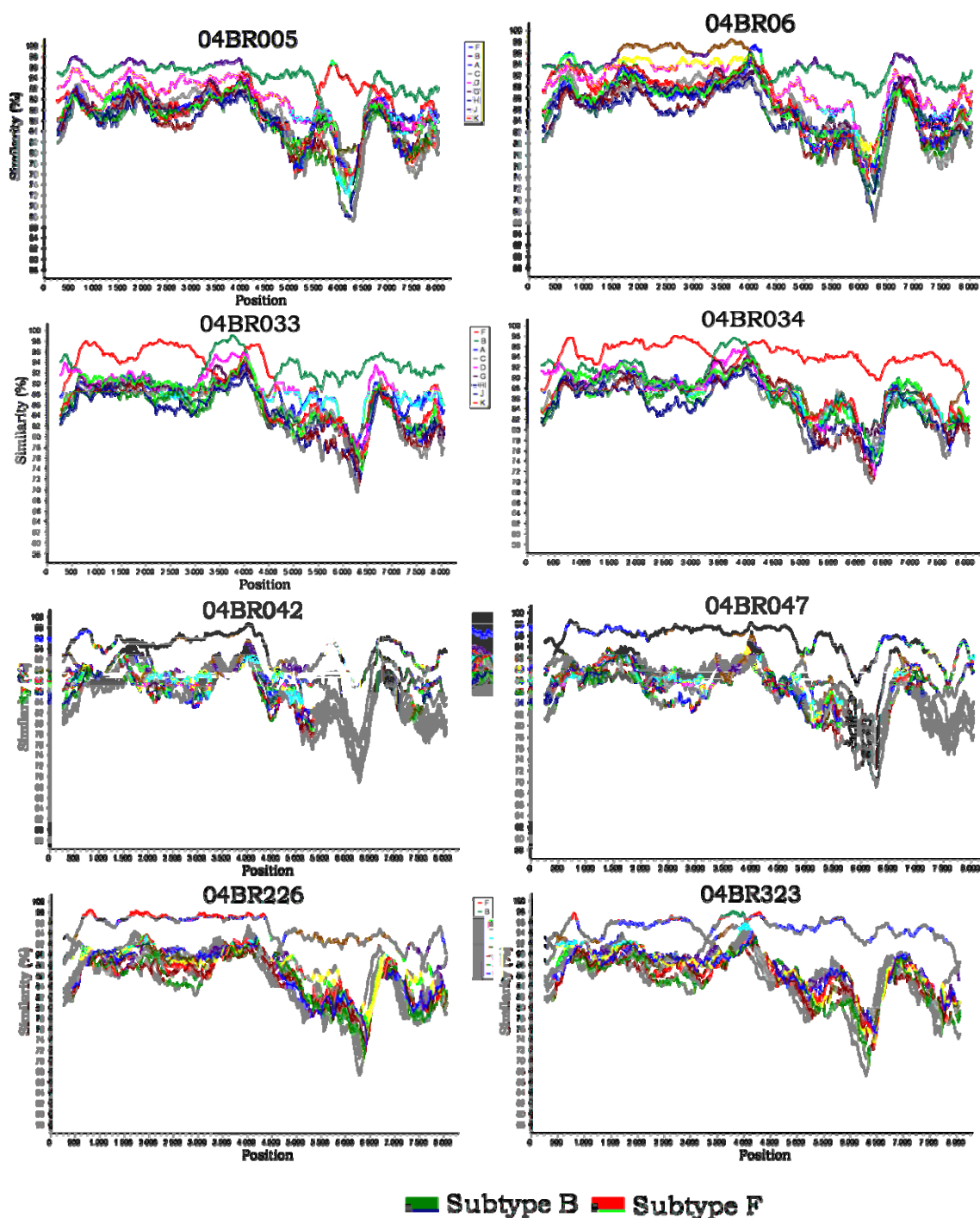


Figura 13: Análise de similaridade de plot dos genomas completos dos 8 vírus BF recombinantes comparados com seqüências referencia dos subtipos de HIV-1 do banco de dados. As distancias foram computadas após remoção dos gaps usando-se o modelo de substituição ML. Foi usada uma janela deslizante de 500pb movendo-se em etapas de 20 nt com 100 replicações dos dados.

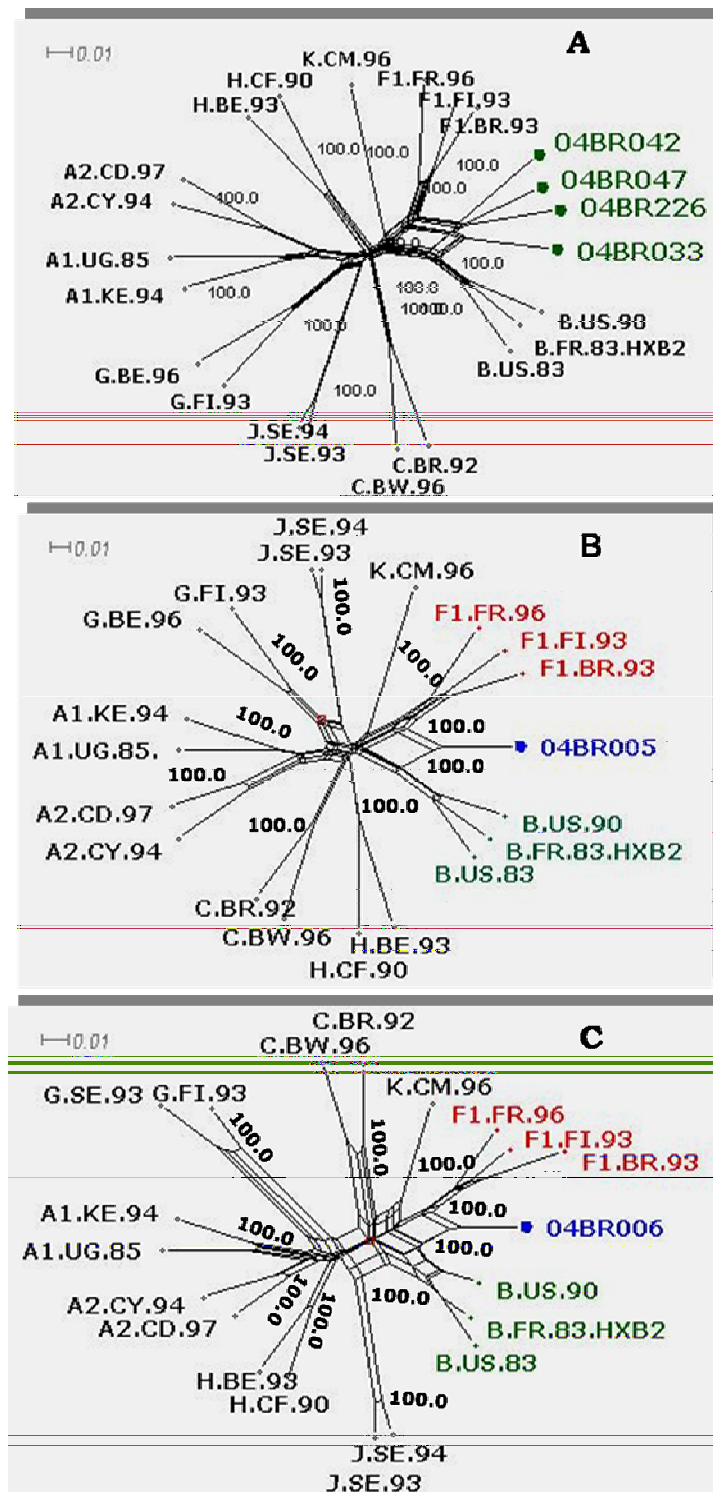


Figura 14: A análise da decomposição dividida (split decomposition). (A) Rede construída a partir dos genomas completos. (B & C) Árvores construídas a partir das regiões compreendendo a posição 5' terminal dos pontos de quebra putativos. Os valores de bootstrap maiores que 60% foram dados em cada nó. O tamanho dos ramos estão descritos na escala.

Estas análises mostraram que dois isolados, 04BR005 e 04BR006, eram subtipo B na maior parte de seus genomas. O isolado 04BR005 possui um pequeno fragmento do subtipo F na extremidade 3' da gp120 e início da extremidade 5' da gp41 ao passo que 04BR006 mostrou pequeno alongamento (321nt) do subtipo B na extremidade 5' da proteína p24 de *gag* (**Figuras 15 e 16**). Os isolados 04BR033, 04BR047, 04BR226, 04BR034 e 04BR323 compartilharam um sítio comum de cruzamento localizado entre as posições 430 - 528nt downstream do codon de iniciação ATG de *gag*, correspondente a extremidade N terminal da proteína p24 de *gag*. Os mesmos isolados, exceto 04BR033, compartilharam outros pontos cruzados ao redor das posições 275 - 335nt relativas ao codon de iniciação de *nef*. Além disso, as cepas 04BR047 e 04BR226 apresentaram homologias substanciais em seus padrões de mosaico e compartilharam quatro pontos cruzados em posições aproximadamente idênticas como mostrado na **figura 15 F & G**. A análise filogenética dos fragmentos individuais entre os pontos de quebra (breakpoints) mostrou forte associação destes isolados em relação aos subtipos relevantes de referencia, mas ambos não apresentaram segregação (**Figura 17**). Outra surpreendente similaridade de recombinação foi observada entre os isolados 04BR034 e 04BR323, que exibiram 3 de 4 breakpoints em posições idênticas (**Figura 15 D & H**). Como descrito na figura, os dois isolados foram, na maior parte de seus genomas, do subtipo F com três alongamentos dispersos de subtipo B. Para confirmar este fato, geramos árvores filogenéticas usando-se as regiões de seqüências definidas pelos sítios cruzados putativos (**Figura 18**). A análise exploratória das árvores mostrou forte segregação de ambas as cepas com os subtipos correspondentes tendo um suporte estatístico superior a 85% em todos os fragmentos. Além disso, as análises também identificaram os dois isolados como seqüências parentais suportados por valores de bootstrap de 99 -100% na maioria das regiões. As duas cepas agruparam-se em um ramo suportadas por um valor estatístico de 75% e 77% no primeiro e terceiro fragmento, respectivamente (**Figura 18**). Baseado nestes resultados de bootscan e análises

filogenéticas exploratórias, nós concluimos que estas cepas (04BR034 e 04BR323) são descendentes de um único vírus quimérico e talvez represente um novo CRF. As regiões recombinantes putativas detectadas em outros isolados foram também investigadas pela filogenia de Neighbor joining que gerou os mesmos resultados apresentados pelos métodos de split decomposition e bootscan. Uma comparação de todas as regiões de pontos de quebra na estrutura genômica dos isolados recombinantes identificados neste estudo foram resumidos na **Tabela 5**. Nós objetivamos confirmar os pontos de quebra identificados em todo o genoma recombinante putativo usando-se análise de sítios informativos. Os resultados desta análise foram perfeitamente concordantes com aqueles obtidos a partir do bootscaneamento e árvores exploratórias e provaram ser altamente significativos em cada região ($p < 0,005$). A diversidade genética entre os recombinantes e seus parentes foram computadas e geralmente mostraram distancias relativamente baixas na maioria dos fragmentos caracterizados como subtipo F em comparação com aqueles identificados como subtipo B (**Tabela 5**). Além disso, os isolados que mostraram estrutura genética idêntica também compartilharam similaridade significativa na maioria das regiões, indicando que eles são descendentes de um único ancestral recombinante comum.

As categorias recombinantes de todos os isolados identificados neste estudo foram comparadas com todas as seqüências BF publicadas incluindo CRF 12_BF, na tentativa de encontrar estrutura genética similar. A análise não definiu nenhuma similaridade em comum aos nossos isolados recombinantes.

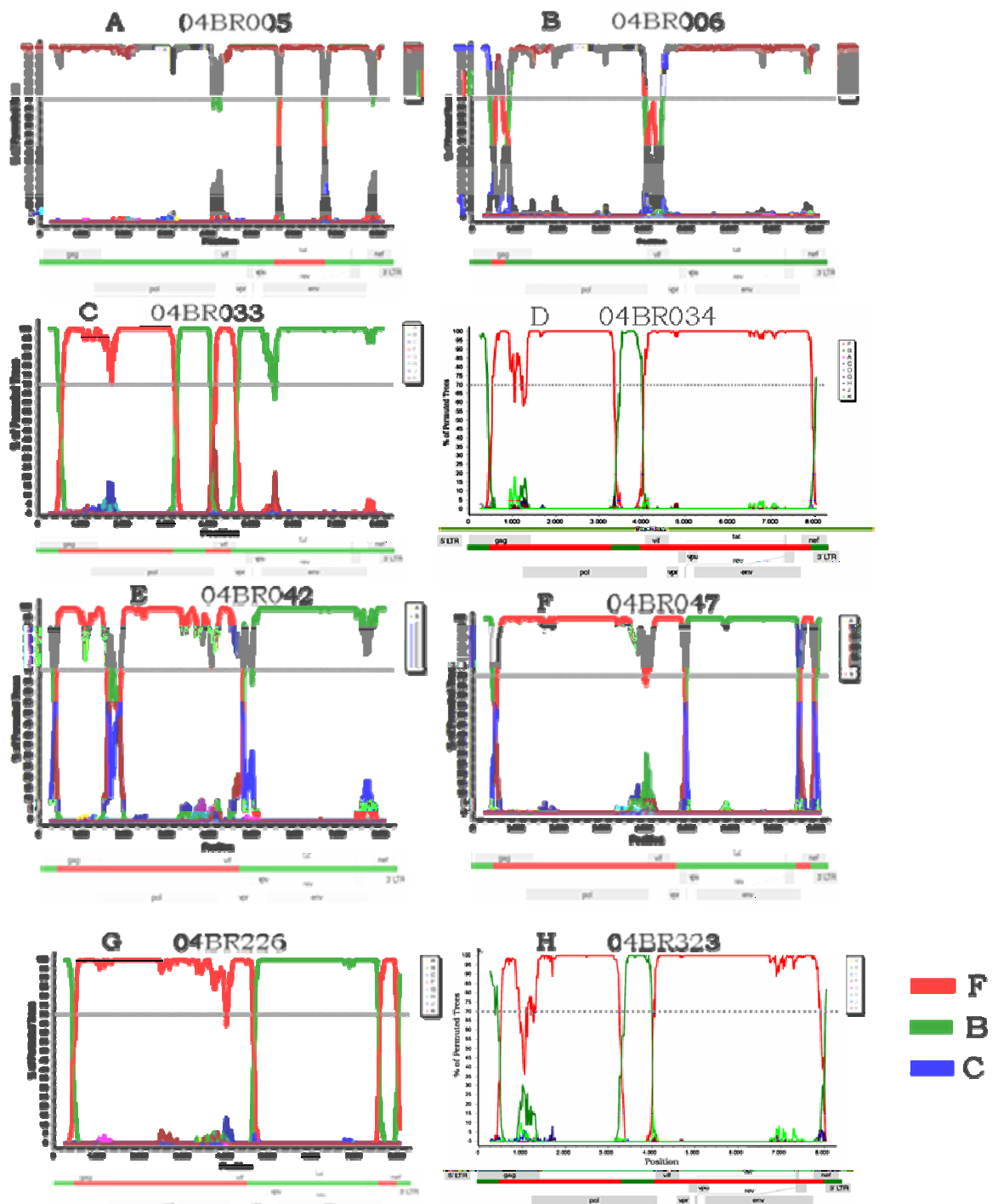


Figura 15: Análise de bootscan dos genomas completos dos 8 vírus BF recombinantes comparados com seqüências referencia dos subtipos de HIV-1 do banco de dados. As distancias foram computadas após remoção dos gaps usando-se o modelo de substituição ML. Foi usada uma janela deslizante de 500pb movendo-se em etapas de 20 nt com 100 replicações dos dados

