

Daniela Teixeira

Otimização de técnica de PCR em tempo real para detecção das regiões *pol* e *env* dos subtipos B e F de HIV-1 e triagem dos seus recombinantes

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Daniela Teixeira

Otimização de técnica de PCR em tempo real para detecção das regiões *pol* e *env* dos subtipos B e F de HIV-1 e triagem dos seus recombinantes

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Co-orientadoras: Dra. Patrícia Munerato

Dra. Maria Cecilia Araripe Sucupira

Dra. Shirley C. Vasconcelos Komninakis

São Paulo

2009

TEIXEIRA, Daniela

Otimização de técnica de PCR em tempo real para detecção das regiões *pol* e *env* dos subtipos B e F de HIV-1 e triagem de seus recombinantes.

Daniela Teixeira – São Paulo, 2009

120f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Título em Inglês: **Development of Real Time PCR to detect *pol* and *env* regions from HIV-1 subtypes B and F and screening of B/F recombinant strains.**

1. HIV-1 2. Diversidade Genética 3. Subtipos 4. PCR em tempo real

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Retrovirologia da Disciplina de Infectologia e Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (CEP 0641/08). O desenvolvimento deste projeto foi possível graças ao apoio financeiro relacionado ao projeto temático (processo de número 2004/15856-9) e à bolsa de mestrado (processo de número 2006/52722-6), aprovados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e também graças à autorização concedida pela Unidade de Laboratório (ULAB) do Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde a se trabalhar com as amostras da Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO).

Ao meu pai, Domingos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente àqueles que tornaram este trabalho possível...

Ao meu orientador, Dr. Ricardo, pela confiança e liberdade que me cedeu para o desenvolvimento deste estudo e meu próprio.

A minha co-orientadora Cecília, pelo carinhoso cuidado e prontidão exata em me socorrer nos momentos em que precisei, sempre com urgência e êxito.

A minha co-orientadora Shirley, pelo incentivo científico e auxílio quando solicitado.

A minha co-orientadora Patrícia, por minha literal iniciação científica e por ser sempre um exemplo venerável para mim.

Ao Laboratório do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro, chefiado pelos Drs. Amílcar Tanuri e Rodrigo Brindeiro, em especial ao pesquisador Alexandre Calazans, pela hospitalidade e proveitoso treinamento em Laboratório de Nível de Biossegurança 3.

Ao Laboratório da Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo, em especial à pesquisadora Eliana Nogueira, por disponibilizar o equipamento de PCR em tempo real presente neste laboratório quando necessário.

Na minha vida, agradeço a todos os exemplos que tive a seguir...

A meu pai, exemplo de sonho a perseguir, exemplo de sonho a conquistar, conquistas sempre regadas de muita emoção.

A minha mãe, que deixa marcas em tudo o que faz, com maestria, perfeição e amor.

A minha irmã Adriana, a vida vivida com intensidade, batalhas sempre vencidas com louvores.

A meu irmão Alexandre, a sagacidade e inteligência, somadas a um irresistível humor.

A meu irmão Eduardo, a lealdade personificada em um lindo homem.

A minha irmã Emanuele, a sensibilidade, que toca os mais impenetráveis, e a força, que surpreende os mais inatingíveis.

Eu simplesmente amo vocês...

Na minha vida, também agradeço a todos os presentes que recebi...

A meus cunhados, Leonardo, Marco e Márcia... Irmãos de coração, como se não me bastassem os irmãos de sangue.

A meu sobrinho Felipe, aquele que me fez crescer.

A meu sobrinho Pedro Henrique, aquele que me faz criança.

A minha família, em especial a minha avó Haydée, a minha madrinha Neyde e a meu tio Sidnei, sempre tão presentes em minha vida, sempre desejosos de meu sucesso e felicidade.

A meus grandes amigos, a quem amo, entre eles Letícia, Suzy, Samir, Vanessa, Stephanie e Letícia Accioli, que me deram o privilégio de participar de suas vidas, que sempre farão parte de minha história.

E agradeço por nunca ter estado sozinha nesta caminhada...

A Erika, presença indispensável em momentos de extrema harmonia, de trabalho intenso, de discussões filosóficas, pertinentes ou não, de confissões pessoais, de dificuldades e desespero, de amizade incondicional, de competição sadia. Mas é claro que meu café sempre foi melhor!

Ao Charlys, sempre uma luz no meu caminho, trazendo a praticidade para meu cotidiano, alegria e conforto para minha vida.

A Mariana e a Maria Clara, que me trouxeram um mundo mais puro, sincero, repleto de amor, irradiado de paz.

A Mara e ao Wancler, a assessoria administrativa mais amiga que se pode ter disponível.

A todos que me receberam quando ingressei ao Laboratório de Retrovirologia, aos velhos de casa e aos novos ingressos, pelas experiências compartilhadas, ensinamentos transmitidos, companhias essenciais. Neste grupo, sei que encontrei grandes professores e amigos.

Aos novos amigos por tão pouco terem me acolhido, me aceitado e entendido as dificuldades por mim encontradas, seja me socorrendo, seja me incentivando, seja apenas compreendendo. Obrigada, Professora Ieda. Obrigada, Juliana, Carla e Mayari.

A meu querido Felipe, um companheiro em sua mais perfeita idealização, paciente nos momentos em que é necessária compreensão, amigo e ouvinte nos momentos árdusos e, sempre, sempre doador de um intenso amor que preenche minha vida, que é força e luz para meu caminho.

E, por fim, a família que ganhei com ele, que me acolheu com muito carinho, em especial a meus sogros Vera e Anísio pelo amor e atenção dignos de uma filha.

Não poderia esquecer da Nina, testemunha de momentos de reflexão, exímia companheira em seu silêncio.

“Disciplina é liberdade. Compaixão é fortaleza. Ter bondade é ter coragem. (R. R.)”

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico.....	1
1.2. Epidemiologia.....	2
1.3. Características Estruturais do HIV-1.....	4
1.4. Organização Genômica do HIV-1.....	5
1.5. Ciclo Replicativo.....	6
1.6. A Diversidade do HIV-1.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Cultura de células e isolados virais.....	14
3.1.1. Células.....	14
3.1.2. Isolados Virais.....	14
3.1.3. Obtenção de estoque viral.....	14
3.1.3.1. Infecção de células MT-4.....	14
3.1.3.2. Co-infecção de culturas de células MT-4 pelos vírus BZ167 e BR020.....	14
3.1.3.3. Ensaio de CCID ₅₀	15
3.2. Quantificação de referência.....	16
3.3. Padronização da técnica de PCR em tempo real para detecção dos subtipos B e F de HIV-1 e triagem de seus recombinantes.....	16
3.3.1 Regiões genômicas, iniciadores (<i>primers</i>) e sondas escolhidos.....	16
3.3.2. Curva de calibração.....	17
3.3.2.1. Extração de RNA viral.....	17
3.3.2.2. Obtenção de DNA complementar (cDNA).....	17
3.3.2.3. Reação com o sistema TaqMan®.....	17
3.3.2.4. Cálculo de eficiência e reprodutibilidade.....	19
3.3.3. Reações de especificidade.....	20
3.3.4. Reação com SYBR Green®.....	21
3.3.5. Ensaio de PCR em tempo real para sobrenadante de co-cultivo.....	22
3.3.6. Análise de resultados.....	22

3.4.	Validação dos sistemas desenvolvidos com amostras clínicas (testes futuros).....	22
3.4.1.	Casuística.....	22
3.4.2.	Extração de RNA viral das amostras clínicas.....	22
3.4.3.	Obtenção de cDNA.....	23
3.4.4.	Ensaio futuro de PCR em tempo real para amostras clínicas.....	23
3.4.5.	Amplificação e seqüenciamento de amostras clínicas nas regiões escolhidas para o uso da PCR em tempo real	23
3.4.6.	Purificação de produto de PCR.....	26
3.4.7.	Eletroforese em gel de agarose.....	27
3.4.8.	Reação de seqüenciamento.....	27
3.4.9.	Análise filogenética.....	27
4.	RESULTADOS	29
4.1.	Cálculo de CCID ₅₀ (<i>Cell Culture Inhibitory Dose</i>)	29
4.2.	Quantificação de referência.....	29
4.3.	Padronização da técnica de PCR em tempo real para detecção dos subtipos B e F de HIV-1 e triagem de seus recombinantes.....	30
4.3.1.	Regiões genômicas escolhidas.....	30
4.3.2.	<i>Primers</i> e sondas escolhidos.....	32
4.3.3.	Ensaio de PCR em tempo real.....	55
4.3.3.1.	Curva de calibração.....	55
4.3.3.2.	Reações de especificidade.....	72
4.3.3.3.	Ensaio de PCR em tempo real para sobrenadante de co-cultivo.....	76
4.4.	Validação dos sistemas desenvolvidos com amostras clínicas (testes futuros)	80
5.	DISCUSSÃO	105
6.	CONCLUSÃO	113
7.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Figura esquemática do genoma do HIV-1 e seus produtos, tendo suas posições indicadas na figura esquemática da partícula viral.....	6
Figura 2: A. Figura esquemática representando o genoma de HIV-1. B. Figura esquemática do seqüenciamento completo das estruturas recombinantes brasileiras.....	31
Figura 3: Destaque das regiões potencialmente capazes de detectar e diferenciar as CRF brasileiras 28 e 29: I – protease (<i>pol</i>); II – envelope; III – transcriptase reversa (<i>pol</i>); IV – integrase (<i>pol</i>).....	32
Figura 4: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da protease (<i>pol</i>).....	33
Figura 5: Alinhamento de seqüências da região da protease (<i>pol</i>) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados para este sistema.....	34
Figura 6: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da transcriptase reversa (<i>pol</i>).....	37
Figura 7: Alinhamento de seqüências da região da transcriptase reversa (<i>pol</i>) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema.....	38
Figura 8: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da integrase (<i>pol</i>).....	42
Figura 9: Alinhamento de seqüências da região da integrase (<i>pol</i>) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência	

dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema.....	43
Figura 10: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da gp120 (<i>env</i>).....	47
Figura 11: Alinhamento de seqüências da região da gp120 (<i>env</i>) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema.....	48
Figura 12: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da gp41 (<i>env</i>).....	51
Figura 13: Alinhamento de seqüências da região da gp41 (<i>env</i>) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos <i>primers</i> e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema.....	52
Figura 14: Classificação Filogenética para a região da protease (gene <i>pol</i>) inferida por Neighbor-Joining.....	82
Figura 15: Classificação Filogenética para a região da transcriptase reversa (gene <i>pol</i>) inferida por Neighbor-Joining.....	88
Figura 16: Classificação Filogenética para a região da integrase (gene <i>pol</i>) inferida por Neighbor-Joining.....	94
Figura 17: Classificação Filogenética para a região da gp120 (gene <i>env</i>) inferida por Neighbor-Joining.....	98
Figura 18: Classificação Filogenética para a região da gp41 (gene <i>env</i>) inferida por Neighbor-Joining.....	102