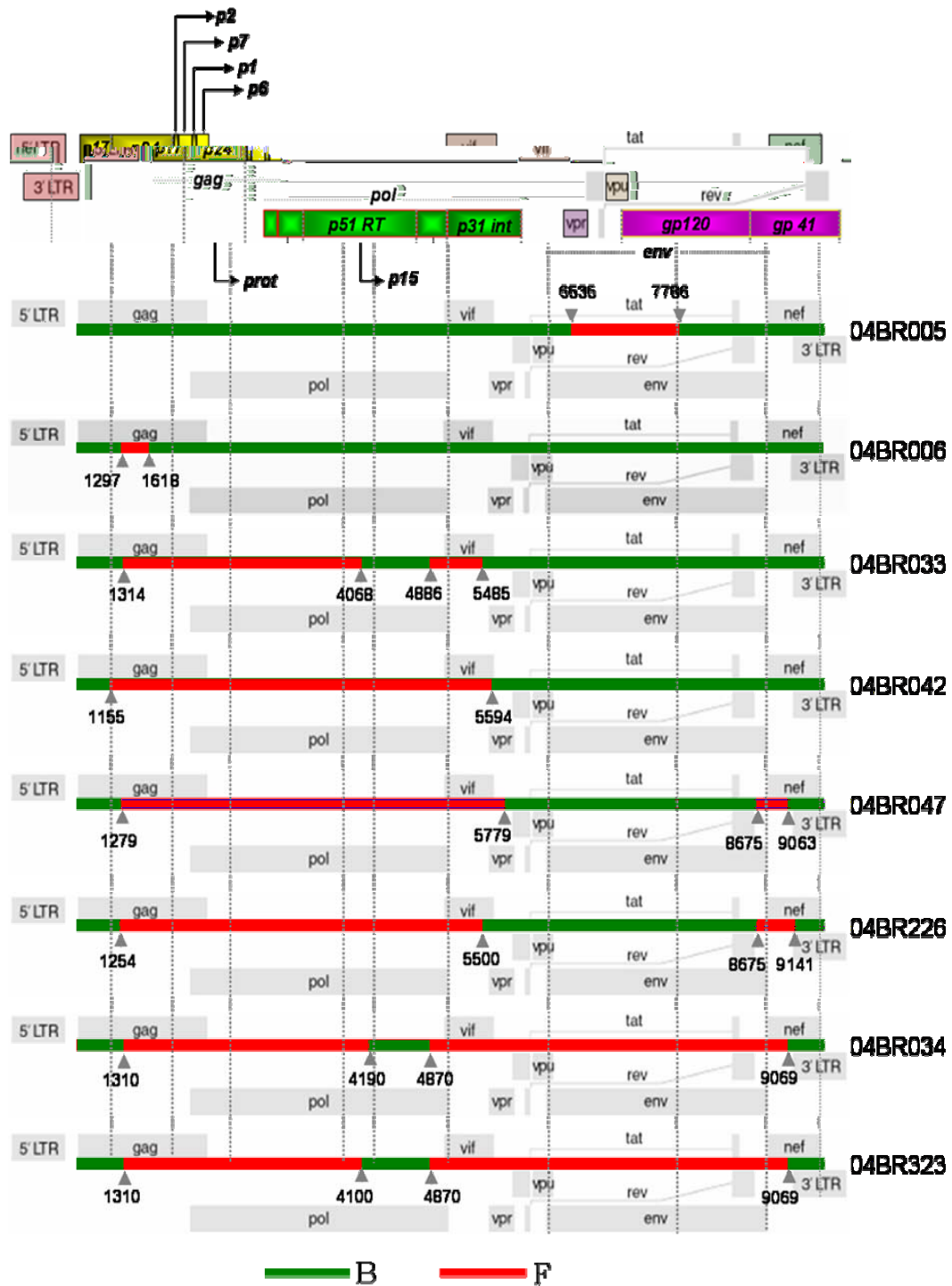


Figura 16: Representação esquemática da estrutura genética completa e pontos de quebra dos 8 isolados BF recombinantes. As legendas das posições dos subtipos B e F são mostradas abaixo da figura. As posições dos pontos de quebra são marcadas com as setas de cor cinza e numeradas de acordo com as seqüências de HXB2.

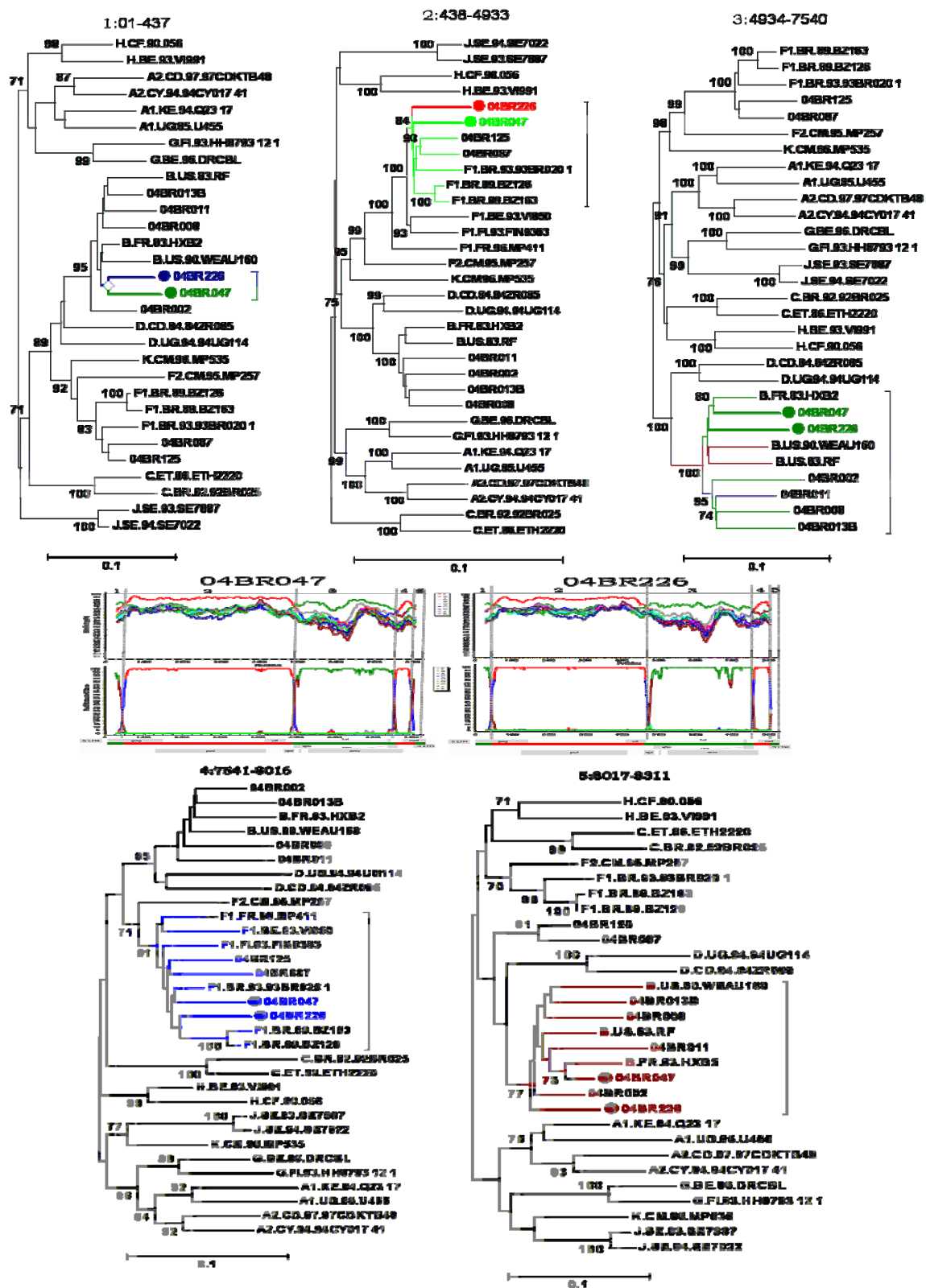


Figura 17: Análise da árvore exploratória dos isolados 04BR047 e 04BR226. Árvore NJ foi construída a partir das regiões indicadas pelo bootscan. Os valores de bootstrap foram aplicados a cada nó respectivo. A cepa SIV CPZGAP foi usada para enraizar a árvore. A barra de escala representa 0,10 substituição nucleotídica por sítio.

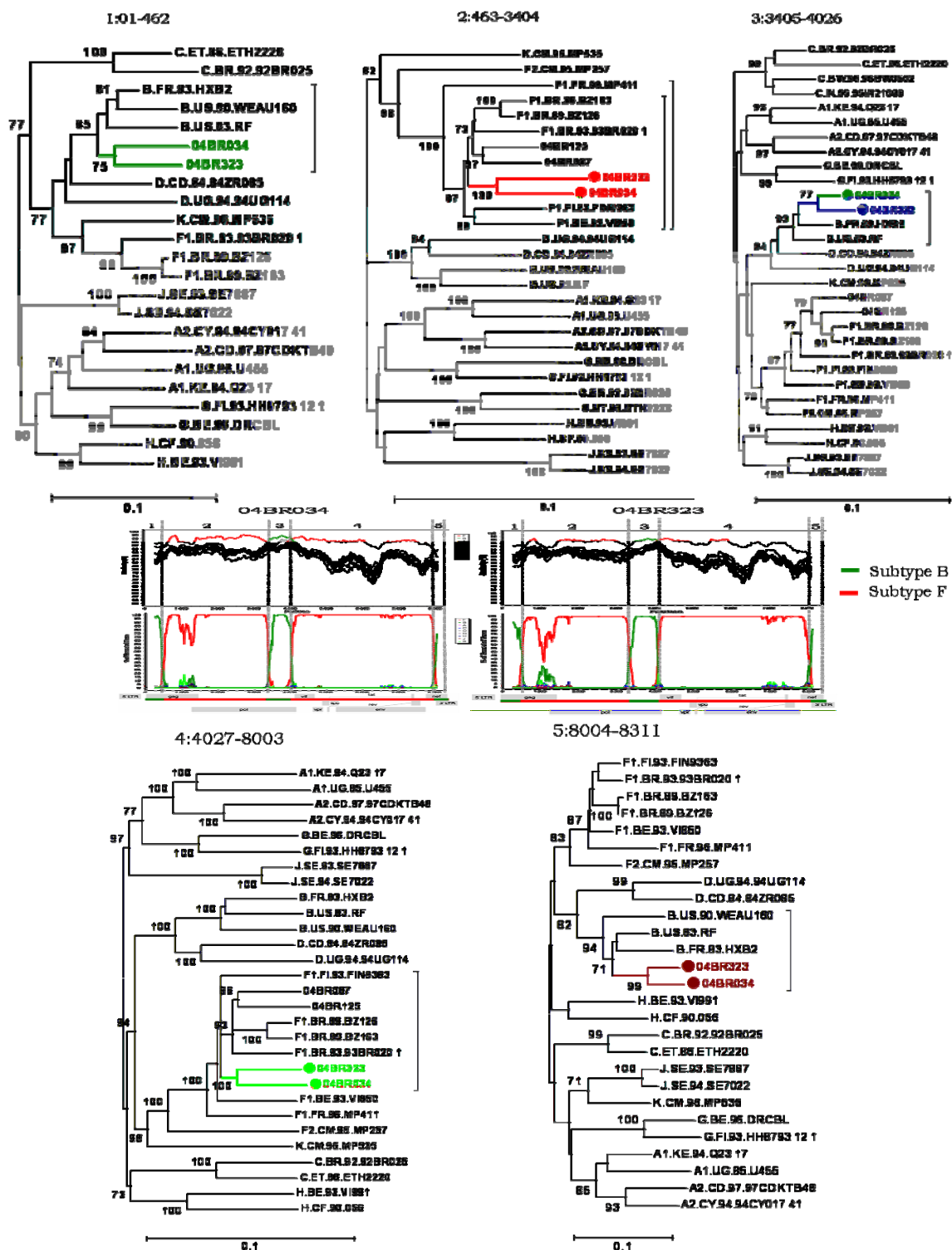


Figura 18: Análise da árvore exploratória dos isolados 04BR034 e 04BR323. Árvore NJ foi construída a partir das regiões indicadas pelo bootscan. Os valores de bootstrap foram aplicados a cada nó respectivo. A cepa SIV CPZGAP foi usada para enraizar a árvore. A barra de escala representa 0,10 substituição nucleotídica por sítio.

Tabela 5: Resultados das Análises dos pontos de quebra das 8 seqüências putativas.

	Region relative to HXB2 ^a	Nucleotide length	Subtype	Genetic difference (%) ^b	<i>P</i> value ^c
04BR005	788-6535	5520	B	5.1-6.5	△0.005
	6536-7786	1078	F1	6.6-12.3	△0.005
	7788-9458	1529	B	9.5-11.6	△0.005
04BR006	788-1297	474	B	7.1-10.8	△0.005
	1298-1618	321	F1	3.8-5.9	△0.005
	1619-9458	7271	B	7.3-9.0	△0.005
04BR033	788-1313	491	B	6.0-10	△0.005
	1314-4068	2716	F1	4.0-7.2	△0.005
	4069-4886	811	B	3.5-5.3	△0.005
	4887-5485	598	F1	4.7-8.0	△0.005
	5486-9458	3486	B	8.3-12.2	△0.005
04BR034	788-1310	488	B	7.8-10.4	△0.005
	1311-4190	2797	F1	4.5-08.0	△0.005
	4191-4870	680	B	4.1-06.0	△0.005
	4871-9069	3740	F1	7.4-9.1	△0.005
	9070-9458	333	B	10.7-13.5	△0.005
04BR042	788-1155	332	B	06.0-08.7	△0.005
	1156-5594	4357	F1	5.6-8.2	△0.005
	5595-9458	3348	B	9.4-11.6	△0.005
04BR047	788-1279	457	B	5.5-10.4	△0.005
	1280-5779	4413	F1	3.7-6.7	△0.005
	5780-8675	2485	B	7.6-12.8	△0.005
	8676-9063	319	F1	5.6-11.3	△0.005
	9064-9458	338	B	5.9-9.9	△0.005
04BR226	788-1254	432	B	6.3-10.0	△0.005
	1255-5500	4160	F1	3.8-6.5	△0.005
	5501-8675	2764	B	8.6-12.4	△0.005
	8676-9141	393	F1	6.2-11.5	△0.005
	9142-9458	261	B	8.6-13.5	△0.005
04BR323	788-1310	488	B	7.6-11.2	△0.005
	1311-4100	2707	F1	5.3-8.0	△0.005
	4101-4870	770	B	4.0-6.0	△0.005
	4871-9069	3740	F1	6.6-8.6	△0.005
	9070-9458	334	B	09-13.5	△0.005

- a- Posições nucleotídicas referentes a cepa HXB2.
- b- As distancias genéticas das seqüências entre os pontos de quebra foram computados pelo Kimura-2P.
- c- O valor de *P* do sitio entre os pontos de quebra foram calculados usando-se o teste exato de Fisher.

As características dos aminoácidos, suas seqüências de sítios e domínios funcionais importantes conservados, foram estudadas ao longo do genoma completo de nossos isolados. Seqüências nucleotídicas de cada gene foram traduzidas em aminoácidos e comparadas com seqüências correspondentes de consensos de aminoácidos do grupo M e HXB2. A maioria das seqüências de aminoácidos da região *gag* NLS (Nuclear Localization Signal), crítica para o estabelecimento da infecção por HIV nas células T quiescentes e macrófagos, foram altamente conservadas em nossos isolados (**Figura 19**). Nenhuma diferença foi detectada em regiões de maior homologia, exceto para o vírus encontrado no paciente 04BR021, onde a treonina foi substituída por cistina. As seqüências foram altamente conservadas nos dois zinc finger motifs que flanqueiam os domínios básicos no nucleocapsídeo /p7 da proteína *gag*, indicando a formação perfeita das partículas virais maduras. Tanto domínio L (PTAPP) localizado próximo ao N terminal de p6, como o outro (LXXLF) localizado próximo ao C terminal, conhecido por desempenhar um papel vital na saída do vírus (Skinner *et al.*, 1988), estavam absolutamente conservados.

Os resíduos da protease que são importantes para os mecanismos catalíticos, formação de dímeros e ligação ao substrato estavam todos conservados (**Figura 20**). Os polimorfismos de aminoácidos no gene da protease (M36I, R41K e H69K) (Velazquez-Campoy *et al.*, 2001) que são sempre encontrados nas cepas de HIV subtipo C foram detectadas nos vírus de subtipo C de nossa amostragem, exceto o polimorfismo na posição 41 que recentemente tem sido relatado como K41N, característica específica do subtipo C brasileiro, em associação ao K37N (Soares *et al.*, 2003). Os resíduos de aminoácidos que constituem os sítios de clivagem da protease tanto na região da protease como na RT estavam altamente conservados. O motivo YMDD, crítico para a atividade catalítica da RT (Gottlinger 1991), estava presente e bem conservado em todas as seqüências bem como no motivo HHCC da integrase (zinc finger like motif).