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da protease do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando PROT DT e sonda específica para o subtipo B..... 56
- Gráfico 2:** Gráfico representativo da realização de 2 curvas de calibração da amplificação da região da protease do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando PROT DT e sonda específica para o subtipo F..... 57
- Gráfico 3:** Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da transcriptase reversa do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando RT DT e sonda específica para o subtipo B..... 59
- Gráfico 4:** Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da transcriptase reversa do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando RT DT e sonda específica para o subtipo F..... 61
- Gráfico 5:** Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da integrase do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando INT DT e sonda específica para o subtipo B..... 63
- Gráfico 6:** Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da integrase do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando INT DT e sonda específica para o subtipo F..... 64
- Gráfico 7:** Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da gp120 do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP120 DT e sonda específica para o subtipo B..... 66
- Gráfico 8:** Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da gp120 do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de

cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP120 DT e sonda específica para o subtipo F.....	68
Gráfico 9: Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da gp41 do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP41 DT e sonda específica para o subtipo B.....	70
Gráfico 10: Gráfico representativo da realização de 3 curvas de calibração da amplificação da região da gp41 do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP41 DT e sonda específica para o subtipo F.....	71
Gráfico 11: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com PROT DT.....	73
Gráfico 12: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com RT DT.....	73
Gráfico 13: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com INT DT.....	74
Gráfico 14: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com GP120 DT.....	75
Gráfico 15: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com GP41 DT.....	75
Gráfico 16: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com PROT DT.....	76
Gráfico 17: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com RT DT.....	77
Gráfico 18: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com INT DT.....	78
Gráfico 19: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com GP120 DT.....	79
Gráfico 20: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com GP41 DT.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação das regiões genômicas do HIV-1.....	20
Tabela 2: Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e seqüenciamento da região da gp120 (<i>env</i>) do HIV-1.....	24
Tabela 3: Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e seqüenciamento da região da gp41 (<i>env</i>) do HIV-1.....	25
Tabela 4: Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e seqüenciamento da região da integrase (<i>pol</i>) do HIV-1.....	26
Tabela 5: Descrição dos valores de CCID ₅₀ /mL obtidos para os vírus BZ167 e BR020 em células MT-4.....	29
Tabela 6: Valores obtidos para o teste de carga viral do subtipo B (BZ167) de HIV-1 em triplicata e sua média.....	29
Tabela 7: Valores obtidos para o teste de carga viral do subtipo F (BR020) de HIV-1 em triplicata e sua média.....	29
Tabela 8: Valores estimados para as diluições seriadas (1:5) dos isolados virais BZ167 e BR020, a partir da carga viral calculada para o sobrenadante coletado da cultura destes isolados.....	30
Tabela 9: PROT DT, jogo de <i>primers</i> e sondas selecionado para a região da protease (<i>pol</i>).....	33
Tabela 10: RT DT, jogo de <i>primers</i> e sondas selecionado para a região da transcriptase reversa (<i>pol</i>).....	37

Tabela 11: INT DT, jogo de <i>primers</i> e sondas selecionado para a região da integrase (<i>pol</i>).....	42
Tabela 12: GP120 DT, jogo de <i>primers</i> e sondas encontrado para a região da gp120 (<i>env</i>).....	46
Tabela 13: GP41 DT, jogo de <i>primers</i> e sondas encontrado para a região da gp41 (<i>env</i>).....	51
Tabela 14: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando PROT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	55
Tabela 15: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando PROT DT e sonda específica para subtipo B.....	56
Tabela 16: Média dos valores de Cts obtidos de dois ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando PROT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	57
Tabela 17: Cálculo do coeficiente de variação de dois ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando PROT DT e sonda específica para subtipo F.....	58
Tabela 18: Eficiência e correlação do sistema PROT DT.....	58
Tabela 19: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando RT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	59
Tabela 20: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando RT DT e sonda específica para subtipo B.....	60
Tabela 21: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de quatro pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando RT DT, e média final dos	

valores de Ct para todas as repetições.....	60
Tabela 22: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando RT DT e sonda específica para subtipo F.....	61
Tabela 23: Eficiência e correlação do sistema RT DT.....	62
Tabela 24: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando INT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	62
Tabela 25: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando INT DT e sonda específica para subtipo B.....	63
Tabela 26: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando INT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	64
Tabela 27: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando INT DT e sonda específica para subtipo F.....	65
Tabela 28: Eficiência e correlação do sistema INT DT.....	65
Tabela 29: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando GP120 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	66
Tabela 30: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando GP120 DT e sonda específica para subtipo B.....	67
Tabela 31: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando GP120 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	67

Tabela 32: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando GP120 DT e sonda específica para subtipo F.....	68
Tabela 33: Eficiência e correlação do sistema GP120 DT.....	69
Tabela 34: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando GP41 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	69
Tabela 35: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando GP41 DT e sonda específica para subtipo B.....	70
Tabela 36: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando GP41 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.....	71
Tabela 37: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando GP41 DT e sonda específica para subtipo F.....	72
Tabela 38: Eficiência e correlação do sistema GP41 DT.....	72
Tabela 39: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com PROT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	73
Tabela 40: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com RT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	74
Tabela 41: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com INT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	74
Tabela 42: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP120 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	75

Tabela 43: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP41 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	76
Tabela 44: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com PROT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	77
Tabela 45: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com RT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	78
Tabela 46: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com INT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	78
Tabela 47: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP120 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	79
Tabela 48: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP41 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.....	80

Introdução: A identificação de 42 formas recombinantes circulantes (CRF) de HIV-1, juntamente com suas inúmeras formas recombinantes únicas, evidencia ainda mais o papel da recombinação gênica para esta epidemia. No Brasil, os subtipos B, F e C co-circulam, sendo que cinco CRF entre eles foram recém descobertas. A PCR em tempo real é uma ferramenta rápida, confiável e capaz de detectar diferentes subtipos de HIV-1 e suas formas recombinantes.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas de PCR em tempo real capazes de detectar vírus dos subtipos B e F, bem como recombinantes B/F gerados por ensaios de competição *in vitro*, e, assim, obter uma ferramenta para triagem das CRF brasileiras, 28 e 29, também recombinantes B/F. No futuro, estes sistemas serão testados para discriminação de subtipos de amostras clínicas.

Metodologia: Células MT-4 foram infectadas separadamente pelos isolados virais BZ167 (subtipo B) e BR020 (subtipo F), e o sobrenadante foi coletado para otimização dos sistemas de PCR em tempo real (TaqMan[®]) desenvolvidos para detectar o subtipo de diferentes regiões genômicas, incluindo o gene *pol* (protease, transcriptase reversa, integrase) e o gene *env* (gp120 e gp41). Os *primers* desenhados deveriam amplificar igualmente o subtipo B e F; por outro lado, foram necessárias sondas subtipo-específicas capazes de detectar o subtipo presente no sobrenadante da cultura. As células MT-4 também foram co-infectadas por ambos os isolados, B e F, em iguais condições, para averiguação da possível geração de recombinantes. Para futura validação do uso destes sistemas em amostras clínicas, 157 amostras provenientes do Município de Santos, submetidas à genotipagem, foram seqüenciadas e subtipadas para as cinco regiões genômicas estudadas, utilizando o pacote Philip 3.5, sendo Neighbor-Joining o algoritmo de escolha.

Resultados: Os sistemas desenvolvidos apresentaram-se capazes de detectar especificamente os isolados virais. A eficiência estimada para cada sistema, sendo um cálculo para a sonda do subtipo B e outro para F foram de, respectivamente: 80,97 e 85,16% para a região da protease; 89,80 e 75,09% para a região da transcriptase reversa; 80,90 e 83,83% para a região da integrase; 93,49 e 98,93% para a região da gp120; e 88,45 e 80,19% para a região da gp41.

Nos ensaios de co-cultivo, a detecção de cada subtipo na primeira e na quinta passagem aconteceu de forma diferente, com variações na média dos valores de *Cycle threshold* (Ct) de intensidades diferentes. De uma forma geral, a concentração inicial do subtipo B pareceu diminuir, chegando a ficar indetectável em algumas regiões, enquanto do subtipo F pareceu

aumentar ao longo das passagens para todas as regiões amplificadas (protease, transcriptase reversa, gp120 e gp41). A exceção foi a região da integrase, para qual foi detectado sinal somente para o subtipo B, sendo este sinal crescente ao longo do tempo.

Do seqüenciamento e subtipagem das 157 amostras provenientes da cidade de Santos, foram obtidas seqüências de todas as regiões estudadas para 71 amostras. Destas, 43 foram subtipadas como B em todas as regiões, e somente três como F. De acordo com o padrão de distribuição de subtipos para as regiões, foram encontradas 12 seqüências com o padrão da CRF_28 e 9 no padrão da CRF_29. Nenhum subtipo C foi encontrado em nenhuma das regiões em estudo.

Conclusão: O uso da técnica de PCR em tempo real para identificação de subtipos de fragmentos em cultura celular e para avaliação da dinâmica replicativa da recombinação em culturas co-infectadas reforça seu potencial uso em futuros testes *in vivo* para identificação de estruturas recombinantes. Esta metodologia mostrou ser eficiente, de mais fácil manipulação e mais econômica que o seqüenciamento de DNA. Os ensaios de co-cultivo amplificados pelos sistemas desenvolvidos sugeriram uma distribuição divergente nos subtipos resultantes para as diferentes regiões, sendo um grande indicativo de recombinação. O seqüenciamento das amostras clínicas evidenciou a importância das CRF em estudo, devido sua notável presença na amostragem utilizada, sendo um reflexo da epidemia de um local de grande circulação de mais de um subtipo.

Background: The discovery of 42 HIV-1 circulating recombinant forms (CRF) together with the innumerable unique HIV recombinants forms, makes clear the role of genetic recombination for the epidemic. In Brazil, clades B, F, and C co-circulate, with 5 recently described CRFs. Real Time PCR is a rapid and reliable tool capable of detecting different HIV-1 subtypes and recombinant profiles.

Objective: The aim of this study was to develop real time PCR systems in order to detect the Brazilian CRF_28 and CRF_29, which are B/F recombinants, as well as detect B/F recombinants generated by *in vitro* competition assays. In future, these systems should be able to discriminate subtypes in clinical surveys.

Methodology: MT-4 cells were separately infected with the viral strains BZ167 (subtype B) and BR020 (subtype F), and supernatant was collected in order to optimizing the real time PCR systems (TaqMan[®]) developed to detect the subtype profile of different genomic regions, including *pol* gene (protease, reverse transcriptase, integrase) and *env* gene (gp120 and gp41). The designed primers should be able to equally amplify the subtype B and F, which should be discriminated by subtype-specific probes. For future validation of these PCR systems, 157 clinical samples from the city of Santos were sequenced and phylogenetically analyzed in order to perform the clade assignment with Neighbor-Joining algorithm (Phylip software package v3.5).

Results: The designed systems were able to differentiate the utilized viral strains. The estimated efficiencies for each system, for each probe, subtypes B and F separately, were respectively: 80,97 and 85,16% for protease region; 89,80 and 75,09% for reverse transcriptase region; 80,90% and 83,83% for integrase region; 93,49 and 98,93% for gp120 region; and 88,45 and 80,19% for gp41 region.

For the co-infected cell culture, the detection of each subtype was performed in the first and fifth passages. Generally, the initial concentration of subtype B appeared to have decreased, some of them becoming undetectable, whereas subtype F seemed to increase with the passages, for protease, reverse transcriptase, gp120 and gp41 regions. The integrase region was an exception, since only the subtype B was detected, with increasing Cycle threshold (Ct) values over time.

Sequencing results revealed that 65 out of 157 samples had the subtype profile defined for all regions. 43 out of 71 were defined as B, whereas 3 were F in all regions. 12 samples presented

the CRF_28 profile, and 9 samples presented the CRF_29 profile. There were no subtype C samples in any genomic regions analyzed.

Conclusion: The use of real time PCR technique for identification of fragments' subtypes in cell culture and for evaluation of replicative dynamics of recombination in co-infected cultures warrants its potential use in future *in vivo* surveys. This methodology proved to be efficient, fast, less cumbersome and less expensive than DNA sequencing. The newly designed systems performed for supernatant of competition assays had suggested a divergent distribution of subtypes for the different regions, which reflects the possibility of genetic recombination. Results from clinical samples revealed a high prevalence of CRF_28/29 in this geographic region, thus reflecting the resulting consequence of different co-circulating strains and pointing to the need for a careful surveillance.