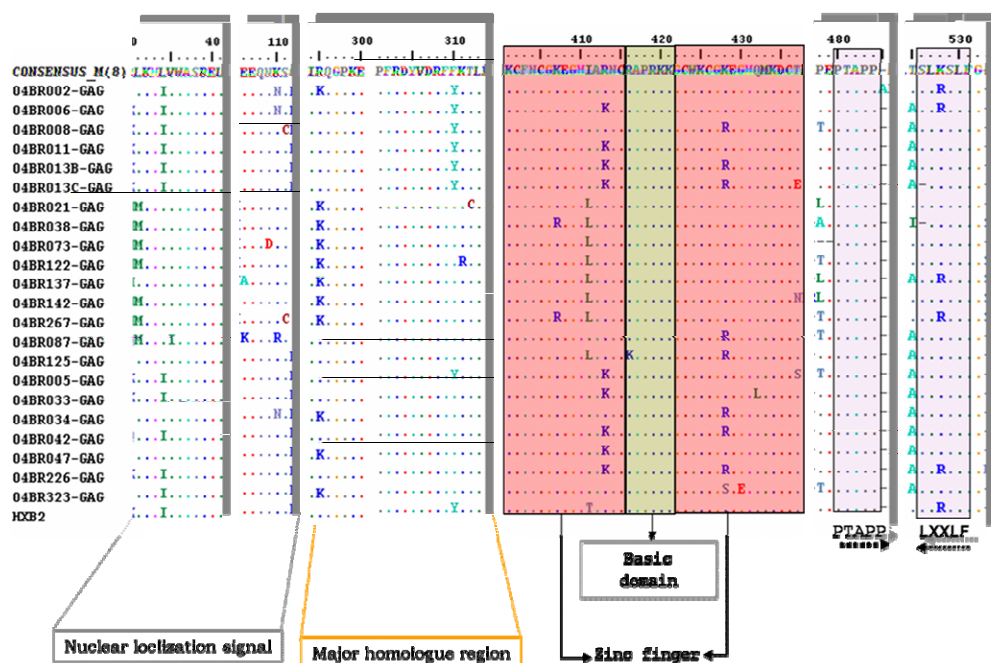
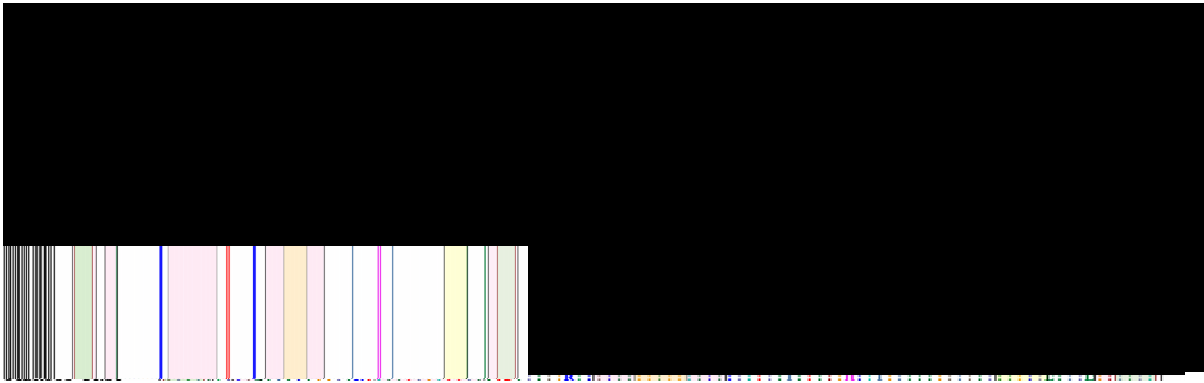


Figura 19: Alinhamento dos domínios funcionais importantes na proteína *gag* dos nossos isolados comparados com as seqüências correspondentes do consenso de aminoácidos do grupo M e cepa referencia HXB2. Os pontos indicam seqüências consenso idênticas ao grupo M, porem, os traços denotam lacunas que foram introduzidas para otimizar o alinhamento.

Características comuns em todas as proteínas *vif*, incluindo a de nossos isolados, estavam altamente conservadas, como o motivo SLQYLA encontrado na posição 144 - 149 na região *vif* do HIV. As seqüências de aminoácidos PPLPS e KLTEDRWN no domínio C terminal, descritas por estarem associadas a membrana plasmática e precursores de *gag* (Goncalves *et al.*, 1995; Bouyac *et al.*, 1997) estavam bem conservadas em nossos isolados (**Figura 21**). Os resíduos de aminoácidos que constituem os motivos funcionais envolvidos na modificação, sinalização, internalização e transporte de *nef* estavam altamente conservados.



As seqüências nucleotídicas da região U3-LTR de todos os isolados foram investigados para presença de importantes elementos localizados na porção superior do promotor do core. Três potenciais sítios de ligação de NF- κ B foram detectados em todos os isolados do subtipo C caracterizados neste estudo, e conforme o consenso da seqüência GGGRNNYYCC. A presença de mais que dois sítios de ligação de NF- κ B tem sido relatada em vários estudos como característica comum na maioria, mas não em todos, isolados de HIV subtipo C (Salminen *et al.*, 1996; Lole *et al.*, 1999; van Harmelen *et al.*, 2001; Novitsky *et al.*, 2002). A porção inferior de sítio de ligação NF- κ B mostrou substituição G4R e G7T (equivalente a posição da seqüência do consenso) e baixa afinidade de ligação de 85,4 em relação a 97,5 de cada um dos dois sítios superiores de acordo com valores dados pelo TFSEARCH (Jeeninga *et al.*, 2000). O sítio de ligação RPF2 (RBEIII), envolvido no passo de sinalização Ras/Raf, estava altamente conservado em todos os isolados.

5.4

A região V3 tem sido relatada por conter determinantes críticos que permitem a interação do vírus com células T CD4 ou o uso de correceptores (Skinner *et al.*, 1988; Cocchi *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1998). Foi mostrado que os isolados de HIV indutores de sincício possuem uma assinatura de aminoácidos com carga positiva maior do que naqueles não indutores de sincício. Além disso, o padrão de substituição de aminoácidos para um aminoácido de carga positiva na posição 11, e/ou 25, e/ou 29 do V3 loop contribui na indução de sincício fenotípico e uso de correceptores (de Jong *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1998) e a presença do aminoácido alanina na posição 25 ou tirosina na posição 21 tem sido associada ao tropismo por macrófagos (Westervelt *et al.*, 1992). Para determinar estas características fenotípicas nós verificamos que todos os isolados caracterizados como subtipo C, exceto 04BR267, tiveram baixa carga no domínio V3, que varia de 1 a 3, e conservaram aminoácidos descarregados na posição 11 e negativamente carregados na posição 25 (**Figura 22**). Além

disso, as maiores dos nossos isolados mostraram conter tirosina conservada na posição 21 (23 do alinhamento) e aminoácido ácido na posição 25 (27 do alinhamento). Juntos essas características sugeriram fortemente que todos os nossos isolados são variantes não indutoras de sincício e derivados de vírus R5 com tropismo por macrófagos. O motivo GPG na ponta do V3 e os potenciais sítios de glicosilação (N linked), estavam altamente conservados.

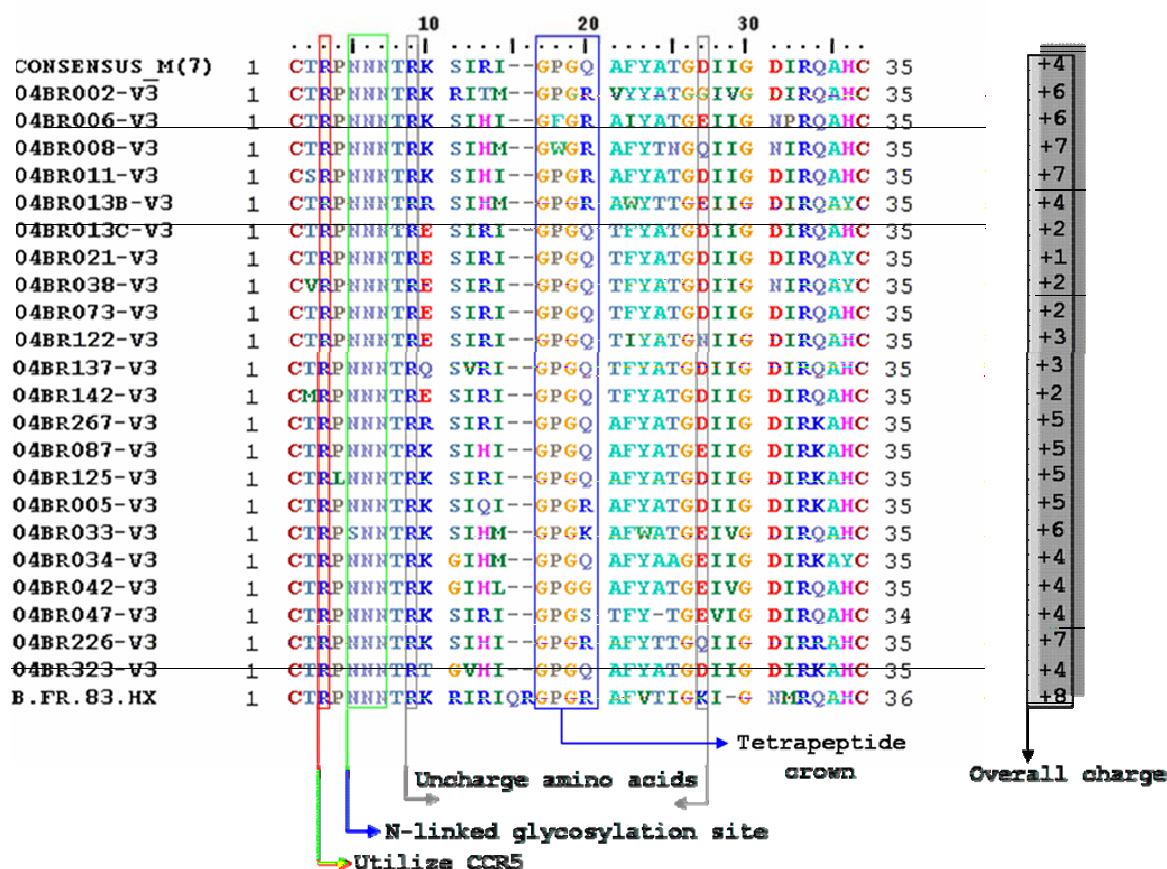


Figura 22: Alinhamento dos aminoácidos da região V3 de nossos isolados comparados com as seqüências correspondentes do consenso de aminoácidos do grupo M e cepa referencia HXB2. Os pontos indicam seqüências consenso idênticas ao grupo M, porem, os traços denotam lacunas que foram introduzidas para otimizar o alinhamento.

6 DISCUSSÃO

A evolução dinâmica dos vírus do HIV permite com que ele escape do sistema imune do hospedeiro, adquira resistência à terapia anti-retroviral e se adapte rapidamente às mudanças ambientais. As recombinações inter-subtipos do HIV são muito bem documentadas e conhecidas por facilitar este processo evolucionário, por introduzir a diversidade genética que explica as características fenotípicas adaptativas, tais como, modificações no tropismo celular, intensificação do uso de co-receptores, mudanças no crescimento cinético e contribuição da replicação do HIV. Portanto, compreender a diversidade estrutural do genoma do HIV é um instrumento epidemiológico indispensável no rastreamento da epidemiologia global do vírus e é considerado um componente essencial antes do desenvolvimento de vacinas.

Neste estudo, nós mostramos a verdadeira história filogenética por seqüenciamento do genoma completo de 22 cepas do HIV-1, previamente classificadas em nosso laboratório como sendo 6 do subtipo B, 8 do subtipo C e 8 do subtipo F, baseando-se em pequenas regiões subgenômicas. Linhagens não recombinantes foram detectadas em 4 das 6 cepas previamente classificadas como subtipo B e 2 das 8 identificados inicialmente com o subtipo F. Todas as 8 cepas que foram classificadas previamente como subtipo C foram confirmadas neste mesmo subtipo após o seqüenciamento do genoma completo. Estes resultados indicam que somente a análise do genoma completo é capaz de determinar o verdadeiro subtipo de vírus e que a determinação dos subtipos do HIV por seqüenciamento de pequenos fragmentos genômicos provavelmente não identifica possíveis recombinações.

Análises do genoma completo de linhagens do subtipo C e F não recombinantes e múltiplas regiões subgenômicas neste estudo, revelaram forte segregação de cada um destes isolados com a correspondente seqüência referência brasileira sugerindo a possibilidade de uma única entrada destas linhagens no país. A baixa distância genética relativa entre os isolados do

subtipo C, comparada com o subtipo B e F sugerem que os vírus do subtipo C foram introduzidos posteriormente no Brasil. Além disso, os ramos internos das seqüências dos nossos subtipos C dividem um nó comum estável com isolados da Etiópia tanto na árvore baseada no seqüenciamento completo como nas regiões subgenômicas, entretanto esta associação não foi estatisticamente suportada. Portanto a origem do subtipo C prevalente no Brasil permanece ainda para ser identificada quando mais seqüências completas deste subtipo tornarem-se disponíveis. A proximidade inter-amostras de linhagens do subtipo C e o fato de que estas amostras foram coletadas de três locais geograficamente distintos no Brasil, pode refletir as possíveis vias de transmissão de uma única linhagem do subtipo nestes locais.

Prévios estudos conduzidos por Carr e colegas em 2001 sugerem que as maiorias dos vírus que se acreditava ser do subtipo F na América do Sul são de fato recombinações entre os subtipos F e B. Entretanto nós provamos com este estudo que o subtipo F ainda é circulante no Brasil. Nós pudemos detectar o genoma completo do subtipo F não recombinante em 2 das 8 amostras previamente selecionadas como sendo infectadas com o subtipo F por seqüenciamento parcial do genoma. Esta baixa proporção pode ser atribuída à substituição de subtipos F puros por recombinantes BF. Esta drástica substituição de linhagens pode ser causada por vantagens seletivas desconhecidas da recombinação BF sobre a linhagem do subtipo F parental. Além disso, a análise filogenética do genoma completo de um subtipo F genuíno sugere dois distintos subtipos de HIV-1F1 co-circulantes no Brasil. Todavia, o vigor deste cluster não foi sustentado quando foram utilizadas árvores subgenômicas. A evolução dinâmica do subtipo ficou evidente como pode ser visto na **figura 10 (B)** que mostrou uma relação positiva entre as divergências genéticas, indicadas pelo comprimento dos ramos e o tempo de isolamento. Análises futuras com rigorosos métodos estatísticos como *maximun likelihood* serão necessárias para determinar a verdadeira extensão de variação e as taxas de substituição, quando mais seqüências do subtipo F se tornarem disponíveis.

Uma grande distância genética dentro dos subtipos B não recombinantes tem se mostrado serem maiores do que a distância genética dentro dos subtipos F e C. Estas observações, junto com a alta prevalência dos vírus do subtipo B no Brasil, fornecem fortes evidências para a maior idade deste subtipo. Além disso, o fraco *cluster* de vírus do subtipo B não recombinante circulante no Brasil na árvore do genoma completo provavelmente indica introdução deste subtipo a partir de múltiplas fontes.

A análise do genoma completo nos permitiu detectar potenciais intersubtipos BF recombinantes em dois dos seis subtipos parcialmente identificados como B e seis dos oito parcialmente identificados como subtipos F. A existência de subtipos B e F recombinantes não é surpreendente, uma vez que estes são os subtipos mais prevalentes nesta região (Sabino *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2002; Sa Filho *et al.*, 2005). O perfil de recombinação destes isolados mostrou uma considerável diversidade da sua estrutura genética, sugerindo eventos de recombinação independentes. A maioria das recombinações divide sítios de interseção comuns nas regiões *gag* e *nef*. As análises também revelaram um padrão de mosaico particular em dois pares de amostras e mostraram diferentes histórias de recombinação. O primeiro par consiste do isolado 04BR042 e 04BR226, que demonstram significantes similaridades entre si no seu genoma completo virtual. Entretanto, leves diferenças na localização de pontos de quebra foram observadas entre os dois isolados como obtidos por análise de *bootscan* e de χ^2 . Além disso, os dois isolados formam uma segregação monofilética na árvore de rede baseada no genoma completo. Entretanto estes resultados não foram consistentes com a análise da árvore NJ de fragmentos individuais, que demonstrou segregação em diferentes ramos mais do que dentro deles mesmos, sugerindo que eles são derivados de linhagens progenitoras recombinantes diferentes. Os outros pares incluíram os isolados 04BR034 e 04BR323, que exibiram padrões similares de recombinação BF diferentes que aqueles disponíveis no banco de dados e dividem sítios de interseção quase idênticos. Estes resultados foram

confirmados pela forte segregação monofilética em cada região diferente na árvore filogenética (**Figura 18**). Além disso, o histórico médico de infecção destes pacientes não revelou qualquer ligação epidemiológica direta entre eles. Portanto, estes resultados fornecem forte evidência que indica que os isolados 04BR034 e 04BR323 são representativos de um novo CRF circulando no Brasil. Entretanto nós não podemos renomear novos isolados como novo CRF porque eles não se encaixam nos critérios formais de classificação necessários para designar um novo CRF, que inclui três genomas completos não diretamente ligados epidemiologicamente. Uma vez que nós possuímos somente dois genomas completos mostrando consistente segregação em todas as regiões genômicas, a classificação formal deste BF CRF terá que esperar o seqüenciamento de outros vírus com estrutura genômica semelhante.

7 CONCLUSÕES

1. Os resultados relatados neste estudo conferem que subtipagem das cepas do HIV-1 baseada em seqüenciamento de amplicons curtos talvez seja inadequado não apenas para identificar os intersubtipos recombinantes, mas também para reconstrução da história evolucionária das cepas virais. Por isso, análise de genoma completo é o único método confiável para identificar e distinguir verdadeiros subtipos de HIV, que podem ser de importância prática considerável.
2. A detecção dos vírus BF recombinantes com estruturas diferentes de recombinação com uma distribuição ao acaso dos pontos de quebra é uma evidencia de que os subtipos de HIV podem sofrer recombinação em todas as regiões genômicas.
3. Os vírus BF recombinantes são comuns, e podem ter papel fundamental na mudança do quadro epidemiológico do HIV no Brasil.
4. O estudo providenciou novas seqüências genéticas puras e recombinantes de HIV atualmente circulantes no Brasil. Acreditamos que servirão como material de referencia para pesquisa e desenvolvimento de vacinas.
5. Neste estudo evidenciamos a presença de cepa BF supostamente CRF diferente da CRF 12_BF, detectada na Argentina. Porem, como sugerido pelo atual critério de classificação de CRFs, apenas análises futuras de genoma completo de outros BF recombinantes com estrutura genética semelhante a nossas cepas permitirão a definição formal destas cepas como novo BF CRF.

8 Apêndice

Agarose Gel (1%)

Ultra-pure agarose (Gibco BRL).....	1.5g
Tampão de TBE 0.5X.....	150 ml

O agarose foi dissolvido pelo aquecimento até que a solução tornar-se claro. A solução foi preparada recentemente como mencionado acima cada vez que o eletroforeses é necessitado.

Solução mistura de dNTP

dATP 100mM (Invitrogen).....	6.3μL
dCTP 100mM (Invitrogen).....	6.3μL
dGTP 100mM (Invitrogen).....	6.3μL
dTTP 100mM (Invitrogen).....	6.3μL
Água Milli-Q.....	475μL

Os nucleotides adicionaram na ordem acima, misturaram delicadamente, e mantiveram-se em -20°C.

Ethanol 70%

Absolute ethanol (Merck).....	70 ml
Água Milli-Q	30 ml

A solução foi homogeneizada e alíquotada nos tubos do falcão e manteve-se em 4°C.

Brometo de etídio 10mg/ml

Brometo de etídio (Pharmacia).....	0.2 g
Água destilada.....	19.8 ml

O brometo de etídio foi dissolvido na água destilada. A solução foi alíquotado e armazenou nos tubos escuros na temperatura ambiental

Isopropanol 75%

Isopropanol absoluto (Merck).....75 ml
Água Milli-Q.....25 ml

A solução foi homogeneizada e foi usada imediatamente após a preparação.

Tampão de TBE (5X)

Tris base (Gibco BRL).....54.0g
Acido Borico (Sigma).....27.5g
0.5M EDTA (pH 8.0).....20 ml
Água destilada Q.S.....1000ml.

A preparação foi feita dissolvendo a base de Tris e o ácido borico na água destilada usando o agitador e o grânulo magnético. O EDTA foi adicionado então e misturado completamente. A solução final foi filtrada usando o filtro descartável e armazenada na temperatura ambiental.

Tampão de TBE (0.5X)

Tampão de TBE 5X.....100ml
Água destilada Q.S.....900ml.

A solução completamente foi misturada e mantida na temperatura ambiental.

10X Tampão de diluição de BigDye terminator

2M Tris (pH 9).....2ml
1M MgCl₂.....100μL
Água Milli-Q.....7.9ml

A solução foi misturada corretamente, filtrado pelo filtro plástico descartável a seguir aliquoted no tubo de 1.5 ml Eppendorf e armazenado at-20°C.

9 Referências

- Anderson, J. A., Teufel, R. J. *et al* (1998). Correlated template-switching events during minus-strand DNA synthesis: a mechanism for high negative interference during retroviral recombination. *J. Virol.***72**: 1186–1194.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C. *et al* . (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-71.
- Bongertz, V., Bou-Habib, D. C. *et al* . (2000). "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* **23**(2): 184-93.
- Bouyac, M., Courcoul, M. *et al*. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor." *J Virol* **71**:9358-65.
- Brito, A. M., Castilho, E. A. *et al* . (2001). "[AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic]." *Rev Soc Bras Med Trop* **34**(2): 207-17.
- Bryant, D. and V. Moulton (2004). "Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks." *Mol Biol Evol* **21**(2): 255-65.
- Caride, E., Brindeiro R., *et al* . (2000). "Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART." *Virology* **275**(1): 107-15.
- Carr, J. K., Avila, M. *et al* . (2001). "Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America." *Aids* **15**(15): F41-7.
- Casseb, J., Katzenstein, D. *et al* . (2002). "Serotyping HIV-1 with V3 peptides: detection of high avidity antibodies presenting clade-specific reactivity." *Braz J Med Biol Res* **35**(3): 369-75.
- Castilho, E. A., Bastos, F. I. *et al* . (2000). "[AIDS in Brazil: a changing epidemic]." *Cad Saude Publica* **16**(## Suppl 1): 4-5.
- CDC (1981). *Pneumocystis pneumonia* - Los Angeles. *MMWR*;**30**:250-2
- CDC (1982). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR*;**31**:652-4.

- CDC (1982). Epidemiologic Notes and Reports Possible Transfusion-Associated Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) -- California . MMWR;**31**(48):507-8, 513-4.
- Charneau P., Alizon M, Clavel F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. J Virol **66**, 2814-2820.
- Charneau P., Clavel F. A *et al* (1991) single-stranded gap in HIV unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. J Virol **65**:2415-21.
- Chen, M. Y., Wang, W. K. *et al* . (2002). "Rapid detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype e infection by PCR." J Clin Microbiol **40**(10): 3805-9.
- Cho, M. W., Lee, M. K. *et al*. (1998). "Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4." J Virol **72**:2509-15.
- Clavel, F., Guetard, D. *et al* . (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science **233**(4761): 343-6.
- Clavel, F., Guyader, M. *et al* . (1986). "Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2." Nature **324**(6098): 691-5.
- Cocchi, F., DeVico, A. *et al*. (1996). "The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection." Nat Med **2**:1244-47.
- Coffin J. (1996a) Retroviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al* . (ed). Fundamental Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott.
- Coffin, J. M. (1996b). "The scoop on HIV mutations." J Int Assoc Physicians AIDS Care **2**(7): 45.
- Connor, R. I., Korber, B. T. *et al* . (1998). "Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines." J Virol **72**(2): 1552-76.
- Cornelissen, M., Kampinga, G. *et al* . (1996). "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 **70**(11): 8209-12.
- de Jong, J. J., Goudsmit, J. *et al*. (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity." J Virol **66**:757-65.

- De Leys, R., Vanderborght, B. *et al* . (1990). "Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin." *J Virol* **64**(3): 1207-16.
- Delwart, E. L., Herring, B. *et al* . (1995). "Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay." *PCR Methods Appl* **4**(5): S202-16.
- Delwart, E. L., E. Shpaer, G. *et al* . (1993). "Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes." *Science* **262**(5137): 1257-61.
- DeStefano J J., Buiser, R. G. *et al* . (1991). Polymerization abd RNase H activities of the reverse transcriptases from avainmyeloblastosis, human immunodeficiency, and Moloney murine leukemia viruses arefunctionally uncoupled. *J Biol Chem* **266**, 7423-7431.
- Drouin, G., Prat, F. *et al* . (1999). "Detecting and characterizing gene conversions between multigene family members." *Mol Biol Evol* **16**(10): 1369-90.
- Dumitrescu, O., Kalish, M. L. *et al* . (1994). "Characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates from children in Romania: identification of a new envelope subtype." *J Infect Dis* **169**(2): 281-8.
- Gao F., Robertson, D. L. *et al* (1998). "A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol*; **72**:5680-8
- Goncalves, J., Shi, B. *et al* (1995). "Biological activity of human immunodeficiency virus type 1 Vif requires membrane targeting by C-terminal basic domains." *J Virol* **69**:7196-04.
- Goodrich, D. W. and Duesberg, P. H. (1990). "Retroviral recombination during reverse transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2052-6.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R. *et al* . (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." *N Engl J Med* **305**(24): 1425-31.
- Gottlinger, H. G., Dorfman, T. *et al* . (1991). "Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release." *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:3195-99.
- Grassly, N. C. and Holmes, E. C. (1997). "A likelihood method for the detection of selection and recombination using nucleotide sequences." *Mol Biol Evol* **14**(3): 239-47.

- Gurtler, L. G., Hauser, P. H. *et al* . (1994). "A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon." *J Virol* **68**(3): 1581-5.
- Hahn, B. H. and Shaw, G. M. (1986). Genetic variation in HTLVIII/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* **232**, 1548-1553.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Hierholzer, J., Montano, S. *et al* . (2002). "Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina." *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**(18): 1339-50.
- Holmes, E. C., Worobey, M. *et al* . (1999). "Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus." *Mol Biol Evol* **16**(3): 405-9.
- Hu, W. S. and Temin, H. M. (1990). "Retroviral recombination and reverse transcription." *Science* **250**(4985): 1227-33.
- Hunter, E. (1978). "The mechanism for genetic recombination in the avian retroviruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **79**: 295-309.
- Huson, D. H. (1998). "SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data." *Bioinformatics* **14**(1): 68-73.
- Jakobsen, I. B. and Easteal, S. (1996). "A program for calculating and displaying compatibility matrices as an aid in determining reticulate evolution in molecular sequences." *Comput Appl Biosci* **12**(4): 291-5.
- Jeeninga, R. E., Hoogenkamp, M. *et al*. (2000). "Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G." *J Virol* **74**:3740-51.
- Jonassen, T. O., Stene-Johansen, K. *et al* . (1997). "Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s." *Virology* **231**(1): 43-7.
- Jones, J. S., Allan, R. W. *et al* . (1994). "One retroviral RNA is sufficient for synthesis of viral DNA." *J Virol* **68**(1): 207-16.
- Kampinga, G. A., Simonon, A. *et al* . (1997). "Primary infections with HIV-1 of women and their offspring in Rwanda: findings of heterogeneity at seroconversion, coinfection, and recombinants of HIV-1 subtypes A and C." *Virology* **227**(1): 63-76.
- Kostrikis, L. G., Shin, S. *et al* . (1998). "Genotyping HIV-1 and HCV strains by a combinatorial DNA melting assay (COMA)." *Mol Med* **4**(7): 443-53.

Kuby, J. (1997). Immunology. New York: W.H. Freeman and Company.

Kuiken, C. L., Foley, B. T. and Korber, B. T. (1998). "Determinant of HIV-1 protein evolution", In molecular evolution of HIV. (Crandall, K., ed). Johns Hopkins University press, Baltimore, MD.

Kumar, S., Tamura, K. *et al* . (2001). "MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software." Bioinformatics **17**(12): 1244-5.

McCutchan, F. E., Carr, J. K. *et al.* (1999). "Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria." *Virology* **254**(2): 226-34.

McCutchan, F. E., Viputtigul, K. *et al.* (2000). "Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(8): 801-5.

Milne, I., Wright, F. *et al.* (2004). "TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments." *Bioinformatics* **20**(11): 1806-7.

Morgado, M. G., Sabino, E. C.

- Peeters, M. and Sharp, P. M. (2000). "Genetic diversity of HIV-1: the moving target." *Aids* 14 Suppl 3: S129-40.
- Peliska, J. A. and Benkovic, S. J. (1994). "Fidelity of in vitro DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase." *Biochemistry* **33**(13): 3890-5.
- Plantier, J. C., Vergne, L. *et al.* (2002). "Development and evaluation of a DNA enzyme immunoassay method for env genotyping of subtypes A through G of human immunodeficiency virus type 1 group M, with discrimination of the circulating recombinant forms CRF01_AE and CRF02_AG." *J Clin Microbiol* **40**(3): 1010-22.
- Posada, D. (2002). "Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data." *Mol Biol Evol* **19**(5): 708-17.
- Rayfield, M. A., Downing, R. G. *et al.* (1998). "A molecular epidemiologic survey of HIV in Uganda. HIV Variant Working Group." *Aids* **12**(5): 521-7.
- Robbins, K. E., Kostrikis, L. G. *et al.* (1999). "Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kenya: a comparison using phylogenetic analysis and a combinatorial melting assay." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(4): 329-35.

- Sawyer, S. (1989). "Statistical tests for detecting gene conversion." *Mol Biol Evol* **6**(5): 526-38.
- Schierup, M. H. and Hein, J. (2000). "Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis." *Genetics* **156**(2): 879-91.
- Sharp, P. M., Robertson, D. L. *et al* (1994). Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. *AIDS* **8** (Suppl. 1), S27-S42.
- Simon, F., P. Maucclere, *et al* . (1998). "Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O." *Nat Med* **4**(9): 1032-7.
- Skalka, A. M. & Goff, S. P. (1993) in *Reverse Transcriptase* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY)
- Skinner, M. A, Langlois, A. J. *et al*. (1988). "Neutralizing antibodies to an immunodominant envelope sequence do not prevent gp120 binding to CD4." *J Virol* **62**: 4195-00.
- Soares, M. A., De Oliveira, T. *et al* . (2003). "A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil." *Aids* **17**(1): 11-21.
- Srinivasan, A., Anand, R. *et al* . (1987). "Molecular characterization of human immunodeficiency virus from Zaire: nucleotide sequence analysis identifies conserved and variable domains in the envelope gene." *Gene* **52**(1): 71-82.
- Stephens, J. C. (1985). "Statistical methods of DNA sequence analysis: detection of intragenic recombination or gene conversion." *Mol Biol Evol* **2**(6): 539-56.
- Subbarao, S., K. Limpakarnjanarat, *et al*. (1998). "HIV type 1 in Thailand, 1994-1995: persistence of two subtypes with low genetic diversity." *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**(4): 319-27.
- Telesnitsky, A., and Goff, S. P. 1997. Reverse transcriptase and the generation of retroviral diversity, p. 121–160. *In* J. M. Coffin, S. H. Hughes, and H. E. Varmus (ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J. *et al* . (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-82.
- Thomson, M. M., Perez-Alvarez, L. *et al* . (2002a). "Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy." *Lancet Infect Dis* **2**(8): 461-71.
- Thomson, M. M., Delgado, E. *et al* . (2002b). "Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype

- recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences." *J Gen Virol* **83**(Pt 1): 107-19.
- Unutmaz, D. and Littman, D. R. (1997). "Expression pattern of HIV-1 coreceptors on T cells: implications for viral transmission and lymphocyte homing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1615-8.
- Vaishnav, Y. N. and Wong-Staal, F. (1991). "The biochemistry of AIDS." *Annu Rev Biochem* **60**: 577-630.
- Van Harmelen, J. H., Van der Ryst, E. *et al* . (1999). "A predominantly HIV type 1 subtype C-restricted epidemic in South African urban populations." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(4): 395-8.
- van Harmelen, Williamson, J. C. *et al*. (2001). "Characterization of full-length HIV type 1 subtype C sequences from South Africa." *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:1527-31.
- van Harmelen, J., van der Ryst, E. *et al* . (1999). "Restriction fragment length polymorphism analysis for rapid gag subtype determination of human immunodeficiency virus type 1 in South Africa." *J Virol Methods* **78**(1-2): 51-9.
- Vartanian, J. P., Meyerhans, A. *et al* . (1991). "Selection, recombination, and G----A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes." *J Virol* **65**(4): 1779-88.