1.1. HISTÓRICO

Mesmo sem ter seu agente etiológico definido, em 1981, a aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) já era assim nomeada e também uma doença já reconhecida (GALLO *et al.*, 1984), determinada por sintomas, que hoje caracterizam a infecção pelo HIV, Vírus da Imunodeficiência Humana (LEVY, 2006).

O aparecimento de cinco homossexuais norte-americanos com pneumonia por *Pneumocystis carinii*, em 1981 (LEVY *et al.*, 1984; VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991), seguido por constatação de diversas condições associadas a imunodeficiências, fortemente exemplificadas pelo sarcoma de Kaposi (GOTTLIEB *et al.*, 1981; MASUR *et al.*, 1981), culminou com o surgimento do termo “Síndrome da Imunodeficiência Adquirida”, criado para definir clinicamente as várias manifestações desta nova doença, associada, naquele momento, a homossexuais e usuários de drogas intravenosas com deficiente resposta de células T (VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991). Em 1982, o número de casos de aids alastrou-se nos EUA, e a doença já começou a ser associada também aos hemofílicos, pacientes que receberam transfusão de sangue, imigrantes Haitianos, parceiros sexuais de membros de grupos de risco e crianças nascidas de mães pertencentes aos grupos de risco (GALLO *et al.*, 1984; VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991).

A incidência crescente desta doença, bem como a característica dos pacientes afetados, sugeriu a existência de um agente etiológico infeccioso, que poderia ser transmitido por contato íntimo ou por sangue total e/ou seus componentes (GALLO *et al.*, 1984). Assim, iniciou-se o isolamento do seu agente etiológico que poderia ser próximo dos já existentes, como o vírus da hepatite B, o CMV ou o EBV, ou realmente desconhecido (LEVY, 2006).

Em 1983, dois anos depois da definição da aids, Françoise Barré-Sinoussi isolou um vírus de uma pessoa que sofria da síndrome de linfadenopatia, condição prévia para o estabelecimento da aids. Este vírus isolado tinha a característica de infectar células mononucleares de sangue periférico (PBMC), causando nestas efeito citopático em seis ou sete dias. Seu exame por eletromicroscopia evidenciou sua característica de brotamento e morfologia de retrovírus, mais tarde definido como um lentivirus (GONDA *et al.*, 1985).

Outro grupo, o grupo de Robert C. Gallo, também reportou o isolamento de um retrovírus de pacientes com aids e o descreveu como parte da família HTLV de retrovírus oncogênicos (GALLO *et al.*, 1984), denominando-o HTLV III, apesar de Montaigner e seu grupo, no mesmo

ano de 1983, ter demonstrado que este vírus isolado tinha comportamento diferente do HTLV, retrovírus este previamente descrito como potencial causador de leucemia em humanos, já que o novo vírus isolado não apresentava a característica de transformar as células CD4⁺, mas sim causar sua morte após intensa replicação (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983).

Com o tempo, verificou-se que estes vírus isolados pelos diferentes grupos apresentavam características similares, sendo renomeados por Vírus da Imunodeficiência Humana, o HIV, pertencente à família *Retroviridae* (COFFIN *et al.*, 1986). Em 2008, Luc Montaigner e Françoise Barré-Sinoussi foram contemplados com o prêmio Nobel de Medicina/Fisiologia pela descoberta do vírus da aids.

Além deste vírus isolado, responsável pela disseminação da epidemia da aids, a partir de 1986, foram obtidos de pacientes africanos com aids, ou com síndromes relacionadas, vírus que não respondiam aos testes sorológicos utilizados para detectar o primeiro vírus descoberto, testes estes voltados para regiões antigênicas conservadas, o que, portanto, não parecia estar relacionado com a grande variabilidade genética deste tipo de vírus (CLAVEL *et al.*, 1986). Assim, a aids passou a ser definida por dois tipos de HIV, o HIV-1, primeiro a ser isolado, e o HIV-2, muito menos prevalente no mundo, restrito a áreas da África Central ou em outras regiões como casos isolados, tendo o Brasil como exemplo (PIENIAZEK *et al.*, 1991; FUSUMA *et al.*, 2005; COHEN *et al.*, 2008).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

Dados da UNAIDS/WHO (REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC, Dezembro de 2007) demonstrou que no mundo, a cada dia, mais de 6.800 pessoas são infectadas pelo HIV e mais de 5.700 pessoas morrem por consequência da aids. No final do ano de 2007, foi estimado por este órgão que 33,2 milhões (30,6 milhões – 36,1 milhões) de pessoas em todo mundo viviam com HIV, sendo que mais 2,5 milhões (1,8 milhões – 4,1 milhões) de pessoas se tornaram novos infectados e 2,1 milhões (1,9 milhões – 2,4 milhões) perderam suas vidas para aids.

Alterações favoráveis na incidência, em muitos países, estão relacionadas às mudanças de comportamento e a programas de prevenção. Estas mudanças, juntamente com a alta mortalidade causada pela aids, proporcionaram uma queda na prevalência global do HIV apesar do contrastante número crescente de pessoas vivendo com este vírus no mundo, o que é devido, por sua vez, ao crescimento populacional e, mais recentemente, aos efeitos do tratamento anti-retroviral, que veio a prolongar a vida dos infectados.

A prevalência do HIV no mundo tem sido estável desde 2001, mesmo com o aumento no número de pessoas vivendo com HIV no mundo, e até tem diminuído em alguns países. Em alguns países específicos, também ocorre redução no número de mortes associadas ao HIV, particularmente relacionada ao acesso à terapia anti-retroviral, e a redução no número de novos infectados. A incidência do HIV teve seu ponto máximo no final dos anos 90 e vem diminuindo desde então.

O HIV-1 pode ser transmitido por sangue e seus derivados contaminados (transfusão e uso de drogas injetáveis), por mãe infectada a seu bebê (antes, durante ou depois do parto, ou pela amamentação), e por relações sexuais (vaginal, anal e até oral), sendo atualmente a via sexual a forma mais freqüente de transmissão (COHEN *et al.*, 2008).

Nos países industrializados, como os EUA e países da Europa, as infecções ocorrem predominantemente em homens homossexuais e usuários de drogas injetáveis, mas há um aumento considerável no número de mulheres infectadas por meio de relações heterossexuais. A transmissão materno-fetal é mais controlada, devido ao controle pré-natal e à provisão de tratamento anti-retroviral às grávidas (COHEN *et al.*, 2008).

O estudo das tendências globais e regionais sugere que a pandemia formou dois padrões. A epidemia generalizada encontrada em muitos países da África sub-Sahariana, especialmente na parte sudeste do continente, e a epidemia encontrada no resto do mundo definida por grupos com comportamento de risco, como homens que têm relações sexuais com outros homens (HSH), usuários de drogas injetáveis, profissionais do sexo e seus parceiros sexuais (UNAIDS, 2007).

A África continua sendo o epicentro global da pandemia, sendo a África sub-Sahariana a região mais seriamente afetada, tendo a aids como a principal causa de morte, dado suportado pela prevalência, em 2007, de 76% das mortes devido a aids e que detém 68% das pessoas vivendo HIV/AIDS no mundo. Apesar da queda na prevalência do HIV-1 em muitos países, a África passa por conseqüências da pandemia importantes como a desestruturação familiar, danos socioeconômicos, expectativa de vida reduzida, epidemia secundária de tuberculose e um aumento dramático no número de órfãos (COHEN *et al.*, 2008) (UNAIDS, 2007).

Fora do continente africano, a região mais afetada é o Caribe, tendo o Haiti como foco principal, sendo a maior transmissão pela via sexual (heterossexual). A América Latina possui uma distribuição e epidemiologia diversa, apesar dos HSH serem o grupo mais afetado. O Brasil é o país que abriga um terço de toda população infectada pelo HIV na América Latina, que em 2005 contabilizava em 1,6 milhões. (COHEN *et al.*, 2008) (UNAIDS, 2007)

Dados do Boletim Epidemiológico do Estado de São Paulo (Ano XXVI, número 1) contabilizam 155.302 casos de aids, no período de 1980 até junho de 2007, sendo 70,36% do sexo masculino e 29,64% do feminino, correspondendo a aproximadamente 36% dos casos do país. Além disso, os dados demonstram uma diminuição de até duas vezes no coeficiente de incidência por 100.000 habitantes, de 1998 a 2005, valendo ressaltar que a introdução dos anti-retrovirais mais potentes ocorreu em 1996.

Neste estado, a maior incidência de casos notificados está na faixa etária de 30 a 39 anos, tendo diminuído nas faixas etárias entre 15 e 19 anos e entre 20 a 24 anos. A diminuição de casos entre os jovens foi mais evidente para os homens, enquanto o aumento de casos em maiores de 40 anos tem acontecido especialmente entre as mulheres.

Quanto à categoria de exposição, a proporção de homossexuais e bissexuais masculinos tem se mantido estável nos últimos anos, referente à cerca de 30% do total de casos em homens. Já para heterossexuais, houve um grande aumento, de 5,1% dos casos em 1985 para 56,7% dos casos em 2005, sendo predominante a partir de 1998 em mulheres e logo abaixo em homens. A forma de exposição por uso de drogas injetáveis teve queda na década de 90, chegando a 8,1% em 2005, depois de sua grande expressão na década de 80, quando chegou a ser predominante. A transmissão por via sangüínea também apresentou uma queda, a partir de 1995, devido ao controle do sangue e hemoderivados. Quanto às categorias de exposição em menores de 13 anos de idade, a principal forma de transmissão é a vertical. A proporção de formas de exposição ignorada é da ordem de 16%.

Segundo o Grupo de Vigilância Epidemiológica, o município de São Paulo, desde 1991, se encontra em primeiro lugar, quanto à proporção de casos em números absolutos, com 39,9%, enquanto Santos se encontra em terceiro lugar, com 6,4% dos casos. Santos é a cidade de maior população que se destaca, quanto a coeficientes de incidência, mensurado em 29,7, quase o dobro do coeficiente para o estado como um todo, no ano de 2005.

Quanto a número de óbitos por aids contabilizados no período de 1990 a 2006, São Paulo se apresenta em primeiro lugar, dentre os municípios paulistas, possuindo 38,7% dos óbitos, vindo Santos em seguida, com 3,4%. Além disso, para este mesmo período, Santos é a cidade com a maior taxa de mortalidade por aids, mensurada em 16 óbitos/100.000 habitantes.

1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO HIV-1

Como outros retrovírus, o HIV-1 consiste, em sua parte mais externa, de uma camada fosfolipídica, derivada da célula do hospedeiro, e de complexos protéicos, expressos pelo vírus, em que cada subunidade é formada por duas proteínas de membrana, a gp120, de superfície, e a

gp41, transmembrana. Interno a este envoltório está um capsídeo formado pela proteína p24, a proteína do capsídeo, e se separa do envelope viral por uma matriz constituída pela proteína de matriz, p17. Este capsídeo envolve o nucleocapsídeo, formado pela proteína p9, responsável por abrigar o material genômico viral, que consiste de duas fitas simples de RNA de polaridade positiva, e as três enzimas virais, a protease, a transcriptase reversa e a integrase (BARRE-SINOUSSE, 1996).

1.4. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV-1

O genoma do HIV-1 possui um tamanho de aproximadamente 9,8 kb (kilobases), com fases abertas de leitura, que codificam para várias proteínas virais (LEVY, 1993). O HIV-1 pode ser dividido genomicamente em três genes estruturais, *gag*, *pol* e *env*, nos genes acessórios *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein r*) e *vpu* (*viral protein u*) (*vpx*, no caso do HIV-2), e nos genes regulatórios *tat* (*trans-activator*), *rev* (*regulator of expression of virion proteins*) e *nef* (*negative factor*).