- Yamaguchi, J., Vallari, A. S. *et al* . (2002). "Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters." *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**(4): 269-82.
- Zhang, J., Tang, L. Y. *et al* . (2002). Most retroviral recombinations occur during minus-strand DNA synthesis. *J Virol* **74**:2313-22.
- Zhu, G. W., Liu, Z. Q. *et al* . (1995). "Pathogenesis of lymphocyte-tropic and macrophage-tropic SIVmac infection in the brain." *J Neurovirol* **1**(1): 78-91.
- Zolla-Pazner, S., O'Leary, J. *et al* . (1995). "Serotyping of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from diverse geographic locations by flow cytometry"

TABELA DE CONTEÚDOS

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	VIII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	VI
SUMÁRIO.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 A DESCOBERTA DO HIV/AIDS.....	4
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO HIV.....	4
2.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV.....	5
2.3.1 PRODUTOS GÊNICOS DO HIV-1.....	6
2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV-1.....	7
2.4.1 MUTAÇÃO.....	7
2.4.2 RECOMBINAÇÃO.....	7
2.4.2.1 MECANISMOS DE RECOMBINAÇÃO.....	8
2.4.2.2 MÉTODOS PARA DETECTAR A RECOMBINAÇÃO.....	9
2.4.2.2.1 MÉTODO BASEADO NA DISTÂNCIA.....	9
2.4.2.2.2 MÉTODOS FILOGENÉTICOS.....	11
2.4.2.2.3 MÉTODOS DE COMPATIBILIDADE LADO A LADO.....	11
2.4.2.2.4 MÉTODOS DE SUBSTITUIÇÃO DISTRIBUIÇÃO.....	11
2.4.3 SÍNTESE DO DNA PROVIRAL.....	12
2.5 CLASSIFICAÇÃO DO HIV.....	14
2.5.1 MÉTODOS DE SUBTIPOAGEM DO HIV-1.....	14
2.5.1.1 ENSAIO DE HIBRIDIZAÇÃO DE Sonda.....	15
2.5.1.2 ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO.....	16
2.5.1.3 ENSAIO DE MOBILIDADE HETERODUPLEX (HMA).....	16
2.5.1.4 SUBTIPAGEM ESPECÍFICA POR PCR.....	17
2.5.1.5 ENSAIO DE DENATURAÇÃO DO DNA COMBINATORIAL (COMA).....	17
2.5.1.6 SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DE DNA.....	18
2.5.1.7 SOROTIPAGEM.....	18
2.6 IMPORTÂNCIA DA SUBTIPAGEM DO HIV.....	19
2.7 IMPORTÂNCIA DO SEQÜENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO DO HIV.....	19
2.8 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS SUBTIPOS DO HIV-1.....	20
2.9 BREVE REVISÃO DO HIV-1 NA AMÉRICA DO SUL E BRASIL.....	21
3 OBJETIVOS DO ESTUDO.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	25
4.2 ISOLAMENTO VIRAL.....	25
4.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	26
4.4 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	27

4.5	<i>SEQÜENCIAMENTO DE DNA</i>	28
4.6	<i>ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS</i>	29
5	RESULTADOS	33
5.1	<i>ISOLADOS NÃO RECOMBINANTES</i>	33
5.2	<i>EVIDÊNCIA DE RECOMBINAÇÃO VIRAL</i>	44
5.3	<i>CARACTERÍSTICAS DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS</i>	54
5.4	<i>ANÁLISE DA REGIÃO V3 DO GENE ENV</i>	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	63
8	APÊNDICE	64
9	Referências	66
	Summary	
	Artigos Publicados	

Sequence Note

Analysis of Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome Reveals a Variable Spectrum of Subtypes B and F Recombinants in São Paulo, Brazil

DERCY JOSÉ DE SA FILHO,¹ SABRI SANABANI,² RICARDO SOBHIE DIAZ,¹ PATRÍCIA MUNERATO,¹
ADRIANA BRUNSTEIN,³ ERIKA FUSUMA,¹ ESTER CERDEIRA SABINO,² LUIZ MARIO JANINI¹

ABSTRACT

Recombination is one of the major mechanisms contributing to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variability. Analysis of *pol* gene sequences of 215 HIV-1 samples from São Paulo, Brazil classified 189 sequences as subtype B (87.9%), 8 sequences as subtype F (3.7%), and 18 sequences (8.4%) as B/F recombinants. After the analysis of the *pol* gene, a subset of six recombinant samples composed of sequences with a related recombinant *pol* structure was selected for full-length genome analysis to identify a possible circulating recombinant form. According to full-length genome analysis, recombination was higher in *gag*, protease, reverse transcriptase, integrase, and *vif*. Identification of many distinct recombinant forms and the absence of an identifiable HIV-1 circulating recombinant form suggest that a high frequency of dual infections between HIV-1 subtypes B and F is occurring in São Paulo, Brazil.

RECOMBINATION IS ONE OF THE MAJOR MECHANISMS contributing to retrovirus variability, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), and this diversity may be a potential obstacle to AIDS vaccine development.¹ Recombination occurs during reverse transcription by the alternate switching of templates between both genomic RNA strands copackaged in each virion.^{2,3}

Recombinant HIV-1 strains that are endemic are called circulating recombinant forms (CRF).⁴ In South America the CRF12_BF, composed of subtype B and F fragments, has been detected in Argentina and Uruguay. This is, to date, the first identified CRF originating in the Americas.⁵

Brazil is the largest South American country and it is the most affected by the HIV/AIDS epidemics; it is estimated that there are 610,000 infected individuals. Southeastern Brazil harbors the largest portion of the HIV epidemic, and the city of São Paulo is considered to be the epicenter of the epidemic,

harboring 19.3% of the cases, with an AIDS incidence of 24.1 cases per 100,000 persons per year (Brazilian Ministry of health, <http://www.aids.gov.br>). The HIV-1 subtype distribution in Brazil is complex, especially when compared to other South American countries. The major circulating HIV-1 subtypes in Brazil are B (75%) followed by F (10%), but other clades such as C, B/C, and B/F recombinants have been documented.^{6–11}

The structure of CRF12_BF contains four recombination break points in the *pol* region of their genomes.⁵ CRF12_BF was first described in Argentina.⁵ Phylogenetic analysis of CRF12_BF sequences indicated that F subtype segments of this recombinant are related to the clade F viruses circulating in Brazil.^{5,12}

Since the Argentinean epidemic is closely related to the Brazilian one, our strategy to encounter a Brazilian CRF started with the analysis of a *pol* fragment containing 1.2 kb. Further-

¹Retrovirology Laboratory, Federal University of São Paulo, SP 0439032, Brazil.

²Fundação Pro-Sangue, Hemocentro, São Paulo, Brazil.

³Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP 0439032, Brazil.

more, it has been determined that recombination has a tendency to be more frequent in *gag/pol* than in other areas of the HIV-1 genome.¹³ Based on these observations, *pol* sequence data were generated to evaluate the subtype distribution and the characterization of recombinants in the population of the city of São Paulo. For further genomic characterization of recombinants, we analyzed the full-length sequences of a selected subset of these samples, examining recombination points.

We studied 215 samples from individuals enrolled at the Brazilian HIV/AIDS programs at the Federal University of São Paulo, Brazil. Samples were collected from 1999 to 2002, after informed consent. To exclude the possibility of polymerase chain reaction (PCR)-mediated artifacts, recombinant sequences were confirmed in duplicate PCR amplifications carried out separately, using proviral DNA. DNA was extracted from buffy-coat using the QIAquick Kit (QIAGEN Inc.) and

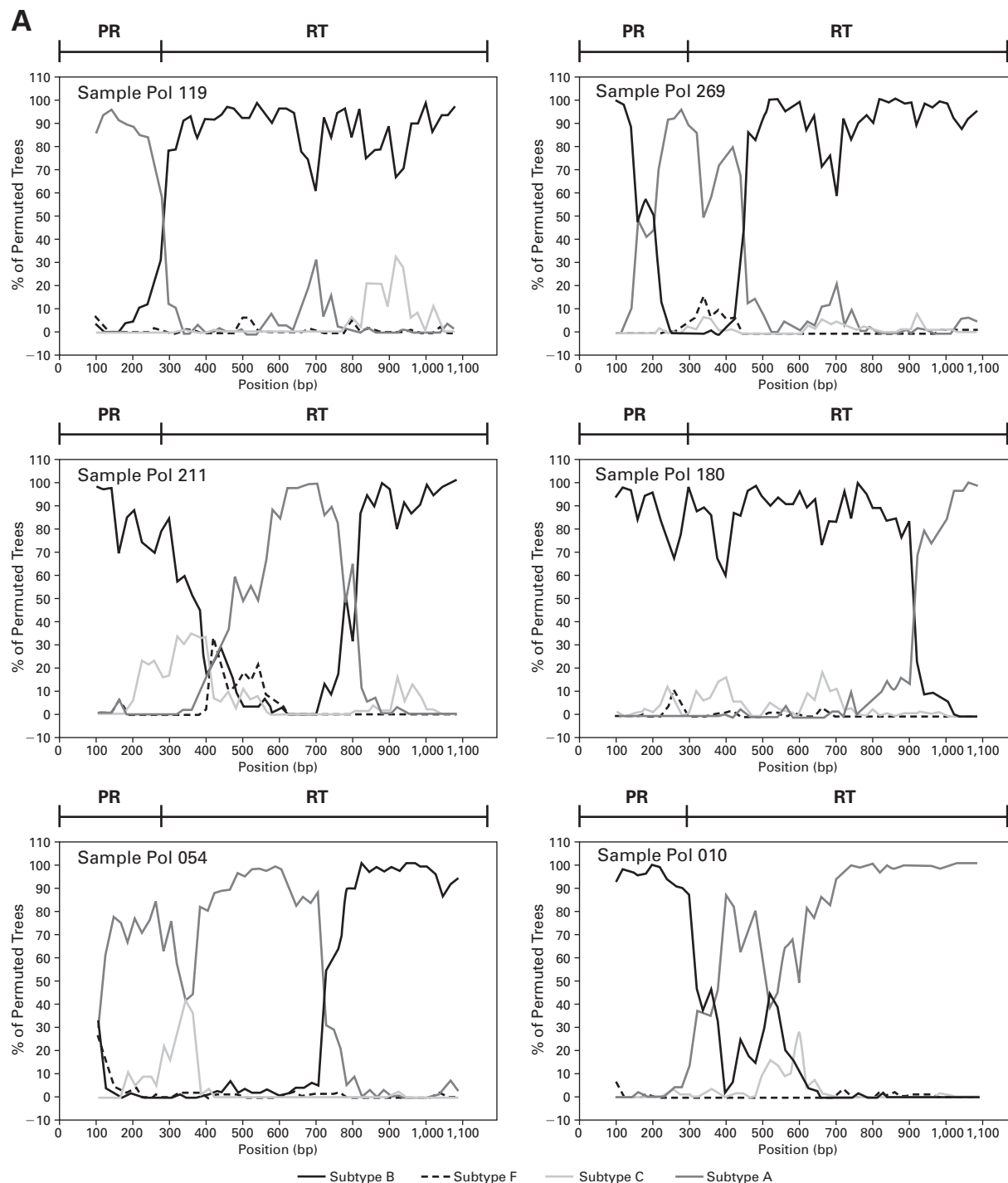


FIG. 1.

used as a target to amplify a 1719-bp fragment of the HIV *pol* gene. In the first PCR round, a solution containing 2.5 U of *taq* DNA polymerase (Gibco), 10× PCR buffer, 40 μ l of dNTP (10 mM), 70 μ l of $MgCl_2$ (50 mM), and 20 pmol of the outer primer Pol 1 (5'-GGGAGTGGGGGACCCGCCATAA-3', positions to HXB2 1842–1865) and Pol 2 (5'-CATTGGCCTTGC-CCTGCTTCTGT-3', positions 3558–3582) was added to 5 μ l of DNA extracted in a final volume of 50 μ l. In the second round PCR, 5 μ l of the first round product and inner primers Pol 3 (5'-GGGCCCTAGGAAAAGGGCTGTT-3'), positions 2006–2029) and Pol 4 (5'-ACCGGTTCTTTTGA-ATCTCCCTG-3', positions 3490–3514) were used. Reactions were allowed to proceed according to the following program: 10 min 94°C, then 35 cycles of denaturing at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, primer extension at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR product was purified with the QIAquick spin PCR purification kit (QIAGEN Inc.). Sequences were determined bidirectionally and set with an ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit—With Ampli Taq DNA Polymerase and the reaction products were sequenced and analyzed by the Automatic sequence model ABI 3100 (Applied Biosystems). Resulting sequence data were utilized for assessment of subtype distribution.

pol sequence alignments were generated by using Clustal X.¹⁴ Phylogenetic relationships were established by using the neighbor-joining method present in the PHYLIP software package version 3.5c¹⁵ and maximum likelihood (PAUP version 4.0b10).

Recombinant *pol* sequences produce conflicting phylogenetic signals and are better represented by networks of sequences rather than strictly bifurcating evolutionary trees.¹⁶ The method used to characterize recombination was split decomposition, a method that depicts parallel edges between sequences, forming a network (SplitsTree program, version 2.4).¹⁶ The split graph is constructed based on pairwise distances input, which is estimated by the Hamming method with Fit 85.4. Breakpoints were mapped by inspection of subtype signature nucleotides in alignments using a set of reference sequences from the Los Alamos National Laboratory (HIV Sequence Compendium 2001). Analysis of recombination points was done also by bootscanning¹⁷ using the Simplot software, version 2.5 (Stuart Ray, <http://www.med.jhu.edu>).

Amplification of the full-length proviral genome was carried out by nested PCR in five overlapping segments of 1.8–3 kb each. Reagents and thermocycling profiles have been previously described.⁵ Purified PCR products were sequenced bidirectionally in overlapping segments of approximately 400 bp. Se-

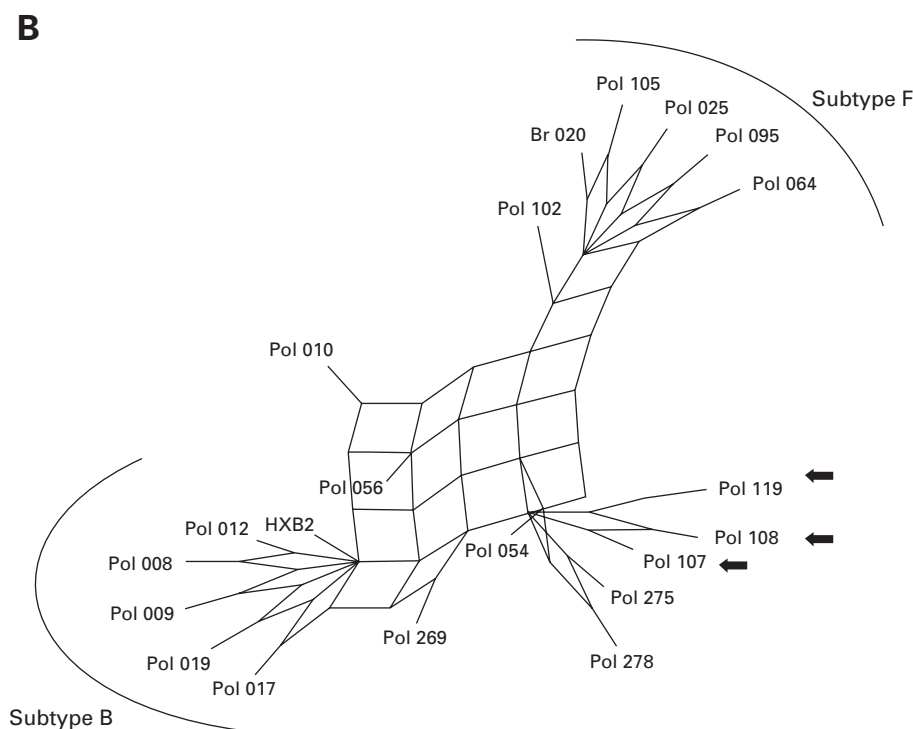


FIG. 1. (A) Bootscan analysis of HIV-1 *pol* sequences of 6 of 18 recombinants B/F viruses from São Paulo, Brazil shows the variety of recombinant forms found. The horizontal axis represents the nucleotide distance of the window from the 5' end of the query sequence (nt 2253 in HXB2). The initial 297 bp corresponds to protease (PR) gene and the next 900 bp to reverse transcriptase (RT). The vertical axis represents the percentage of trees (using 100 bootstrap replicates) that supports branching with the consensus subtype reference sequence. A 250 nt window advanced in 20 nt increments was used. Sequences were gap stripped; the transversion-to-transition ratio was set to 2.0, distances were calculated according to Kimura's two-parameter model, and trees were performed with the neighbor-joining algorithm. (B) Network analysis by SplitsTrees of HIV-1 *pol* gene subtype B, F, and recombinants B/F. In this analysis sequences B and F constitute defined groups. Three sequences (Pol 107, Pol 108, and Pol 119) with the same breakpoints of recombination were joined. However, sequences with different recombination points were spread in the network. Hamming method with Fit 85.4.