Após a internalização do vírus e transcrição reversa do RNA viral em DNA fita-dupla, ocorre a integração deste material genômico no cromossomo da célula hospedeira, sendo agora chamado de provírus. Feita a integração, o provírus resultante é flanqueado por dois terminais longos de repetição (LTR, *Long Terminal Repeat*). O LTR 5' atua como elemento promotor proviral, enquanto o LTR 3' promove a poliadenilação dos RNA mensageiros (mRNA) codificados. O genoma do HIV-1, um retrovírus complexo, codifica aproximadamente 22 diferentes mRNA que facilitam a expressão diferencial de nove fases abertas de leitura, e isto é proporcionado por processamentos (*splicing*) alternativos (CULLEN, 1998a).

Os mRNA codificados pelo HIV-1 podem ser divididos em três classes. Dentre estes está um transcrito que não sofre processamento (*unspliced*) de cerca de 9.1 kb, cinco transcritos que sofrem um único processamento (*singly spliced*) com uma média de tamanho de 4,3 kb, e uma classe complexa de 16 mRNA que sofreram processamentos múltiplos (*multiply spliced*), de aproximadamente 1,8 kb. Esta última classe codifica para as proteínas regulatórias virais Tat, Rev e Nef, enquanto a classe de 4,3 kb codifica para proteínas auxiliares, como o Vif, Vpr e Vpu, bem como as proteínas do envelope. Já o mRNA não processado codifica para Gag e Pol e também é empacotado na progênie viral, servindo de material genômico para estas novas partículas (CULLEN, 1998a).

O precursor de Gag, codificado pelo mRNA não processado, passará por clivagem proteolítica, gerando as proteínas menores p24, p17 e p9. De mesma origem que o precursor de Gag, o precursor de Pol é clivado nos produtos protease, transcriptase reversa e integrase. A

protease é a enzima responsável por este processamento proteolítico de ambos precursores citados (LEVY, 1993; BARRE-SINOUSI, 1996).

Um dos mRNA que sofrem somente um processamento codifica para o precursor das glicoproteínas do envelope, a gp160. Este precursor é clivado na célula do hospedeiro, pelo aparato do Complexo de Golgi, em duas glicoproteínas, a gp120, proteína de superfície externa do envelope, e a gp41, proteína transmembrana. Estas duas glicoproteínas apresentam uma interação não covalente que será importante no processo de fusão do vírus com a célula hospedeira (LEVY, 1993).

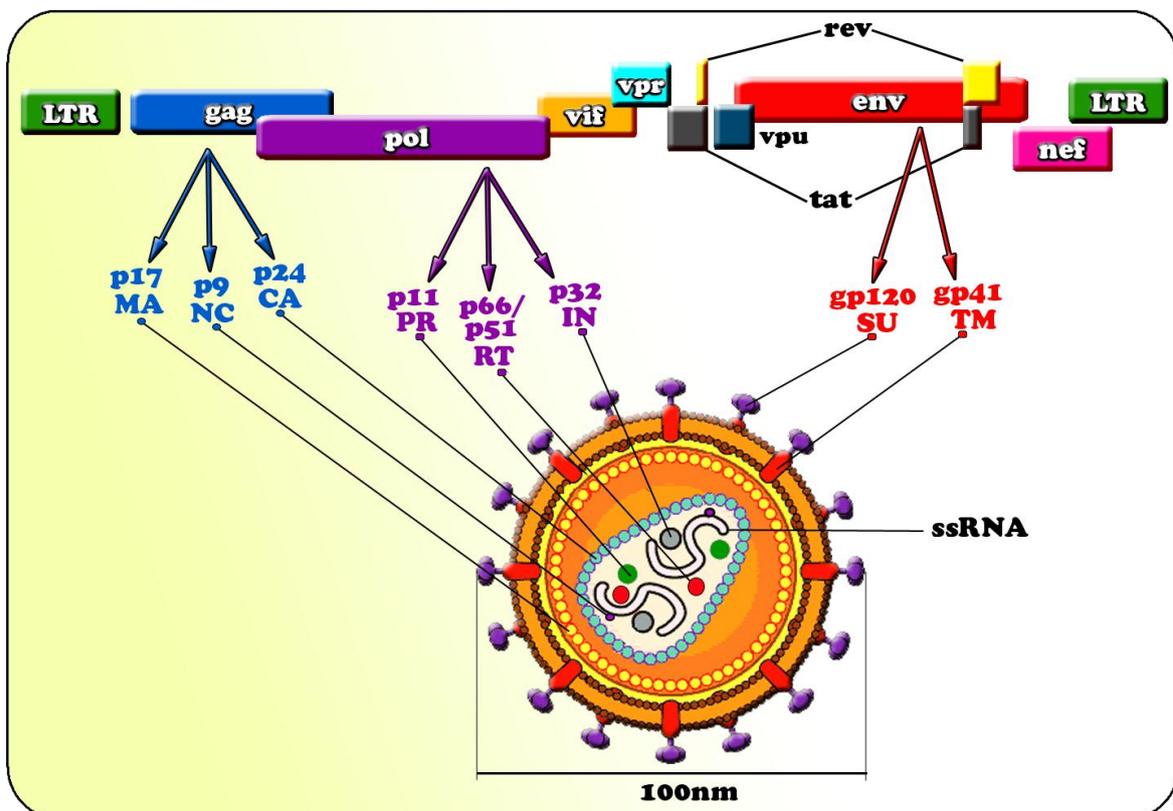


Figura 1: Figura esquemática do genoma do HIV-1 e seus produtos, tendo suas posições indicadas na figura esquemática da partícula viral.

1.5. CICLO REPLICATIVO

Como parasitas intracelulares, os vírus têm primeiramente que reconhecer as células e, então, entrar nas mesmas. Vírus envelopados, como o HIV, entram nas células pela fusão das membranas lipídicas da partícula viral com a celular, permitindo o acesso do core viral ao citoplasma celular. O HIV utiliza, para tanto, suas glicoproteínas de superfície que interagem com diferentes moléculas encontradas nas células hospedeiras. O HIV se liga com alta afinidade ao receptor CD4 de linfócitos T, pertencente à superfamília das imunoglobulinas, molécula esta

que permitirá a entrada do vírus na célula, e que, por mais de uma década, ficou conhecida como o principal receptor de superfície para todas as variantes de HIV e SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*). No entanto, diferentes cepas demonstraram necessitar ainda de diferentes co-receptores para guiar esta entrada (CLAPHAM, 1997; CLAPHAM e WEISS, 1997; PROUDFOOT *et al.*, 1999).

A descoberta de uma família de co-receptores responsável pela entrada do vírus, expressos em diferentes populações celulares, juntamente com o uso seletivo dos mesmos por diferentes cepas, faz destes co-receptores os principais determinantes de quais células o HIV pode infectar. Todos os co-receptores descobertos foram identificados, ou relacionados, como membros da família de receptores de quimiocinas. Demonstrou-se que as cepas de HIV-1 utilizam principalmente os co-receptores CCR5 e CXCR4, ou ambos, o que passou a indicar que estes co-receptores são essenciais no curso da infecção do HIV-1 *in vivo* (CLAPHAM e WEISS, 1997). Alguns isolados, no entanto, podem utilizar co-receptores adicionais. Variantes virais com maior capacidade de utilizar diferentes receptores podem ter vantagem *in vivo* e serem capazes de ganhar acesso a novas células alvo (SIMMONS *et al.*, 2000).

A citopatogenicidade do HIV-1 e seu tropismo celular ficaram mais claros com a definição de CXCR4 e CCR5 como os principais receptores para cepas indutoras e não indutoras de sincício respectivamente. Ambos atuam como co-receptores importantes para a infecção de populações distintas de células TCD4⁺, bem como a linhagem de macrófagos (SIMMONS *et al.*, 2000).

O complexo de três moléculas de gp120 e gp41, produtos de gene viral *env*, é o mediador da ligação ao CD4 da superfície da célula do hospedeiro, levando a uma mudança conformacional na gp120, o que induz a uma exposição de um sítio da mesma que reconhece o receptor de quimiocina. Esta interação gp120/co-receptor leva a uma mudança conformacional na gp41, a glicoproteína viral transmembrana. Tais mudanças levam à exposição da região amino terminal hidrofóbica da gp41, que deve, assim, ser inserida na membrana da célula do hospedeiro, iniciando a fusão entre as membranas viral e celular. Uma vez havendo a fusão, o core viral pode ser internalizado na célula do hospedeiro, para prosseguir com o complexo de pré-integração (PROUDFOOT *et al.*, 1999).

A seqüência da gp120 que controla o tropismo pelo tipo celular, CCR5 ou CXCR4, se encontra principalmente no loop variável V3, estando este envolvido intrinsecamente na interação com o co-receptor (CLAPHAM, 1997).

Após a entrada do capsídeo viral na célula, é iniciado o processo para integração do genoma viral no núcleo da célula do hospedeiro. O RNA viral, ainda associado com as proteínas

do core viral, passa pelo processo de transcrição reversa pela enzima viral transcriptase reversa juntamente com sua subunidade RNaseH, sendo gerada a dupla fita de DNA. Estas cópias do RNA viral, na forma de cDNA, migram para o núcleo e são integrados no cromossomo celular, por intermédio da enzima viral integrase (LEVY, 1993), constituindo, então, o provírus. Este provírus é assim transcrito em novos RNA genômicos, bem como em RNAs mensageiros pelas RNA polimerases celulares (BARRE-SINOUSI, 1996).

É natureza das células reter mRNA que necessitem passar por processamentos, como *splicing*, no núcleo antes de serem direcionados ao citoplasma para a tradução, para que proteínas deletérias não sejam codificadas. Enquanto para as células do hospedeiro este é um mecanismo benéfico, para os retrovírus é um sério problema (CULLEN, 1998b).

O HIV-1 contém somente um elemento promotor, o LTR, e por isso codifica somente um transcrito primário, de comprimento genômico. No entanto, para que as nove fases abertas de leitura codificadas pelo HIV-1 sejam expressas, é necessário que este transcrito primário seja expresso no citoplasma como um mRNA *unspliced* (que servirá tanto como genoma viral, como mRNA para Gag e Pol), como cinco mRNA processados unicamente (que codificam para Vif, Vpr, Vpu e Env) e como 16 mRNA processados multiplamente ou completamente (codificando para Tat, Rev e Nef). Este processamento do RNA do HIV-1 exige que seja feito por proteínas celulares, devendo conter sinalização para o processamento único ou múltiplo, presença esta que faria com que o mRNA ficasse retido no núcleo, impedindo a expressão de mRNA não processados (Gag e Pol) e unicamente processados (Env, Vif, Vpr e Vpu). O mesmo não acontece com mRNA virais que passam pelo processo de *splicing* completo, como Tat, Nef e Rev, que não são submetidos a esta retenção, podendo ser direcionados ao citoplasma (BARRE-SINOUSI, 1996; CULLEN, 1998b).

A estratégia desenvolvida pelo HIV-1 se dá pelo acúmulo no núcleo destes mRNA que não podem ser direcionados ao citoplasma e pela expressão de um fator seqüência-específico para exportação de RNA nuclear, o Rev (MALIM *et al.*, 1989; CULLEN, 1998b).

Como Rev, Tat e Nef são codificados por mRNA de processamento completo, o produto destes genes são expressos logo após a infecção das células e são referidos como produtos gênicos precoces. Por outro lado, os produtos Gag, Pol, Env, Vif, Vpr e Vpu, dependentes do Rev para o transporte citoplasmático, são referidos como produtos gênicos tardios (CULLEN, 1998b). Nos estágios tardios do ciclo replicativo, Rev poderia estimular a redução de sua própria produção, reduzindo a formação de progênie, levando a célula para estágio de latência (LEVY, 1993).