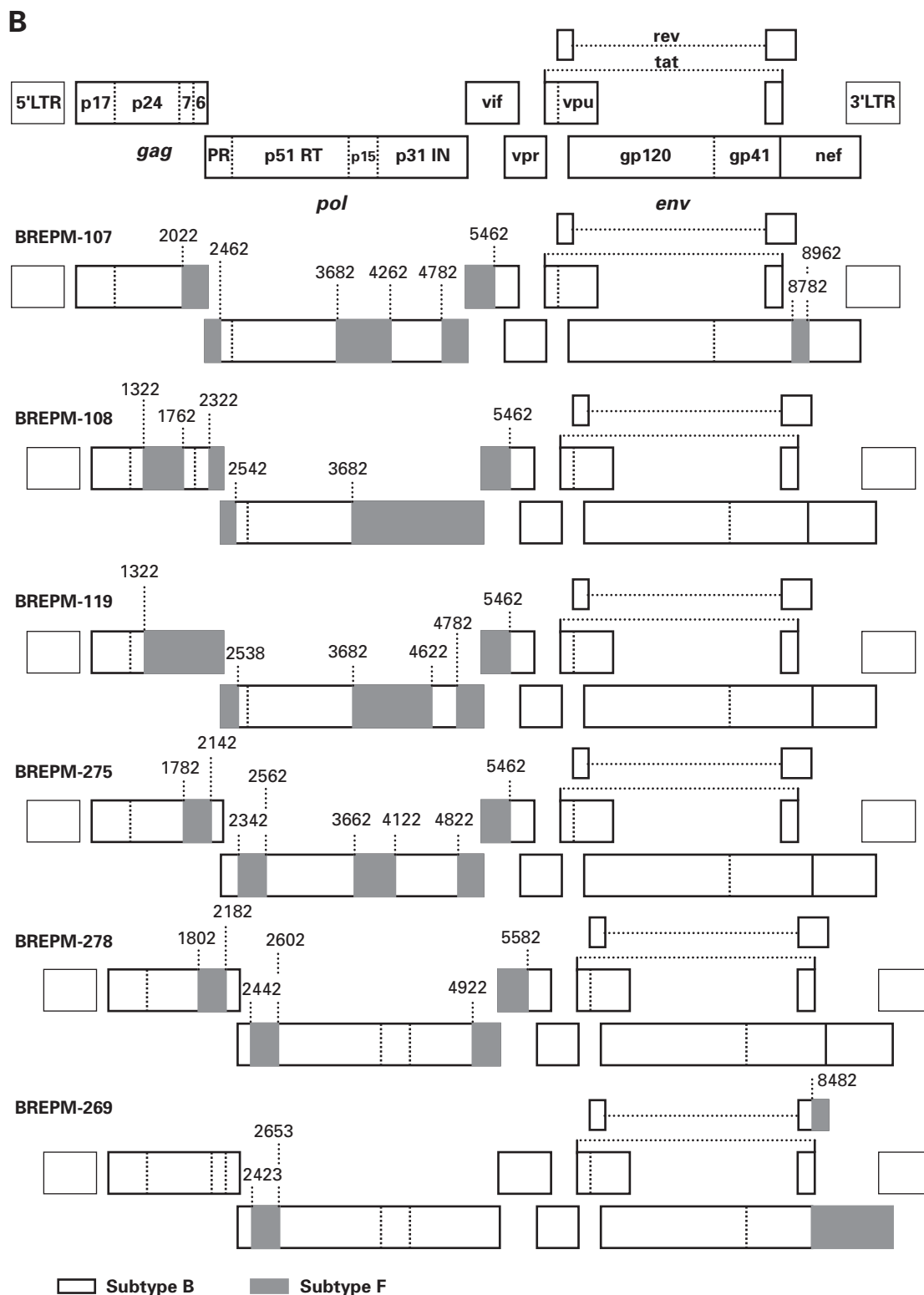


FIG. 2. (A) Bootscan analysis of full-length sequences of three samples (107, 108, 119). The parameters used correspond to those described in the legend to Figure 1A. (B) Schematic representation of the mosaic structures of full-length genomes of the six recombinant B/F. B subtype segments are shown as open squares and F subtype segments as solid squares. Recombinant breakpoints were identified and positions are listed in relation to HXB2 (5'-nt 832-9432).

quences were corrected and assembled using Sequencher 4.0 software. GenBank sequences are AY771588–AY771593 and AY771373–AY771587).

According to phylogenetic analysis of all 215 *pol* sequences, 189 sequences were classified as subtype B (87.9%) and 8 as subtype F (3.7%). The remaining 18 sequences (8.4%) that did not cluster with any subtype were further analyzed using the Bootscan and SplitsTree methodologies. Bootscan analysis revealed that these sequences were B/F recombinant forms in protease and/or reverse transcriptase regions of the *pol* gene (Fig. 1A). In Bootscan analysis, the amplified *pol* fragment containing 1200 bp was compared to the *pol* fragment of clades B, F, and C reference strains, which circulate in Brazil, and a clade A strain as an outgroup (GenBank accession numbers: AF033819, AF005494, AF286228, and AB098330). Only sequences with bootstrap values above 90% throughout the analysis and in which a fragment of at least 250 bp was shown to belong to a discordant subtype were considered recombinant forms. Guided by the Bootscan graphical output and visual inspection of sequence alignments, we were able to map breakpoints in recombinant sequences. Breakpoints corresponded to mid points in the sequence stretch between signature nucleotides of subtypes B and F.

The SplitTree analysis demonstrated that recombinant sequences with similar breakpoints had closer connections in the network than unrelated sequences. Due to the large number of sequences available, only representative samples are presented here for purposes of clarity (Fig. 1B). In this analysis sequences belonging to pure subtypes B and F clustered in two defined groups (network poles). Three sequences (Pol 107, Pol 108, and Pol 119) with the same breakpoints of recombination clustered together. However, sequences with different recombination breakpoints were spread in the network. After the analysis of the *pol* gene, a subset of six recombinant samples composed of sequences with a related recombinant *pol* structure identified by Bootscan graphical output and SplitTree analysis was selected for amplification and sequencing of the full-length HIV-1 genome.

All complete genomes sequenced had unique structures when analyzed by bootscan (Fig. 2A). Also the six fully sequenced genomes had distinct recombination patterns that were different from CRF12_BF, the recombinant sequences described in Argentina and Uruguay (data not shown). In the six analyzed sequences we found recombination break points in *gag*, *pol*, and *vif* genes and the maintenance of the B subtype within the *env* gene (gp120 and gp41) without recombination points. Figure 2B is a schematic depicting the points of B/F recombination within the genomes subjected to full-length sequencing.

Analysis of the *pol* gene from recombinant samples showed that a large variety of recombination patterns involving subtypes B and F are circulating in the São Paulo HIV-1 epidemic. It suggests that the *pol* gene is exposed to multiple recombination events (Fig. 1A). The reasons for the high recombination frequency in the *pol* gene are the homopolimeric bases composition of *pol*, sequence similarity, and the presence of secondary structures that favor reverse transcriptase enzyme switches between the two viral RNA strands during cDNA generation.^{18,19} Figure 2B shows that many recombinant breakpoints were also found in *gag* and *gag/pol* genes. However, no recombination was found in the envelope region. It could be hypothesized that

this finding might be due to the fact that recombinants were screened based on *pol* sequences only, which may underestimate significantly the number and the diversity of B/F recombinants circulating regionally. Therefore, the maintenance of subtype B in the *env* gene is relevant only to the six fully sequenced samples presented here. Our analysis revealed that accessory genes (*vpr*, *vpu*, first and second exons of *tat* and *rev*) of the five full-length sequenced genomes were classified as subtype B. However, *vif*, an important factor for viral infectivity, was very frequently a recombinant gene in our samples (Fig. 2B). It is conceivable that this recombinant *vif* represents a very adapted gene, able to fix and expand well, although further investigation is required to confirm this hypothesis.

All full-length recombinant sequences in this study presented a distinct pattern of B/F recombination, suggesting the presence of a full spectrum of recombination between these subtypes in the sample population studied (Fig. 2). The identification of many distinct recombining forms suggests that a high frequency of dual infections between HIV-1 subtypes B and F occurred in São Paulo, demonstrating that the HIV-1 epidemic in São Paulo City is complex. The HIV epidemic is very old in São Paulo with a relatively high prevalence, making it difficult to detect a CRF, although B/F recombinants are clearly an important component of the epidemic. As the evolutionary advantages of recombination are well established,^{20–22} it is conceivable that a well-adapted B/F recombinant form could emerge in the near future. However, the presence of a full spectrum of HIV-1 B/F recombinants in this population illustrates the potential to increase the viral genetic diversity, with potential repercussions in future vaccine designs, uncertainty about antiretroviral therapeutic responses, or unknown antiretroviral resistance mutation profiles.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Função de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)/Brasil. Processos: 03/03513-7; 03/05184-0.

REFERENCES

- Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, and Hahn BH: Recombination in HIV-1. *Nature* 1995;374:124–126.
- Hu WS and Temin HM: Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 1990;250:1227–1233.
- Coffin JM: Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: Some unifying hypotheses. *J Gen Virol* 1979;42:1–26.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, et al.: HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000;288:55–56.
- Thomson MM, Delgado E, Herrero I, et al.: Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 2002;83:107–119.
- Delgado E, Leon-Ponte M, Villahermosa ML, et al.: Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: A UNAIDS study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:753–758.

7. Sucupira MC, Souza IE, Costa LJ, Scheinberg MA, and Diaz RS: Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in Sao Paulo, Brazil. *Antiviral Ther* 2001;6:263–264.
8. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, *et al.*: Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): A survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003;17:1063–1069.
9. Sabino EC, Diaz RS, Brígido LF, *et al.*: Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. *AIDS* 1996;10:1579–1584.
10. Rossini MA, Diaz RS, Caseiro M, Turcato G, Accetturi CA, and Sabino EC: HIV-1 subtypes among intravenous drug users from two neighboring cities in São Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:45–47.
11. Tanuri A, Swanson P, Devare S, *et al.*: HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20:60–66.
12. Thomson MM, Perez-Alvarez L, and Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002;2:461–471.
13. Magiorkinis G, Paraskevis D, Vandamme AM, Magiorkinis E, Sypsa V, and Hatzakis A: In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: Determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J Gen Virol* 2003;84:2715–2722.
14. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG: The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876–4882.
15. Saitou N and Nei M: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
16. Fitch WM: Networks and viral evolution. *J Mol Evol* 1997;44 (Suppl. 1):S65–75.
17. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, and McCutchan FE: Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:1423–1425.
18. Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, and Dougherty JP: High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 2000;74:1234–1240.
19. Negroni M and Buc H: Mechanisms of retroviral recombination. *Annu Rev Genet* 2001;35:275–302.
20. Burke DS: Recombination in HIV: An important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis* 1997;3:253–259.
21. Chao L: Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* 1990;348:454–455.
22. Temin HM: Sex and recombination in retroviruses. *Trends Genet* 1991;7:71–74.

Address reprint requests to:

Luiz M. Janini

Retrovirology Laboratory

R. Pedro de Toledo 781

16 andar Vila Clementino

São Paulo SP 04039032, Brazil

E-mail: mjanini@pesquisa.epm.br

Hematopoietic mixed chimerism after allogeneic BMT

Chimerism after BMT has been documented by various genetic markers, RBC antigens, and, less frequently, by immunoglobulin allotypes. These markers are less sensitive than short tandem repeats (STRs), which provides a powerful tool for analysis of human polymorphisms. Application of STR analysis in patients undergoing allogeneic BMT has been used to detect mixed or complete chimerism, recurrent leukemia, and endogenous repopulation of marrow in early and late phases after transplant. It can detect minor populations of DNA in the period after transplant with adequate sensitivity, whereas traditional immunohematologic evaluation is limited because of the necessity of transfusing RBCs.¹

We describe a 21-year-old man with acute lymphoblastic leukemia who received an allogeneic unrelated BMT from a female donor after achieving complete remission. The patient blood group was A1/C-c+D-E-e+, and the donor's was O/C-c+D+E-e-; that is, there was a minor ABO mismatch. The marrow was treated to remove RBCs

and plasma. The conditioning treatment was cyclophosphamide plus total body irradiation and rabbit antilymphocyte globulin (ATG) (rabbit ATG, Fresenius, Bad Homburg, Germany) (60 mg/kg cyclophosphamide on Days -3 and -2, 8 Gy on Day -1 in a single dose, and 3 mg ATG/kg/day on Days -6 to -2). GVHD prophylaxis was cyclosporine A (CsA) plus short-course methotrexate: CsA was given at a starting dose of 3 mg per kg and adjusted to maintain blood levels of 150 to 250 µg per mL. The patient had moderate GVHD (skin, 3; liver, 2; gastrointestinal tract, 0). He received transfusion in the early phase after transplant with no more than 6 units of WBC-reduced and irradiated RBCs and 6 WBC-reduced and irradiated plateletpheresis units, all blood group O.

After 4 months without RBC transfusions, his Rh phenotype was C-c+D+E+e+. His RBCs typed as group O with mixed-field reactions with anti-A,B and anti-A sera. In tube tests, the mixed field was more evident with monoclonal antisera compared with polyclonal antisera. The mixed field with anti-A,B and anti-A sera was more evident with the gel method than with the tube method. The patient's ABO blood group was studied monthly after trans-

plantation. Weak reactivity with monoclonal anti-A,B and anti-A antisera was observed consistently. Twelve months after BMT, the patient was in complete hematologic remission, but mixed-field ABO typings persisted, more evident on gel than tube testing.

We also applied molecular methods to study the blood group and the DNA polymorphisms of peripheral blood and marrow (see Table 1). The sixth and seventh exons of the ABO gene were amplified and sequenced with specific primers.² The result of sequence-based typing of the blood group was ABO* 0101, 0201, and it was confirmed that granulopoiesis came from the donor. Furthermore, with nine STR-specific primers (AmpFLSTR Profiler, Applied Biosystems, Foster City, CA), we amplified the patient's DNA before and after BMT and also the donor's DNA. The analysis was performed with an automatic sequencer (ABI PRISM 310, Applied Biosystems). Results showed a complete donor reactivity allele pattern in five of nine loci, whereas in the other four there was a sharing of alleles between the donor and the patient before BMT in both peripheral blood and marrow. The

TABLE 1. RBC typings and DNA polymorphisms demonstrating mixed chimerism in the glycophorin A+-enriched population

Laboratory tests	Results of laboratory tests					
	Patient					
	Donor	Before BMT	After BMT			
			1 year	2 years 8 months	2 years 8 months, glycophorin A+ population	3 years 6 months
ABO blood group (peripheral blood)						
Anti-A,B	0	4+*	± (MF)	± (MF)	NT	± (MF)
Anti-A	0	4+	± (MF)	± (MF)	NT	± (MF)
Anti-A1	0	4+	0	0	NT	0
Anti-B	0	0	0	0	NT	0
Rh blood group (peripheral blood)						
C	0	0	0	0	NT	0
c	4+	4+	4+	4+	NT	4+
D	4+	0	4+	4+	NT	4+
E	4+	0	4+	4+	NT	4+
e	4+	4+	4+	4+	NT	4+
STR (marrow)						
D3s1358	15, 18	15, 18	15, 18	15, 18	15, 18	15, 18
VWA	14, 16	17	14, 16	14, 16	14, 16, 17	14, 16
FGA	22	22	22	22	NE	22
TH01	6, 7	9, 9.3	6, 7	6, 7	9, 9.3	6, 7
TPOX	8, 11	9, 12	8, 11	8, 11	NE	8, 11
CSF1P0	12	10, 11	12	12	12	12
D5S818	11, 13	12, 13	11, 13	11, 13	11, 13	11, 13
D13S317	8, 13	8, 12	8, 13	8, 13	NE	8, 13
D7S820	8, 9	10	8, 9	8, 9	NE	8, 9
Amelogenin	XX	XY	XX	XX	XY	XX

* 4+ = agglutination score.