Além do Rev, as outras proteínas regulatórias do HIV-1, bem como as acessórias, são essenciais para o ciclo replicativo deste vírus. A proteína regulatória Tat, por exemplo, é um potente ativador transcricional do promotor do HIV-1, o LTR (região U3), e é essencial para a replicação viral, como evidenciado em muitas culturas (BARRE-SINOUSI, 1996; CULLEN, 1998b).

À outra proteína regulatória, a proteína Nef, é atribuída mais de uma função. Dentre estas estão (i) a *down-regulation* (por internalização e degradação) do receptor CD4 da superfície da célula infectada (GARCIA e MILLER, 1991), o que diminuiria a formação intracelular de complexos CD4 e proteínas de envelope das novas partículas virais formadas, facilitando a liberação dos virions de HIV-1, além de evitar efeitos citopáticos causados pela superinfecção (BENSON *et al.*, 1993; ROSS *et al.*, 1999); (ii) a *down-regulation* de receptores de MHC-I da superfície celular (LE GALL *et al.*, 1998), processo este que inibe a lise das células infectadas mediada por linfócitos T citotóxicos, uma vez que estes receptores são responsáveis por apresentar epítopos de peptídeos virais a estas células do sistema imune do hospedeiro (COLLINS *et al.*, 1998); (iii) aumento na infectividade viral.

A proteína acessória Vpu apresenta uma de suas funções, de certo modo, muito parecida com uma das funções da Nef, que é a degradação seletiva do receptor CD4 da célula infectada, o que evita que os complexos formados pelas glicoproteínas do envelope e receptores CD4 recém sintetizados nesta célula sejam encaminhados para degradação. O Vpu acaba, portanto, fazendo com que somente o receptor CD4 seja degradado via retículo endoplasmático, enquanto permite a liberação do Env e sua subsequente incorporação à progênie de virions (WILLEY *et al.*, 1992). Vale observar que a proteína Nef, por outro lado, não afeta a produção de CD4, mas induz a rápida remoção destes receptores, já existentes, da superfície da célula (ROSS *et al.*, 1999). A outra função do Vpu está relacionada à facilitação na liberação dos virions, o que acontece por promover o brotamento e a liberação dos virions pela membrana. Foi evidenciado que mutações no Vpu resultam numa queda no número de vírus liberados e no acúmulo de partículas virais intracelulares (CULLEN, 1998b).

Outra proteína acessória, a proteína Vpr, tem uma função que está relacionada com o aumento da replicação viral em macrófagos e em outras células que não se dividem (CULLEN, 1998b). Outra função seria induzir as células a permanecerem na fase G2 do ciclo celular, ou seja, atrasando a entrada da célula na fase de mitose do ciclo celular. Esta evidência corrobora com estudos que demonstram que o promotor LTR do HIV-1 é mais ativo na fase de G2 prolongada (GOH *et al.*, 1998).

Por fim, a proteína acessória Vif parece estar relacionada com o aumento da infectividade de virions de HIV-1 produzidos em células T primárias, ou para aumentar a infectividade dos mesmos em células não permissivas (CULLEN, 1998a). Vírus deficientes de um gene *vif* funcional estão severamente restritos na sua habilidade de se replicar em células não permissivas, quando comparados com vírus do tipo selvagem (GOILA-GAUR e STREBEL, 2008).

1.6. A DIVERSIDADE DO HIV-1

Isolados de HIV mostram grande heterogeneidade em sua cinética replicativa, uso de co-receptores, tropismo celular e efeitos citopáticos (MORRIS *et al.*, 1999). A geração de diversidade viral, que inclui mutações e recombinações, está relacionada com os mecanismos normais de replicação de retrovírus, como o HIV-1 (NAJERA *et al.*, 2002), e estão presentes no organismo hospedeiro como misturas de populações relacionadas, mas geneticamente distintas, determinadas quasiespécies (DOMINGO, 1998).

A variação genética dos retrovírus é composta pela taxa de mutação por ciclo de replicação, pelo número de ciclos de replicação e pelo grande tamanho da população e pela taxa de fixação das mutações, ou seja, pela vantagem ou desvantagem seletiva da nova variante (COFFIN, 1995). As altas taxas de mutação, por sua vez, são proporcionadas pela presente, mas deficitária atividade retificadora (*proof-reading*) das polimerases dos retrovírus, pela alta taxa de replicação viral no organismo infectado e pela grande variedade da população viral (NAJERA *et al.*, 2002). Estimou-se que a taxa de erro da transcriptase reversa em um único ciclo de replicação chega a $3,4 \times 10^{-5}$ mutações por par de bases por ciclo (MANSKY e TEMIN, 1995).

Já a recombinação é um processo intrínseco do ciclo de replicação, por meio do qual os retrovírus podem reparar genomas defectivos ou podem espalhar mais rapidamente mutações benéficas entre os genomas virais (CLAVEL *et al.*, 1989; BOULERICE *et al.*, 1991; TEMIN, 1991; WOOLEY *et al.*, 1997). A recombinação, então, permite um aumento na variabilidade genética, fornecendo aos vírus a capacidade de criar rapidamente o melhor perfil para evadir às mudanças nas pressões seletivas imunológicas ou farmacológicas (TUMAS *et al.*, 1993; GOLOVKINA *et al.*, 1994; KELLAM e LARDER, 1995; MOUTOUH *et al.*, 1996; ONDOA *et al.*, 2001). No HIV-1, a recombinação pode acontecer entre cepas do mesmo subtipo (intrasubtipos) (MORRIS *et al.*, 1999), de subtipos distintos (intersubtipos), ou de diferentes grupos (intergrupos). A importância da recombinação na diversidade global do HIV-1 tem sido crescentemente reconhecida nos últimos anos, quando a pesquisa em regiões nem tanto exploradas aumentou e estudos filogenéticos de fragmentos múltiplos e até de seqüenciamento

completo tornaram-se mais freqüentes, por revelarem o fato de que as formas recombinantes são mais prevalentes do que se imaginava, tanto como CRF (Formas Recombinantes Circulantes), quanto como URF (Formas Recombinantes Únicas). CRF são genomas recombinantes encontrados em pelo menos três pessoas não relacionadas epidemiologicamente, enquanto URF são formas recombinantes (ou mosaicos) encontradas em um único indivíduo ou em um único *cluster* filogenético (ROBERTSON *et al.*, 2000; NAJERA *et al.*, 2002).

A recombinação é um processo relacionado com a síntese da dupla fita de DNA a ser integrada no genoma da célula. A transcriptase reversa, enzima responsável por transcrever o RNA genômico viral em DNA, tem a característica de realizar “saltos” na fita molde, obrigatórios para que ocorra a duplicação da região LTR presente nas duas extremidades do genoma (GOFF, 2001). Estes “saltos” ocorrem entre as duas fitas de RNA genômico, uma vez que o HIV-1 é um vírus que contém duas fitas de RNA de polaridade positiva com potencial replicativo (SRINIVASAN *et al.*, 1989; GOODRICH e DUESBERG, 1990; HU e TEMIN, 1990). Se a partícula viral é heterozigota, ou seja, possui duas fitas de RNA distintas, o ciclo de replicação pode gerar recombinantes. Estas partículas heterozigotas podem ser formadas quando uma única célula é infectada simultaneamente - infecção dupla (DIAZ *et al.*, 1995) - ou seqüencialmente - superinfecção (JOST *et al.*, 2002) - por dois virions distintos, o que leva ao empacotamento de heterodímeros (HU e TEMIN, 1990; STUHLMANN e BERG, 1992; NAJERA *et al.*, 2002).

Um sistema de classificação viral baseado nas diferenças genéticas entre os isolados virais estabeleceu grupos e subtipos para o HIV-1. Assim, o HIV-1 pode ser dividido nos grupos M (*Main*), O (*Outlier*) e N (*New*), sendo que os isolados virais do primeiro são responsáveis por mais de 99% das infecções mundiais, com subtipos dominantes em áreas geográficas específicas (ROBERTSON *et al.*, 2000; DE BAAR *et al.*, 2001). O grupo M é dividido nos subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K, sendo que alguns destes apresentam sub-subtipos, ou seja, cepas distintas, mas não geneticamente distantes para justificar a designação de um novo subtipo, como o subtipo A (A1 e A2), o subtipo F (F1 e F2) e o subtipo B (B' e B''). Os subtipos E e I não possuem genomas seqüenciados completamente, representativos destes subtipos; têm-se evidenciado que estes dois subtipos sofreram recombinação, sendo renomeados como CRF: CRF01_AE (para o subtipo E) e CRF04_cpx (para o subtipo I) (ROBERTSON *et al.*, 2000).

Na epidemia mundial, 42 CRF já foram descritas (Laboratório Nacional Los Alamos, <http://hiv-web.lanl.gov>), sendo cinco delas encontradas no Brasil. O Brasil detém uma epidemia determinada pelo subtipo B, em sua maioria, com ocorrência freqüente dos subtipos F e C (BONGERTZ *et al.*, 2000; MORGADO *et al.*, 2002), sendo, além disso, um país em que duplas

infecções já foram bem evidenciadas (SABINO *et al.*, 1994; JANINI *et al.*, 1996; JANINI *et al.*, 1998). Um intenso processo de recombinação entre os subtipos B e F tem sido reportado ultimamente na epidemia brasileira, sendo estes vírus recombinantes prevalentes na região sudeste do Brasil, onde se situam grandes centros urbanos, como Rio de Janeiro e São Paulo, e cidades portuárias como Santos (THOMSON *et al.*, 2004; SA FILHO *et al.*, 2005). Apesar de se acreditar que a epidemia na América Latina é principalmente consequência da epidemia brasileira, e apesar de já existirem estudos descrevendo recombinantes BF no Brasil, a identificação da CRF12_BF na Argentina e no Uruguai (CARR *et al.*, 2001) veio muito antes da identificação das CRF brasileiras sendo quatro delas recombinantes entre os subtipos B e F, CRF28_BF e CRF29_BF (DE SA FILHO *et al.*, 2006), CRF39_BF e CRF40_BF (GUIMARAES *et al.*, 2008), e uma entre B e C, CRF_31 (SANTOS *et al.*, 2006).

A diversidade genética do HIV-1 dificulta a monitoração nas diferentes áreas geográficas do mundo. Entre os métodos disponíveis atualmente para a caracterização genética do HIV-1 estão: HMA (*heteroduplex mobility assay*) (BUONAGURO *et al.*, 1995; DELWART *et al.*, 1995; HEYNDRICKX *et al.*, 2000; TATT *et al.*, 2000); RFLP (*restriction length fragment polymorphism*) (JANINI *et al.*, 1996), seqüenciamento de certas regiões genômicas (GAO *et al.*, 1996) e seqüenciamento completo do genoma (HOELSCHER *et al.*, 2002). No entanto, com exceção desse último, os outros métodos pesquisam somente uma ou duas regiões do genoma o que pode subestimar a identificação de genomas recombinantes (HOELSCHER *et al.*, 2002). Além disso, o seqüenciamento do genoma completo consiste em técnica muito dispendiosa, demandando trabalho extensivo e prolongado, não possibilitando a análise quantitativa da frequência destes perfis genéticos em larga escala (DE BAAR *et al.*, 2001).

O propósito deste projeto é, portanto, desenvolver um método rápido e eficaz de subtipagem do HIV-1 que consiga discriminar os subtipos puros e seus recombinantes co-circulantes.

2. OBJETIVOS

Desenvolver técnica de PCR em tempo real para as regiões genômicas *pol* e *env* de HIV-1 para discriminação dos subtipos B e F e triagem de seus recombinantes a partir de culturas infectadas e co-infectadas por isolados virais destes subtipos.

Analisar a sensibilidade e especificidade dos conjuntos de *primers* e sondas escolhidos para os vírus analisados em culturas (*in vitro*) e em amostras clínicas (*in vivo*).

Investigar o produto viral resultante de co-cultivo de vírus dos subtipos B e F quanto à emergência de vírus recombinantes e compará-los ao perfil genômico das CRF 28 e 29 descritas *in vivo*.

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células e isolados virais

3.1.1. Células

A linhagem de células escolhida para cultivo de HIV-1 foi a MT-4, células linfoblásticas humanas T4 modificadas por HTLV-1, obtidas junto ao banco de reagentes do *American National Institute of Health* (NIH- USA – *Catalog Number* 120).

3.1.2. Isolados Virais

Os isolados virais de HIV-1 pertencentes aos subtipos B e F também foram obtidos junto ao banco de reagentes do NIH- USA para infecção de culturas de MT-4. Os isolados virais escolhidos possuem seus genomas completamente seqüenciados, sendo estes: HIV-1 BZ167, subtipo B (NIH- USA – *Catalog Number* 3185), e HIV-1 93BR020, subtipo F (NIH- USA – *Catalog Number* 2329).

3.1.3. Obtenção de estoque viral

3.1.3.1. Infecção de células MT-4

Células MT-4 foram infectadas pelos vírus BZ167 e BR020 separadamente e mantidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen™), contendo 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (Invitrogen™) a 1%. As culturas foram mantidas a 5% de CO₂ e a 37°C.

A infecção de células MT-4 foi realizada utilizando m.o.i. (*multiplicity of infection*) de 0,1, ou seja, um vírus para cada dez células.

Os sobrenadantes obtidos após seis dias destas culturas infectadas constituíram o estoque viral e foram utilizados para a padronização da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real em testes de especificidade e sensibilidade.

3.1.3.2. Co-Infecção de culturas de células MT-4 pelos vírus BZ167 (B) e BR020 (F)

Após a obtenção dos estoques virais, foi realizada a infecção das culturas MT-4 com vírus dos dois subtipos (B e F) de HIV-1 simultaneamente (co-infecção) utilizando um m.o.i. (*multiplicity of infection*) de 0,1, ou seja, 0,05 para cada subtipo. Desta forma, pode-se dizer que havia uma partícula viral para cada dez células.

Para o cálculo do m.o.i foi necessário realizar o ensaio de CCID₅₀ (dose infecciosa

necessária para infectar 50% da cultura de células) para cada um dos vírus propostos.

Os sobrenadantes destas culturas co-infectadas foram coletados por um período de tempo, em intervalos de 3-4 dias, e foram utilizados para validação da técnica de PCR em tempo real.

3.1.3.3. Ensaio de CCID₅₀

Este ensaio consiste na inoculação de múltiplas culturas com diferentes diluições de vírus, para estimar o título viral capaz de infectar 50% da cultura. Esta quantidade de vírus é conhecida como **CCID₅₀**. Este método foi extraído de *Reed and Muench* (1938).

Os estoques virais foram diluídos em potência de base 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em meio RPMI-1640 (InvitrogenTM) e, para cada diluição, células em uma concentração de 10^3 células/ μ L foram acrescentadas. A mistura contendo vírus mais células foi submetida à centrifugação branda (500 x g) durante 1 hora para aumentar o contato vírus-célula e, assim, facilitar a infecção. Após a infecção, as células foram distribuídas em placa de cultura de 96 poços (12 poços para diluição viral). A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 5%, a 37°C durante aproximadamente 6 dias.

O ensaio é revelado utilizando o método descrito primeiramente por *Mosmann* (MOSMANN, 1983), no qual se utiliza o corante MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Este método de revelação se baseia na habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial de células viáveis clivar os anéis “amarelos” de tetrazolina do MTT e formar cristais de formazina de coloração azul escura. Estes cristais são bastante impermeáveis às membranas celulares e, desta forma, o resultado será o acúmulo destes cristais no interior de células saudáveis, sendo a viabilidade celular determinada pela coloração resultante, quantificada por um ensaio colorimétrico simples. O princípio básico é que, na maior diluição viral, haverá mais células azuis, ou seja, mais células viáveis (menos infectadas), enquanto que nas diluições menores haverá mais células infectadas (menos viáveis) e, portanto, amarelas.

O cálculo do CCID₅₀ foi realizado utilizando a média de absorbância dos 12 poços infectados, para cada diluição viral. O valor da média de absorbância dos 12 poços infectados pelo vírus puro foi subtraído do valor da média de absorbância dos 12 poços infectados pelo vírus mais diluído (10^{-4}). O valor desta subtração foi, então, considerado valor de referência, pois todos os valores acima deste foram considerados negativos para infecção viral e os abaixo deste valor, positivos. Por meio de cálculo descrito por *Muench* chegou-se ao valor de CCID₅₀.

3.2. Quantificação de referência

A partir de uma alíquota do sobrenadante de cultura de células MT-4 infectadas com cada vírus, BZ167 e BR020, em 6 dias de cultivo, foi realizada, em triplicata, a quantificação da carga viral de HIV-1, utilizando a técnica COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR, versão 1.5 seguindo as instruções do fabricante (*Roche Diagnostics*). Os limites de detecção desta quantificação encontram-se entre 400 e 750.000 cópias de RNA viral por mL de plasma para o mínimo e máximo respectivamente.

Esta quantificação foi realizada para estimar o cálculo de eficiência de todas as reações de PCR em tempo real, com o desenvolvimento de curvas de calibração.

3.3. Padronização da técnica de PCR em tempo real para detecção dos subtipos B e F de HIV-1 e triagem de seus recombinantes

3.3.1. Regiões genômicas, iniciadores (*primers*) e sondas escolhidos

Os isolados virais BZ167 e BR020, fornecidos pelo NIH-USA, apresentam seu genoma completamente seqüenciado, o que permitiu a busca de jogos de *primers* e sondas capazes de diferenciar os subtipos B e F de HIV-1.

O *software* “*Primer Express*” (Applied Biosystems - CA) foi utilizado para a procura de *primers* e sondas adequados. Os pares de *primers* foram selecionados quando potencialmente capazes de amplificar tanto o subtipo B quanto o F e, portanto, com no máximo três nucleotídeos de diferença entre as seqüências dos dois subtipos. Já as sondas selecionadas apresentaram três ou mais pontos de divergência entre os dois subtipos em estudo, de modo que fossem capazes de diferenciá-los.

Para os sistemas selecionados, as sondas específicas para o subtipo B foram marcadas com o fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM), enquanto que as sondas para o subtipo F foram marcadas com hexaclorofluoresceína (HEX). Apesar das reações em tempo real terem sido realizadas separadamente para os dois subtipos, esta diferença na marcação foi determinada no caso de se decidir, futuramente, realizar o ensaio em um único tubo, ou seja, em uma reação multiplex.

Todos os possíveis sistemas encontrados, *primers* e sondas, foram alinhados, utilizando o *software* MEGA v2.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis – Arizona State University*), com as seqüências dos isolados virais, e quando potencialmente discriminatórios, alinhados com várias seqüências brasileiras obtidas do banco de dados disponibilizado pelo Laboratório Nacional Los Alamos (hiv-web.lanl.gov), para verificar a abrangência em amostras de campo.

3.3.2. Curva de calibração

Os sobrenadantes de cultura quantificados, de cada isolado viral, passaram por uma diluição seriada de 1 para 5, em meio RPMI 1640 (Invitrogen™), para a realização da curva de calibração. Estes pontos da diluição passaram igualmente pelas etapas de processamento a seguir, para que o cálculo de eficiência e reprodutibilidade dos ensaios pudessem ser feitos.

3.3.2.1. Extração de RNA viral

A extração de RNA viral, a partir do sobrenadante de cultura de MT-4 infectadas, foi realizada de acordo com o protocolo de extração, *QIAmp Viral RNA purification kit*, fornecido pela Qiagen Inc.

3.3.2.2. Obtenção de DNA complementar (cDNA)

A reação para obtenção de DNA complementar (cDNA) foi necessária, uma vez que o material utilizado foi RNA e a amplificação deve ser feita sempre com DNA. O cDNA foi produzido sempre no mesmo dia da amplificação em tempo real, nunca sendo congelado e reutilizado, para que isto não prejudicasse a performance da reação.

Na reação, 5 µL do RNA extraído foram incubados com 7,5 ng/µL de oligonucleotídeos randômicos, 0,5 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP) e 6 µL de água a 65°C por 5 minutos, e então submetidos a choque térmico em gelo por um minuto. Após a adição à reação de 4 µL de tampão 5X (Tris-Cl, pH 8,3, 250mM; KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM), 5mM de ditioneitol (DTT), 2 unidades/µL de RNaseOUT™ (*Recombinant Ribonuclease Inhibitor*) e 10 unidades/µL da enzima transcriptase reversa Super Script™ III, seguiu nova incubação a 25°C por 10 minutos, para anelamento dos *primers* e a 50°C por 60 minutos para polimerização. A temperatura em que a enzima é inativa é de 70°C, por 15 minutos. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen™.

3.3.2.3. Reação com o sistema TaqMan®

Este sistema consiste na detecção de seqüências específicas por meio de uma sonda marcada fluorescentemente e quase totalmente complementar à seqüência alvo, permitindo a hibridização e detecção da mesma. A sonda possui, em sua extremidade 5', um composto fluorescente, chamado *reporter*, que será responsável pela emissão do sinal detectado pelo aparelho. Em sua outra extremidade, há um outro composto, chamado *quencher* que tem como função absorver a fluorescência emitida pelo *reporter*, enquanto eles estiverem a uma distância de cerca de 22-30 pares de bases. Por este motivo, este é o tamanho ideal para uma sonda no

sistema TaqMan[®]. Se esta distância for “quebrada” durante a reação, o que seria resultante da atividade exonuclease da enzima DNA polimerase utilizada, haverá emissão fluorescente do *reporter*, a qual será detectada pelo sistema óptico do aparelho de PCR em tempo real e, assim, correlacionada com números de ciclos e inversamente proporcional ao número inicial de cópias.

Para detectar discriminadamente os subtipos B e F, a amplificação foi realizada com os pares de *primers* e cada uma das sondas subtipo-específicas em tubos separados, apesar das sondas terem sido sintetizadas com fluoróforos diferentes para cada subtipo. Desta forma, a região amplificada foi exposta separadamente às sondas específicas para cada subtipo.

Para a realização da curva de calibração, as reações foram incubadas primeiramente a 95°C por dez minutos para ativação da enzima e garantia de abertura completa das fitas de cDNA. A partir de então, a reação prosseguiu a 94°C por 30 segundos, como temperatura de desnaturação, 45 segundos a 51°C, com um incremento de 0,1°C a cada ciclo, e a 60°C por mais 45 segundos, para anelamento dos *primers* e extensão pela DNA polimerase por 45 ciclos. A sonda, que possui uma temperatura de anelamento cerca de 10°C maior que a dos *primers*, consegue se anelar no momento em que o DNA é simples fita, quando há queda de temperatura na passagem da desnaturação para extensão.

Utilizaram-se, nesta reação, 5 µL do produto da reação de transcrição reversa, 0,6 µM de cada *primer*, 0,2 µM de sonda, 17,5 µL de tampão 2X (contendo 3 mM de magnésio, dNTP e estabilizadores), 5 mM de sulfato de magnésio, 5 unidades/µL da enzima DNA polimerase *Taq Platinum*[®] e 23,9 µL de água para obter volume final de reação de 50 µL. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen[™]. Os *primers* e sondas foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*).