† MF = mixed field.

‡ NE = not evaluable.

absence of mixed chimerism in the patient after BMT was confirmed also by studying the amelogenin gene located on the sex chromosome.

At 2 years 8 months after BMT, the immunohematologic features were stable. We studied erythroid precursors obtained by cell sorting from marrow, with anti-glycophorin A MoAb. The enriched erythroblastic population was studied by STR, and mixed chimerism was shown at three loci (vWA, TH01, and amelogenin), whereas in the other two evaluable and discriminatory loci, the allele pattern was that of the donor only.

At 3 years after BMT the pattern was unchanged. The patient remains in complete remission with limited chronic GVHD, which was first diagnosed on Day 134.

Mixed erythrocyte chimerism has been described previously in BMT recipients. In our case, the absence of development of anti-D could indicate that the immune system converted completely to donor's group O, whereas a hematopoietic group A clone persisted after BMT for a long time. In patients who received transplantation for severe combined immunodeficiency, erythrocyte chimerism was linked to a failure of engraftment of donor pluripotent PBPCs or to a differentiation of PBPCs along the erythroid lineage.³ In a case similar to ours, persistently weak group A reactivity was found 3.5 years after a group O marrow transplant in a group A patient.⁴ The authors proposed that the recipient residual serum A transferase attached the *N*-acetylgalactosamine to substance H on the RBC membrane to form blood group substance A.

By studying the enriched erythroblastic precursor population, we were able to demonstrate that mixed chimerism was due to a persistent clone of recipient's RBC precursors. This case, as has been seen with studies on lymphocytes,⁵ underlines the limitation of assaying for chimerism with a whole-blood sample compared to enriched RBCs.

Silvia Manfroi, MD

Immunohematology and Transfusion Service

Andrea Bontadini, MD

Immunohematology and Transfusion Service

Francesca Bonifazi, MD

Institute of Hematology

Giuseppe Bandini, MD

Institute of Hematology

Roberto Conte, MD

Immunohematology and Transfusion Service

S. Orsola-Malpighi Hospital

Bologna, Italy

E-mail: immunogeneticasmt@orsola-malpighi.med.unibo.it

REFERENCES

1. de Weger RA, Tilanus MG, Scheidel KC, van den Tweel JG, Verdonck LF. Monitoring of residual disease and guided donor leucocyte infusion after allogeneic bone marrow

transplantation by chimerism analysis with short tandem repeat. *Br J Haematol* 2000;110:647-53.

2. Anan K, Suzuki H, Iwasaki M, Koboyashi K. Genomic analysis of ABO chimeras and mosaics using hematopoietic colony-derived DNA. *Transfusion* 1999;39:1247-55.
3. Brady KA, Cowan MJ, Leavitt AD. Circulating red cells usually remain of host origin after bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. *Transfusion* 1996;36:314-7.
4. Wichmann MG, Haerlach T, Suttrop M, Zhang Y, Neppert J. Can blood group O red cells of donor origin acquire weak group A reactivity through serum A transferase of the recipient after bone marrow transplantation? *Infusionsther Transfusionsmed* 1996;23:29-31.
5. Winiarski J, Gustafsson A, Wester D, Dalianis T. Follow-up of chimerism, including T- and B-lymphocytes and granulocytes in children more than one year after allogeneic bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant* 2000;4:132-9.

PLT transfusions from D+ blood donors to D- patients with hematologic diseases: an update

We update the results of our previously published study of the risk of alloimmunization after PLT transfusions from D+ blood donors to D- patients with hematologic diseases.¹ In that report, the median follow-up of patients after transfusion was only 8 weeks. After 2 additional years of study, we now extend our median follow-up to 15.5 weeks.

Between April 1999 and July 2003, 8581 patients on our service received transfusions, of whom 1344 (15.7%) were D-. Seventy-six (5.7%) D- patients received PLT transfusions and 36 (47.4%) had a hematologic disease. Of these, 4 (11.1%) received D- (matched) PLT transfusions and 32 (88.9%) received D+ (mismatched) PLT transfusions. There were 21 men and 11 women with a median age of 56.5 years (range, 6-80 years). Seventeen of these patients (53.1%) had acute leukemia; 9 (28.1%), non-Hodgkin's lymphoma; 3 (9.4%), myelodysplastic syndromes; 2 (6.3%), chronic myelogenous leukemia in blast crisis; and 1 (3.1%), multiple myeloma. Twenty-nine (90.6%) patients received chemotherapy and 8 (25%) patients underwent autologous PBPC transplantation.

The patients received 284 pooled PLT transfusions, and 210 (73.9%) of these PLT units were D-mismatched. Of the D-mismatched PLT units, 178 (84.8%) were ABO-compatible (major and minor). Major ABO mismatch was present in 19 (9.0%) D-mismatched PLT transfusions and minor ABO mismatch was present in 12 (5.7%). ABO mismatch (major and minor) was present in 1 (0.5%) D-mismatched PLT transfusion.

By July 2003, 12 (37.5%) patients had expired after a

median follow-up of 15.5 weeks (range, 1-96 weeks). Twenty patients were alive after a median follow-up of 13.5 weeks (range, 1-175 weeks). None of the 32 patients with hematologic diseases developed anti-D after a median follow-up of 15.5 weeks (range, 1-175 weeks). These results confirm our previous finding of a low risk of alloimmunization in D- hematologic patients who received transfusion with PLTs from D+ blood donors. Randomized, well-defined, and well-conducted studies are necessary to clearly define guidelines for this still unresolved aspect of PLT transfusion therapy.

Joan Cid, MD

Center de Transfusió i Banc de Teixits
Passeig Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona, Spain
e-mail: jcid@vhebron.net

REFERENCE

1. Cid J, Ortin X, Elies E, et al. Absence of anti-D alloimmunization in hematologic patients after D-incompatible platelet transfusions. *Transfusion* 2002;42:173-6.

Identification of two new single-nucleotide polymorphisms in FUT3 associated with the Lewis-null phenotype

Like ABH and other carbohydrate antigens, the synthesis and expression of Lewis blood group antigens requires sequential action of multiple glycosyltransferases. Two distinct fucosyltransferases ultimately determine Le^a and Le^b expression: Lewis or FUT3, an α 1,3/4-fucosyltransferase required for both Le^a and Le^b synthesis, and Secretor (FUT2), an α 1,2-fucosyltransferase required for Le^b and type 1 chain ABH synthesis. Mutations in FUT3 gene result in the Lewis-null phenotype (le).¹

To date, 10 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in FUT3 have been published, of which 7 are known to disrupt enzyme activity or Golgi retention (Fig. 1).¹⁻⁴ Indi-

vidual FUT3 SNPs are typically paired, resulting in multiple le alleles containing two or more mutations, which often differ in frequency between ethnic and geographic populations.¹ In the US, mutations at nucleotides (nts) 202, 314 (le^{202,314}), 59, 508, and 1067 (le^{59,508} and le^{59,1067}) are common, with the le^{202,314} allele accounting for 60 percent of all Le(a-b-) phenotypes in whites.² Among South African blacks and Asians, le^{59,508} and le^{59,1067} are the predominant le alleles (30%-40%), whereas le^{202,314} is relatively uncommon.^{3,4} Five additional FUT3 SNPs (C304>A, G370>T, G484>A, G667>A, and 808>A) were recently identified among South African Xhosa, leading to two new Le (Le³⁰⁴ and Le³⁷⁰) and three le alleles (le^{484,667}, le^{202,314,484}, and le^{484,667,808}).⁴ We now report the identification of two new FUT3 SNPs, associated with up to six variant African le alleles, in African Americans.

Whole-blood samples from group O volunteer donors were a gift of T. Copeland (Immucor, Norcross, GA). Washed RBCs were serologically typed for Lewis antigens with monoclonal anti-Le^a and anti-Le^b according to the manufacturer's instructions (Gamma Biologicals, Houston, TX). Genomic DNA was isolated from a total of 15 Le(a-b-), 5 Le(a+b-), and 5 Le(a-b+) donors (Gentra Systems, Minneapolis, MN). Primers for both PCR amplification and sequencing were designed to amplify FUT3 exon 3, which contains the protein-coding region (forward primer, 5'-GTGAGGTCCCAGGTAAGAGAGAG-3'; reverse primer, 5'-AATAGCAGCTCCTCTCAGGACTC-3'). PCR was performed for 30 cycles to yield a 1291-bp product, which was isolated by gel electrophoresis, followed by direct sequencing PCR with the same primers. DNA sequence data were analyzed with the target gene sequence in GenBank as a reference (Accession Numbers NT_011255, AF131913, and U27326).

As shown in Table 1, nine SNPs were identified, including two new SNPs at nts 13G>A and 1022G>T. A 10th SNP was also observed at nt 61 (61G>A), which was silent. No mutations were observed at nts 304, 370, or 808.⁴ The 13G>A mutation was present in 50 percent of Lewis-null individuals in conjunction with mutations at nts 484 and 667 ($p < 0.000005$; $\chi^2 = 25.11$, d.f. = 29), giving rise to three, and potentially five, new le alleles (le^{13,484}, le^{13,484,667}, le^{13,59,484,667}, le^{13,59,667}, and le^{13,59,508}), with relative frequencies ranging from 0.17 to 0.03. The G1022>T was identified in only one individual and paired with a mutations at nts 59 and 1067 (le^{59,1022,1067}). Neither 13G>A nor 1022G>T SNP were identified in Le(a+b-) and Le(a-b+) donors, including five African American persons (data not shown).

Both 13G>A and 1022G>T SNPs result in missense mutations in the translated protein (Fig. 1). The 13G>A

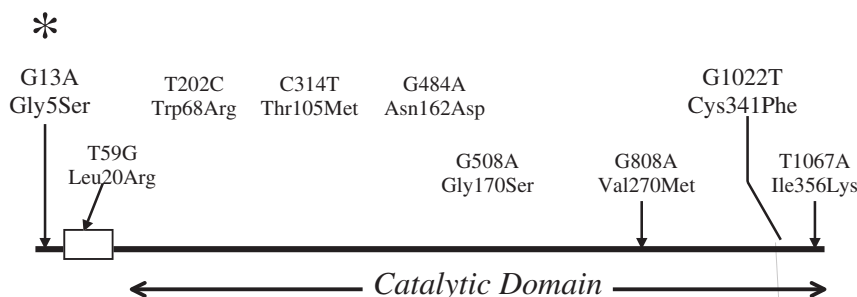


Fig. 1. Location and relationship of SNP mutations in FUT3 (Lewis). Asterisks (*) indicate the two new SNPs identified in this study.

TABLE 1. FUT3 genotype in Lewis-null donors

Sample	Race†	SNPs and amino acid changes in FUT3 (Lewis gene)*								
		G13>A Gly5Ser	T59>G Leu20Arg	T202>C Trp68Arg	C314>T Thr105Met	G484>A Asn162Asp	G508>A Gly170Ser	G667>A Gly223Arg	G1022>T Cys341Phe	T1067>A Ile356Lys
S12	U	WT	++	WT	WT	WT	++	WT	WT	WT
S18	B	+	++	WT	+	+	+	+	WT	WT
S19	B	+	++	WT	+	+	+	+	WT	WT
S20	U	+	++	WT	+	+	WT	+	WT	WT
S43	B	WT	+	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
S45	W	WT	WT	++	++	WT	WT	WT	WT	WT
S47	B	WT	++	WT	+	WT	WT	WT	+	++
W3	U	+	WT	+	+	+	WT	+	WT	WT
W6	U	++	WT	WT	WT	++	WT	+	WT	WT
W7	U	+	WT	WT	WT	+	WT	+	WT	WT
W13	B	+	WT	WT	WT	+	WT	+	WT	WT
W14	U	+	WT	WT	WT	+	WT	+	WT	WT
W15	U	WT	++	WT	WT	WT	++	WT	WT	WT
W16	U	WT	++	WT	WT	WT	++	WT	WT	WT
W21	B	WT	++	WT	WT	WT	++	WT	WT	WT
Heterozygous		7	1	1	5	7	2	8	1	0
Homozygous		1	8	1	1	1	4	0	0	1
Total alleles		9	17	3	7	9	10	8	1	2

* WT = wild type or no mutation; + = heterozygous; ++ = homozygous.

† B = African American black; W = white; U = unknown.

polymorphism results in a Gly5Ser substitution within the cytoplasmic domain of the enzyme. Although the latter is unlikely to effect enzyme activity, serine residues have been shown to modulate sialyltransferase activity via post-translational phosphorylation.⁵ In contrast, the G1022>T mutation, resulting in a Cys341Phe in the catalytic domain of the molecule, is probably an enzyme-inactivating mutation. The mutation lies just proximal to the mutation at Ile356Lys, which has been shown to inactivate Lewis enzyme activity.¹ Furthermore, the loss of a cysteine residue, particularly within the catalytic domain, could profoundly affect enzyme activity and tertiary structure owing to a theoretical loss of disulfide bonds.

In summary, we have identified two new FUT3 SNPs and four to six new *le* alleles in *le*(a-b-) African Americans. The G13>A is linked to mutations common in native Africans (G484>A, G667>A) and may represent a western variant of African *le* alleles.⁴ Given the ethnic diversity in the US, these results illustrate the difficulty in the use of only restriction enzyme or allele-specific PCR methods for Lewis genotyping.^{2,3}

Laura Cooling, MD, MS

Department of Pathology

University of Michigan

Ann Arbor, MI

E-mail: lcooling@med.umich.edu

Yuan Gu, MD, MPh

Department of Epidemiology

Tongji University

Wuhan, China

REFERENCES

1. Spitalnik PF, Spitalnik SL. Human carbohydrate blood group systems. In: Dzik WH, Snyder EL, Stowell CP, Strauss RG, editors. Rossi's principles of transfusion medicine. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002:92-110.
2. Salomaa V, Pankow J, Heiss G, et al. Genetic background of Lewis negative blood group phenotype and its association with atherosclerotic disease in the NHLBI family heart study. *J Int Med* 2000;247:689-98.
3. Liu TC, Chang JG, Lin SF, et al. Lewis (FUT3) genotypes in Taiwanese, Thai, and Filipino populations. *Ann Hematol* 2000;79:599-603.
4. Pang H, Liu Y, Koda Y, et al. Five novel missense mutations of the Lewis gene (FUT3) in African (Xhosa) and Caucasian populations in South Africa. *Hum Genet* 1998;102: 675-80.
5. Gu X, Preuss U, Gu T, Yu RK. Regulation of sialyltransferase activities by phosphorylation and dephosphorylation. *J Neurochem* 1995;64:2295-302.

Role of the Hct in the treatment of thrombocytopenic patients

This letter is written to comment on the publication of Heddle and associates.¹ This article reviewed the clinical measures that have been used to assess the nonsurgical bleeding diathesis in anemic thrombocytopenic patients with hematologic and oncologic disorders who received

prophylactic transfusion of allogeneic PLTs to maintain PLT counts ranging from 5,000 to 20,000 per μL .

The authors do not report the quality of the allogeneic prophylactic PLTs that were transfused, the Hct values of the patients before the prophylactic transfusion, the occurrence of PLT refractoriness, and the indications for RBC transfusion that were administered to these patients.

The viability and function of the allogeneic compatible PLTs and the Hct of the patients at the time of the prophylactic transfusion are important factors that may influence the bleeding disorder in these thrombocytopenic patients. Allogeneic previously frozen washed PLTs have been shown to be more effective in reducing nonsurgical blood loss and reducing the need for allogeneic RBCs and FFP after cardiopulmonary bypass surgery than liquid-preserved PLTs stored at 22°C for a mean of 3.4 days.²

In our studies of patients subjected to cardiopulmonary bypass surgery, blood loss was measured intraoperatively after neutralization of the heparin and postoperatively during the 24-hour postoperative period. In our study the blood loss not related to surgical causes, referred to as nonsurgical blood loss, was associated with an increase in the bleeding time and a decrease in the Hct 2 hours after cardiopulmonary bypass surgery.³ The transfusion of allogeneic RBCs in anemic thrombocytopenic patients after cardiopulmonary bypass surgery to a Hct of 35 vol percent reduced the nonsurgical blood loss and reduced the need for allogeneic PLTs and FFP.

Several investigators have reported that RBCs have an important hemostatic effect and that the RBC and PLT interactions in vivo reduce the bleeding time.⁴⁻⁶ Clinical studies in anemic uremic patients have shown that increasing the Hct with either RBC transfusion or EPO corrects the prolonged bleeding time and reduces the bleeding diathesis observed in these patients.⁷⁻⁹ In addition, treatment with EPO or RBCs to correct anemia in uremic patients has been shown to improve PLT function.

Blajchman and associates¹⁰ evaluated the effect of the Hct on the bleeding time in both normal and thrombocytopenic rabbits. Nonthrombocytopenic rabbits with Hct levels above 35 percent had significantly shorter bleeding times than rabbits with Hct values lower than 35 percent. These investigators reported that anemia contributed significantly to the prolonged bleeding time in both thrombocytopenic and nonthrombocytopenic rabbits and that RBC transfusions were capable of shortening the bleeding time.

RBCs have been shown to have a beneficial effect on PLT function. By dispersing PLTs from the center of the blood vessel toward the vessel wall, RBCs concentrate PLTs near the endothelial cells of the vessel wall where they are poised to respond to injury. Several studies by Valles and associates¹¹ have reported that RBCs are prothrombotic and activate PLTs. Allogeneic compatible PLTs produce only a transient increase in PLT count because of their

short life span, whereas the allogeneic compatible RBCs produce a prolonged effect on the Hct value because of their long life span.

Studies are needed to determine how both the PLT count and the Hct affect hemostasis in thrombocytopenic and anemic patients with hematologic and oncologic disorders. RBC transfusions may prove to be safer and cheaper than prophylactic PLT transfusions to minimize the bleeding diathesis in these patients.

C. Robert Valeri, MD

*Naval Blood Research Laboratory
Boston University School of Medicine
Boston, Massachusetts*

Shukri Khuri, MD

*VA Boston Healthcare System
Boston, Massachusetts*

Gina Ragno, BA

*Naval Blood Research Laboratory
Boston University School of Medicine
Boston, Massachusetts*

REFERENCES

1. Heddle NM, Cook RJ, Webert KE, Sigouin C, Rebulla P. Methodologic issues on the use of bleeding as an outcome in transfusion medicine studies. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society for Blood Transfusion. *Transfusion* 2003;43:742-52.
2. Khuri SF, Healey N, MacGregor H, et al. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:172-84.
3. Khuri SF, Josa M, Assousa SN, et al. Hematologic changes during and following cardiopulmonary bypass and their relationship to non-surgical blood loss. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:94-107.
4. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. *JAMA* 1910;60:1185-92.
5. Hellem AJ, Borchgrevink CF, Ames SB. The role of red cells in hemostasis: the relation between the hematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Hematol* 1961;7:42-50.
6. Valeri CR, Cassidy G, Pivacek LE, et al. Anemia-induced increase in the bleeding time: implications for treatment of non-surgical blood loss. *Transfusion* 2001;41:977-83.
7. Livio M, Gotti E, Marchesi D, et al. Uremic bleeding: role of anemia and beneficial effect of red cell transfusions. *Lancet* 1982;2:1013-5.
8. Fernandez F, Goudable C, Sie P, et al. Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusions. *Br J Haematol* 1985;59:139-48.
9. Moia A, Mannucci PM, Vizzotto L, et al. Improvement in the haemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* 1987;2:1227-9.

10. Blajchman MA, Bordin JO, Bardossy L, Heddle NM. The contribution of the hematocrit to thrombocytopenic bleeding in experimental animals. *Br J Haematol* 1994;86:347-50.
11. Valles J, Santos MT, Aznar J, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood* 2002;99:3978-84.

The above letter was sent to Heddle et al.: Dr Heddle offered the following reply.

We thank Dr Valeri and colleagues for their letter and for raising some interesting points for discussion. It is important to emphasize that the purpose of our article was to explore methodologic issues when using bleeding as an outcome measure. To find examples of the different ways that bleeding had been analyzed, we identified studies in the literature that used bleeding as an outcome measure. The goal of this review was not to summarize the results of the studies but to review and critique the methods used. Although it would have been relevant for the authors of the original studies to provide information about the "quality of the allogeneic prophylactic PLTs that were transfused, the Hct values of the patients before the prophylactic transfusion," the occurrence of PLT refractoriness, the indications for the RBC transfusions, and any other factors that might have an effect on the frequency or severity of bleeding, this information was not relevant to our discussion of the measurement and analysis of bleeding and in many cases was not reported in the original articles.

Nevertheless, Dr Valeri and colleagues have emphasized several important observations that have been reported in the literature and may be the key to understanding a complex interaction between physiologic factors that contribute to an increased risk of bleeding in some patients. It is likely that there are many factors that increase bleeding risk of both thrombocytopenic and nonthrombocytopenic patients. These risk factors likely include Hct as well as other factors such as uremia, hypoalbuminemia, recent BMT, and recent hemorrhage.¹ Further studies are needed to examine the effects of these or other factors on the frequency and severity of bleeding as well as intervention (treatment) studies that could influence the frequency of these events. If and when these studies are performed there must be careful consideration given to the methodologic issues involved when bleeding is used as the outcome measure. Our article was designed to identify and describe these methodologic considerations.

We agree with Valeri and colleagues that "studies are needed to determine how both the PLT count and the

Hct affect hemostasis in thrombocytopenic and anemic patients with hematologic and oncologic disorders." In fact, several of the authors (N.H., R.C., K.W.) are investigators in a pilot clinical trial designed to investigate the effect of Hct on the frequency of bleeding in anemic, thrombocytopenic patients. Well-designed studies of this nature will provide evidence to guide the practice of RBC and PLT transfusions in these patients. Only when data from these studies are available will we know whether Dr Valeri and colleague's hypothesis is correct.

Nancy M. Heddle, MSc, FCSMLS(D)

e-mail: heddlen@mcmaster.ca

Kathryn E. Webert, MD

Richard Cook, PhD

Chris Sigouin, PhD(c)

Paolo Rebulla, MD

Department of Pathology

McMaster University

Hamilton, Ontario, Canada

REFERENCE

1. Friedman AM, Sengul H, Lehmann H, et al. Do basic laboratory tests or clinical observations predict bleeding in thrombocytopenic oncology patients? A re-evaluation of prophylactic platelet transfusions. *Transfus Med Rev* 2002;16:34-45.

HBV DNA in plasma pools for fractionation

We tested for HBV DNA by NAT in 200 archived plasma pools for fractionation that had been sent to our institute for laboratory testing. We present the following findings as indirect evidence of the residual risk of transfusion-transmitted HBV infection and of the potential for decreasing the risk by testing for HBV DNA by NAT.

Sixty of the plasma pools originated in the US and 140 were from Italy. Pool sizes ranged from 2000 to 4000 individual collections. Samples from all pools had previously tested negative by the Institute's standard assays for HBsAg, HCV RNA, anti-HIV, and anti-HCV. HBV DNA NAT was performed with two different assays, an in-house method, and an HBV detection test (COBAS Ampliscreen, Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ). Both methods were validated by the WHO HBV DNA (97/746) International Standard (genotype A, subtype HBsAg *adw2*). In compliance with European guidelines for NAT validation,¹ we tested four series of six half-log dilutions, ranging from 316 to 0.316 IU per mL, in six independent assays, obtaining a total of 24 results for each dilution. The detection limit (95% cutoff) for each NAT method was calculated by probit analysis (SPSS Version 11.0.1, SPSS Italia, Milan, Italy) (Fig. 1).

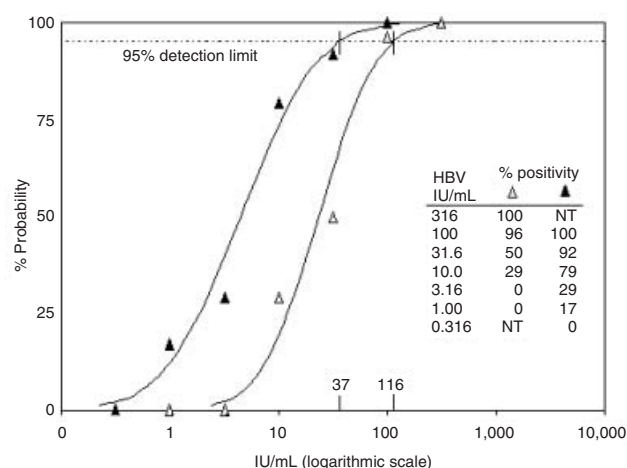


Fig. 1. Probability of detecting HBV DNA at different concentrations with the in-house method (Δ) or the COBAS Ampliscreen HBV test ($\blacktriangle$). Concentrations represent half-log dilutions and rates of positive reactions (%). The 95 percent cutoff was 116 IU per mL for the in-house method and 37 IU per mL for the COBAS Ampliscreen HBV test. The 95 percent CIs were 73 to 257 and 21 to 95, respectively.

With our in-house NAT method, we detected HBV DNA in 2 of 200 pools (1%), 1 pool from Italy and 1 from the US. Both pools tested negative when diluted 1:10, reflecting very low viral loads. Amplification was conducted with primers targeting the S region of the HBV genome (nucleotides 256-279 and 540-561 for the outer primers and nucleotides 303-324 and 516-537 for the inner primers). Although this region is not the most conserved, it has the advantage of detecting possible HBsAg escape mutants. Sequence analysis of the first round of amplification of the two positive samples allowed us to exclude such viral mutants. The HBV+ samples were identified to be genotype A, subtypes *ayr* (US pool) and *adr* (Italian pool).²

With the COBAS Ampliscreen HBV test, we confirmed the presence of HBV DNA in the same two pools and in no others. Having excluded the presence of HBV mutants, we interpret these results to reflect blood collections during the early HBV-seronegative window period or deviations from good laboratory practice at blood centers.

Our finding that 1 percent of plasma pools tested positive for the presence of HBV DNA provides indirect evidence of the residual risk of HBV infectivity in donated blood. Although this risk is a serious concern for the transfusion of blood components, plasma derivatives do not appear to be at risk of transmitting HBV.³ Adding NAT to current laboratory testing has the potential for detecting residual HBV infectivity in pools of plasma for fractionation.

Giulio Pisani, PhD
Karen Cristiano, PhD
Guillermo M. Bisso, PhD

Maria Wirz, PhD
Claudio Mele, AS
Giuliano Gentili, PhD
Laboratory of Immunology
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena, 299
00161 Rome, Italy

REFERENCES

- Guidelines for validation of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in plasma pools (Internet). PA/PH/OMCL (98), DEF. Available from: <http://www.health.gov.au/tga/docs/pdf/euguide/edqm/ocabr06.pdf>
- Okamoto H, Imai M, Tsuda F, et al. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987;61:3030-4.
- Tabor E. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1. *Transfusion* 1999;39:1160-8.

Human herpesvirus type 8 among Brazilian blood donors

The seroprevalence of human herpesvirus type 8 (HHV-8) varies considerably among blood donor populations in different geographic regions. Caterino-de-Araujo and coworkers¹ detected antibodies to latent nuclear HHV-8 antigens among 7.4 percent of blood donors in Brazil, but there are no studies evaluating HHV-8 DNA among Brazilian blood donors. HHV-8 DNA was detected among 22.5 percent of 49 blood donors in Central Africa,² but not among 100 blood donors in southeastern Texas where there is a relatively high (23%) seroprevalence of HHV-8.³ We report the results of testing for HHV-8 antibodies and HHV-8 DNA among 400 randomly selected donors from a large public blood center in São Paulo, Brazil.

Samples were tested for antibodies against HHV-8 by indirect immunofluorescent assay.⁴ Antibodies against HHV-8 lytic or latent antigens were detected in 4 percent (16/400), and only 0.5 percent (2/400) had detectable antibodies to both antigens. A chi-square test of linear trend analysis was computed to evaluate the association of age, sex, and educational status, independently, with HHV-8 infection. ORs were calculated with 95 percent CIs using computer software (Epi Info, Version 6.4, CDC, Atlanta, GA). The presence of HHV-8 antibody was associated with female sex (Table 1).

TABLE 1. Distribution of blood donors reactive to HHV-8 antigens (latent or lytic) according to demographic characteristics

Characteristics	Number	Reactive samples to HHV-8 antigens (latent or lytic)			p value
		Number (%)	OR	95% CI	
Age (years)					
18-29	183	8 (4.3)	1.00		
30-39	128	5 (3.9)	0.89	0.22-3.17	
40-49	55	1 (1.8)	0.41	0.01-3.15	
Over 50	34	2 (6.5)	1.37	0.14-7.29	p trend = 0.9
Gender					
Male	220	4 (1.8)	1.00		
Female	180	12 (6.7)	3.86	1.14-16.65	p = 0.012
Educational status					
Incomplete high school	118	6 (5.1)	1.00		
Complete high school	191	7 (3.7)	0.71	0.20-2.63	
College graduate	91	3 (3.3)	0.64	0.10-3.09	p trend = 0.5
Total	400	16 (4.0)		2.30-6.41	

The 16 HHV-8-seroreactive blood donors were also tested for HHV-8 DNA in plasma and PBMCs using nested PCR.² The outer primers were KS1 5'-AGCCGAAAGGATTC CACCAT-3' and KS2 5'-TCCGTGTTGTCTACGTCCAG-3', and the inner primers were WH-KS-1 5'-GTGCTCGAATC CAACGGATT-3' and WH-KS-2 5'-ATGACACATTGGTGG TATAT-3'. PCR detection sensitivity was evaluated by serial dilutions of a DNA standard containing a known quantity of HHV-8 DNA and was able to detect fewer than five copies of HHV-8 genome in a background of 200,000 human cells. HHV-8 DNA was detected in plasma and PBMCs of 1 of the 400 (0.25%) donors who also had antibodies to both latent and lytic antigens. Our finding of HHV-8 DNA in our blood donor population indicates that HHV-8 is likely to be transmitted by blood transfusions in this region.

Suzete Ferreira, MSc
Sabri Sanabani, MSc

Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo
São Paulo, Brazil

Alexandra D. Reis, MSc
Instituto de Medicina Tropical
University of São Paulo
São Paulo, Brazil

Dalton F. Chamone, MD, PhD
Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de
São Paulo and
Department of Hematology
University of São Paulo
São Paulo, Brazil

Ester C. Sabino MD, PhD
Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de
São Paulo
São Paulo, Brazil
e-mail: sabinoec@uol.com.br

REFERENCES

1. Caterino-de-Araujo A, Calabro ML, de los Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1999;179: 1591-2.
2. Bélec L, Cancre N, Hallouin MC, et al. High prevalence in Central Africa of blood donors who are potentially infectious for human herpesvirus 8. *Transfusion* 1998;38: 771-5.
3. Hudnall SD, Chen T, Rady P, et al. Human herpesvirus 8 seroprevalence and viral load in healthy adult blood donors. *Transfusion* 2003;43:85-90.
4. Gao SJ, Kingsley L, Li M, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 1996;2:925-8. ■

SUBMISSION OF LETTERS

Instructions for submission of letters can be found in the Detailed Instructions for Authors published on pages 128 to 133 of the January issue. Submit letters to:

S. Gerald Sandler, MD

Department of Laboratory Medicine/M-1306
 Georgetown University Hospital
 3800 Reservoir Road, NW, Washington, DC 20007
 fax (202) 444-2440
 e-mail: sandlrg@gunet.georgetown.edu

EDITOR'S NOTE: To permit timely publication of correspondence, the references have not been verified as they are for articles appearing in **TRANSFUSION**, and, therefore, the accuracy of references cited in Letters to the Editor is the sole responsibility of the authors. Payment is not required for submission of Letters to the Editor.

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](#)