Esta reação foi otimizada realizando-se a titulação de sulfato de magnésio (MgSO₄). Descobrir a concentração ideal de magnésio a ser utilizada é essencial para se obter a melhor performance da reação, já que a detecção do sinal acontece durante a ação da enzima Taq polimerase, enzima esta que possui relação direta com o sal em questão. A variação de concentração de magnésio utilizada na titulação foi entre 4 e 6 milimolares (mM), sendo que o tampão utilizado na reação de PCR em tempo real já continha 3 mM. A melhor concentração de magnésio encontrada para todas as reações foi de 5 mM, sendo necessário acrescentar 2 µL do Sulfato de Magnésio a 50 mM para cada reação.

Outro procedimento de otimização realizado foi uma matriz de concentração de *primers*, que representa uma titulação dos mesmos, variando também os valores dos *primers* senso (*forward*) e anti-senso (*reverse*) em uma mesma reação. Esta estratégia é necessária para encontrar a melhor concentração de *primer* a ser utilizada para obter a melhor performance sem

excessos, o que poderia favorecer a formação de dímeros de *primers*. E a razão de utilizar diferentes concentrações de cada um dos *primers* em uma mesma reação se deve ao fato destes não necessariamente apresentarem a mesma eficiência na mesma concentração, principalmente em se tratando de *primers* degenerados. A titulação foi realizada utilizando as concentrações de 0,4 e 0,6 μM , sendo que esta última foi assumida como a melhor concentração para cada um dos *primers* em todas as reações.

3.3.2.4. Cálculo de eficiência e reprodutibilidade

Em teoria, os pontos de diluição de uma amostra de concentração conhecida são amplificados e o momento em que a fluorescência crescente ultrapassa a fluorescência basal é indicado pelo aparelho de PCR em tempo real como *Cycle Threshold* (Ct), que pode, então, ser referenciado com a concentração inicial daquela amostra. O Ct, assim, se relaciona com a concentração inicial da amostra amplificada.

Para verificarmos a eficiência da reação, os pontos de diluição de uma amostra de concentração conhecida foram amplificados e então foram obtidos os valores de Ct em replicatas, permitindo a construção de uma curva padrão, ou de calibração, em que o eixo das abscissas (x) se refere à concentração da amostra em escala logarítmica, enquanto o eixo das ordenadas (y) aos valores de Ct ($\log[\text{Amostra}] \times \text{Ct}$). Para o cálculo de eficiência de cada uma das PCR desenvolvidas, portanto, foram realizadas diluições de uma alíquota de concentração conhecida dos isolados virais BZ167 e BR020 e que foram utilizadas para a construção da curva padrão, para que desta fossem obtidos valores de inclinação (*slope*) e linearidade do ensaio (r^2 , coeficiente de correlação de Pearson).

Para o cálculo de eficiência foi utilizada a fórmula descrita por Pfaffl (PFAFFL, 2001):

$$\text{Eficiência} = 10^{\left(\frac{-1}{\text{inclinação}}\right)}$$

Para verificarmos a reprodutibilidade de cada ensaio, foi calculado o coeficiente de variação para cada ponto da diluição seriada, nas repetições de cada reação, já que este indica o quanto os dados coletados em um ensaio estariam dispersos em torno da média. O coeficiente de variação foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{CV} = \left(\frac{\sigma_P}{M}\right) \cdot 100$$

onde, CV é a variabilidade expressa em porcentagem, DP é o desvio padrão entre os valores de Ct encontrado para cada ponto da diluição de todas as repetições das curvas de calibração, M é a média aritmética destes valores de Ct.

3.3.3. Reações de especificidade

Para que ocorresse a diferenciação dos isolados virais, quanto aos subtipos, primeiros ensaios realizados com os isolados virais provenientes de cultura demonstraram que aplicar a reação padronizada de PCR em tempo real diretamente para o cDNA obtido não era suficiente.

Uma amplificação prévia, com *primers* externos aos das reações desenvolvidas, se fez necessária. Os *primers* utilizados para esta estratégia, bem como sua posição em relação ao HXB2 estão esquematizados na tabela seguinte:

Tabela 1: Descrição dos *primers* utilizados para amplificação das regiões genômicas do HIV-1.

Região Estudada	Forward Primer	Reverse Primer
Protease e Transcriptase Reversa (RT)	^a Kozal 1 5'CAGAGCCAACAGCCCCACCA3'	^a Kozal 2 5'TGTCAATGACATACAGAAGTTAGTG GGGAA3'
	Pos. Gen.: 2147 a 2166	Pos. Gen.: 3308 a 3337
Integrase	^b Int In 5' 5'AGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAA TAAT3'	^b Int In 3' 5'TTGACTTTGTGGGTTGTAGGG3'
	Pos. Gen.: 4086 a 4114	Pos. Gen.: 4653 a 4673
gp120	^c LB outer 5' 5'TACAATGTACACATGGAATT3'	^c LB outer 3' 5'AGCAGCAGGAAGCACTATGGGC3'
	Pos. Gen.: 6958 a 6977	Pos. Gen.: 7796 a 7817
gp41	^d 3 in F 5'CGCTGACGGTACAGGCC3'	^d 2 in R 5'GCACTATTCTTTAGTCC3'
	Pos. Gen.: 7831 a 7847	Pos. Gen.: 8639 a 8656

Legenda: ^a KOZAL *et al.*; ^b LIMA, 2009; ^c SIMMONDS *et al.*, 1990; ^d SA-FILHO, 2003.

Assim, 5 µL de cDNA obtido de cada um dos isolados foram adicionados a uma reação de volume final de 50 µL, contendo 5µL de tampão 10X, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 5 unidades/µL da enzima DNA polimerase *Taq Platinum*® e 0,2 µM de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), para cada uma das regiões estudadas, gerando cinco PCR no total, como descrito na tabela acima. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen™. Estas reações foram incubadas primeiramente a 94°C por dez minutos e a partir de então, prosseguiram

por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e por um minuto e 30 segundos a 72°C por 15 ciclos, com exceção da reação para a transcriptase reversa, em que se viu necessária, para a etapa seguinte, a amplificação de 35 ciclos.

Foi realizada, então, a reação de especificidade das sondas, amplificando os isolados virais com suas sondas subtipo-específicas e, separadamente, com a sonda específica ao outro subtipo, para confirmação da ausência de reação cruzada entre as sondas. Os produtos da primeira amplificação foram diluídos em uma proporção de 1 para 10, e 5 µL desta diluição aplicados, em duplicata, na reação padronizada para PCR em tempo real, como descrita no item 3.3.2.3, com exceção novamente da reação padronizada para a região da transcriptase reversa, na qual utilizaram-se 10 µL da diluição.

A ciclagem utilizada no aparelho de PCR em tempo real consistiu em uma incubação de 95°C por dez minutos para ativação da enzima e garantia de abertura completa dos fragmentos de DNA, seguida de 5 ciclos de baixa eficiência de 20 segundos a 94°C e 40 segundos a 50°C, e, então, de 40 ciclos de alta eficiência de 20 segundos a 94°C e 40 segundos a 60°C.

Tanto na primeira amplificação, quanto na PCR em tempo real, utilizou-se também como amostra um controle negativo que se baseava em um RNA extraído de um plasma humano sabidamente negativo para HIV. A extração deste controle negativo foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.2.1, e a reação de transcrição reversa do RNA de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.2.2.

3.3.4. Reação com SYBR Green®

Este kit possui o sistema de marcação fluorescente SYBR Green® que é um intercalante de DNA, ou seja, incorpora-se na dupla fita, proporcionando sinal fluorescente a qualquer produto amplificado, fornecendo, portanto, a vantagem da realização de uma curva de dissociação de todo produto formado ao final da reação de amplificação, permitindo a visualização de amplificação inespecífica. Este reagente, portanto, foi utilizado ao final da amplificação em tempo real para realizar uma curva de dissociação e, assim, verificar especificidade da mesma.

Para obter uma reação contendo 12,5 µL como volume final foram utilizados 6,5 µL de Mix SYBR Green® (Applied Biosystems - CA), 1 µL de água e 5 µL do produto da amplificação dos testes de especificidade dos sistemas TaqMan® desenvolvidos.

As reações foram incubadas primeiramente a 95°C por cinco minutos para garantia de abertura completa dos fragmentos de DNA e, então, a temperatura foi programada para decrescer de meio em meio grau a cada 10 segundos. Com a repetição de 80 vezes deste lento decréscimo,

a temperatura da reação chega a 55°C, garantindo que todos os fragmentos de DNA estarão na forma de dupla-fita, com SYBR Green[®] intercalado, emitindo fluorescência quando excitado.

3.3.5. Ensaio de PCR em Tempo Real para sobrenadante de co-cultivo

O sobrenadante da cultura de co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020 foi coletado desde o ponto zero da co-infecção até a quinta passagem.

O RNA destes sobrenadantes foi extraído de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.2.1 e a transcrição reversa, de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.2.2.

Para aplicar os sistemas de PCR em tempo real desenvolvidos neste trabalho e, assim, detectar o subtipo predominante nestas coletas de co-cultivo, foi utilizado o mesmo protocolo desenvolvido para testar a especificidade destes sistemas.

3.3.6. Análise de resultados

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um aparelho iCycler, *BIO-RAD Laboratories*. A intensidade de fluorescência foi monitorada a cada ciclo, e as amostras foram consideradas positivas quando esta intensidade ultrapassou o limiar, *threshold*, estabelecido para cada reação em questão.

3.4. Validação dos sistemas desenvolvidos com amostras clínicas (testes futuros)

3.4.1. Casuística

Casuística: 157 amostras de pacientes infectados pelo HIV-1 submetidos à genotipagem pela Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO), encaminhados ao Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo.

3.4.2. Extração de RNA viral das amostras clínicas

Das amostras clínicas foi utilizado o plasma, de onde se obtêm as partículas virais circulantes, que é o interesse de estudo deste trabalho. O RNA deste plasma foi extraído pela metodologia da RENAGENO, utilizando o kit SISTEMA DE GENOTIPAGEM DE HIV-1 ViroSeq[™] (ABBOTT LABORATÓRIOS DO BRASIL LTDA).

3.4.3. Obtenção de cDNA

A reação de transcrição reversa foi realizada como descrito no item 3.3.2.2.

3.4.4. Ensaio futuro de PCR em tempo real para amostras clínicas

Estas amostras clínicas foram processadas para que seu subtipo fosse determinado por uma metodologia já validada e padrão, que é a reação de seqüenciamento e análise filogenética, para comparação e validação da metodologia de PCR em tempo real desenvolvida neste trabalho.

Futuramente, o ensaio de discriminação dos subtipos, como foi realizado nos ensaios de especificidade, será aplicado a estas amostras clínicas.

3.4.5. Amplificação e seqüenciamento de amostras clínicas nas regiões escolhidas para o uso da PCR em tempo real

Das cinco regiões, para as quais um sistema de PCR em tempo real foi desenvolvido, três delas (integrase, gp120 e gp41) exigiram a padronização de PCR para amplificação e seqüenciamento de um fragmento que contivesse a região em que os *primers* e sondas do sistema desenvolvido se anelassem.

Regiões protease e RT (*pol*)

Como as amostras agora utilizadas foram provenientes do banco de amostras da RENAGENO, as regiões da protease e da RT já se encontravam amplificadas e seqüenciadas, sendo que as seqüências geradas pelo kit ViroSeq™ (ABBOTT), que consiste na utilização de sete *primers*, foram utilizadas para uma nova edição, voltada para os objetivos deste trabalho, utilizando o *software Sequencher*, versão 4.0. Isto porque a edição realizada na RENAGENO deve levar em consideração as populações minoritárias, ou seja, qualquer sinal de dupla população, que poderia ser pertinente na análise de geração de resistência aos anti-retrovirais. Já no caso deste trabalho, reportar as populações minoritárias traria excessiva presença de duplas populações, o que prejudicaria a construção de uma árvore filogenética mais fiel ao ambiente que a PCR em tempo real iria encontrar.

Região da gp120 (*env*).

Os *primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento, bem como a sua posição genômica em relação ao HXB2, estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 2: Descrição dos *primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento da região da gp120 (*env*) do HIV-1.

<i>Primers</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Posição Genômica</i>
<i>Forward Primer - 1º round</i>	^a ED5 5' 5'ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG3'	6560 - 6582
<i>Reverse Primer - 1º round</i>	^a ED12 5'AGTGCTTCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG3'	7782 - 7811
<i>Forward Primer - 2º round</i>	^a ED5 5' 5'ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG3'	6560 - 6582
<i>Reverse Primer - 2º round</i>	^b LB outer 3' 5'AGCAGCAGGAAGCACTATGGGC3'	7796 - 7817
<i>Forward Primer - Seqüenciamento</i>	^b LB inner 5' 5'GCAGTCTAGCAGAAGAAGA3'	7015 - 7030
<i>Forward Primer - Seqüenciamento</i>	^c 2Seq17F 5'CCAACAACAATACAAGAAAAAG3'	7120 - 7141
<i>Forward Primer - Seqüenciamento</i>	^c 2Seq18F 5'GAATTTTCTACTGTAATAC3'	7365 - 7384
<i>Reverse Primer - Seqüenciamento</i>	^a ES 8 5'TGAGGGACAATTGGAGAAGTGGGTCATAGCTGTTTCCTG3'	7648 - 7683
<i>Reverse Primer - Seqüenciamento</i>	^b LB outer 3' 5'AGCAGCAGGAAGCACTATGGGC3'	7796 - 7817

Legenda: ^a DELWART *et al.*, 1993; ^b SIMMONDS *et al.*, 1990; ^c SA-FILHO, 2003.

A reação utilizada para a primeira etapa de amplificação constituiu-se de 5µL de tampão 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 0,25 unidades/µL da enzima DNA polimerase *Taq Platinum*® e 0,2 µM de cada um dos *primers* ED5 e ED12, para um volume final de 50µL. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen™. As reações foram incubadas primeiramente a 94°C por dez minutos e a partir de então, prosseguiu por 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e por um minuto e 30 segundos a 72°C por 35 ciclos. Do produto gerado, 5 µL foram transferidos para a segunda etapa que, por sua vez, consistiu dos mesmos reagentes nas mesmas concentrações da etapa anterior, mas utilizando os *primers* ED5 e LB outer 3' respectivamente como *forward* e *reverse*. A ciclagem à qual esta reação foi submetida é idêntica à utilizada na primeira etapa.

Região da gp41 (*env*).

Os *primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento, bem como a sua posição genômica em relação ao HXB2, estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 3: Descrição dos *primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento da região da gp41 (*env*) do HIV-1.

<i>Primers</i>	Seqüência	Posição Genômica
<i>Forward Primer- 1º round</i>	^a 3outF 5'AGCAGCAGGAAGCACTATGGGC3'	7796 - 7817
<i>Reverse Primer - 1º round</i>	^a 2outR 5'TTTGACCACTTGCCACC3'	8800 - 8816
<i>Forward Primer - 2º round</i>	^a 3inF 5'CGCTGACGGTACAGGCC3'	7831 - 7847
<i>Reverse Primer - 2º round</i>	^a 2inR 5'GCACTATTCTTTAGTTCC3'	8639 - 8656
<i>Forward Primer - Seqüenciamento</i>	^a 2Seq20F 5'GGATCAACAGCTCCTAGG3'	7988 - 8005
<i>Reverse Primer - Seqüenciamento</i>	^a Seq22R 5'CCTACTATCATTATGAATA3'	8275 - 8293

Legenda: ^a SA-FILHO, 2003.

A reação utilizada para a primeira etapa de amplificação constituiu-se de 5µL de tampão 10X, 3,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 0,25 unidades/µL da enzima DNA polimerase *Taq Platinum*® e 0,2 µM de cada um dos *primers* 3outF e 2outR, para um volume final de 50µL. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen™. As reações foram incubadas primeiramente a 94°C por dez minutos e a partir de então, prosseguiu por 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e por um minuto e 30 segundos a 72°C por 35 ciclos. Do produto gerado, 5 µL foram transferidos para a segunda etapa que, por sua vez, consistiu dos mesmos reagentes nas mesmas concentrações da etapa anterior, mas utilizando os *primers* 3inF e 2inR respectivamente como *forward* e *reverse*. A ciclagem à qual esta reação foi submetida é idêntica à utilizada na primeira etapa.

Região da Integrase (*pol*).

Os *primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento, bem como a sua posição genômica em relação ao HXB2, estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 4: Descrição dos *primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento da região da integrase (*pol*) do HIV-1.

<i>Primers</i>	Seqüência	Posição Genômica
<i>Forward Primer - 1º round</i>	^a Int out 5' 5'GCTTTGCAGGATTCGGGATTAG3'	4002 - 4023
<i>Reverse Primer - 1º round</i>	^b BO3R 5'TAAGATGTTTCAGCTTGATCTC3'	4726 - 4746
<i>Forward Primer - 2º round</i>	^a Int in 5' 5'AGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAATAAT3'	4086 - 4114
<i>Reverse Primer - 2º round</i>	^a Int out 3' 5'GTTTCAGCCTGATCTCTTACCTGTCC3'	4716 - 4740
<i>Forward Primer - Seqüenciamento</i>	^a Int For 5'ACCTGCCACCTGTAGTAGCAAAA3'	4309 - 4330
<i>Forward Primer - Seqüenciamento</i>	^b BO3S 5'AAATGAACAAGTAGATAAATTAGT3'	4181 - 4204
<i>Reverse Primer - Seqüenciamento</i>	^a Int in 3' 5'TTGACTTTGTGGGTTGTAGGG3'	4653 - 4673

Legenda: ^a LIMA, 2009; ^b SA-FILHO, 2003.

A reação utilizada para a primeira etapa de amplificação constituiu-se de 5µL de tampão 10X, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 0,25 unidades/µL da enzima DNA polimerase *Taq Platinum*® e 0,2 µM de cada um dos *primers* Int Out 5' e BO3R, para um volume final de 50µL. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen™. As reações foram incubadas primeiramente a 94°C por dez minutos e a partir de então, prosseguiu por 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e por um minuto a 72°C por 35 ciclos. Do produto gerado, 5 µL foram transferidos para a segunda etapa que, por sua vez, consistiu dos mesmos reagentes nas mesmas concentrações da etapa anterior, mas utilizando os *primers* Int In 5' e Int Out 3' respectivamente como *forward* e *reverse*. A ciclagem à qual esta reação foi submetida é idêntica à utilizada na primeira etapa.

3.4.6. Purificação de produto de PCR

A etapa de purificação do produto de PCR foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pela Invitrogen™, *ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit*. Esta reação foi necessária para a remoção de reagentes remanescentes da PCR que poderiam prejudicar a etapa posterior, o seqüenciamento deste produto de amplificação. Excessos de reagentes como desoxinucleotídeos criariam um desbalanço com os didesoxinucleotídeos da reação de seqüenciamento, prejudicando em muito a eficiência do seqüenciamento.

3.4.7. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada tanto após a reação de *Nested* PCR, quanto após a reação de purificação do produto desta. No primeiro caso, como é utilizado um padrão de peso molecular na eletroforese, este procedimento foi realizado para confirmar se o produto de amplificação corresponde ao fragmento de interesse (se possui o peso molecular esperado) e se este apresenta também produtos amplificados inespecificamente.

Após a purificação, a eletroforese permite que se determine a quantidade ideal do fragmento de DNA de interesse amplificado a ser aplicada na reação de seqüenciamento, uma vez que esta reação pode ser prejudicada tanto por escassez do DNA a ser seqüenciado, como pelo excesso deste.

Para este procedimento, foi utilizado gel de agarose 1%, tampão Tris borato-EDTA 0,5X (TBE 0,5X) e o corante *Gel Red* (Uniscience do Brasil). Foram aplicados 5 µL de produto de amplificação e 1µL de *Blue Juice* 1X (Invitrogen™), que é um carreador de DNA para sua aplicação no gel.

3.4.8. Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit *BigDye Terminator* (Applied Biosystems - CA) seguindo as especificações do fabricante e utilizando os *primers* especificados no item 3.4.5 para cada uma das regiões amplificadas.

A reação de seqüenciamento foi aplicada em uma placa de 96 poços, sendo que cada reação continha 6 µL de produto de PCR purificado e 9 µL de uma solução preparada para cada *primer*. Esta reação foi submetida à ciclagem de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Após a purificação do produto da reação de seqüenciamento, que consistiu na precipitação com etanol 70%, e a desnaturação das fitas a 94°C, com aplicação de formamida, a placa, então, foi aplicada em um seqüenciador ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems - CA). A coleta dos dados gerados foi realizada com o ABI PRISM® DNA *Sequencing Analysis Software*, enquanto que a edição manual dos resultados realizada com o *Sequencher Software* versão 4.0.

3.4.9. Análise filogenética

Após a correção e edição, as seqüências geradas para todas as regiões foram alinhadas automaticamente pelo programa Clustal X v2.0.10 e o alinhamento corrigido manualmente,

utilizando a ferramenta Se-AI, permitindo a análise filogenética das seqüências geradas utilizando o pacote de análises PHYLIP versão 3.5. O algoritmo de escolha foi o Neighbor-Joining, utilizando a matriz de distância baseada no cálculo de Kimura dois parâmetros. O padrão de distribuição das seqüências ao longo do diagrama filogenético foi avaliado estatisticamente com SEQBOOT por meio do método de Bootstrap com 100 repetições. Uma árvore filogenética consenso foi então construída com o auxílio da ferramenta CONSENSE presente no pacote PHYLIP. As árvores obtidas foram visualizadas usando-se a ferramenta FigTree versão 1.2.1.

4. RESULTADOS

4.1. Cálculo de CCID₅₀ (*Cell Culture Inhibitory Dose*).

O cálculo do CCID₅₀ foi realizado, permitindo encontrar o valor do título do vírus BZ167 e BR020 capaz de infectar 50% da cultura de MT-4.

Tabela 5: Descrição dos valores de CCID₅₀/mL obtidos para os vírus BZ167 e BR020 em células MT-4.

Vírus	CCID ₅₀ /mL
HIV-1 BZ167	4.641.588,83
HIV-1 BR020	3.511,19

4.2. Quantificação de referência

Foi realizada, em triplicata, a quantificação de HIV-1 do sobrenadante da cultura infectada com cada um dos isolados virais, e de uma diluição 1:10 até que os valores de quantificação pudessem ser determinados dentro do limite superior de detecção do teste, que é uma carga viral máxima de 750.000 cópias de RNA viral por mL de plasma. Os valores obtidos e a média final das triplicatas estão representados nas tabelas abaixo:

Tabela 6: Valores obtidos para o teste de carga viral do subtipo B (BZ167) de HIV-1 em triplicata e sua média.

Diluição do vírus de subtipo B (BZ167)	Replicata 1 (cópias/mL)	Replicata 2 (cópias/mL)	Replicata 3 (cópias/mL)	Média da triplicata (cópias/mL)
Puro	>750.000	>750.000	>750.000	>750.000
1 para 10	562.000	410.000	331.000	434.333

Utilizando o fator de diluição 10, estimou-se, portanto, a carga viral do sobrenadante de cultura infectada pelo isolado viral BZ167 em 4.343.330 cópias de RNA viral por mL.

Tabela 7: Valores obtidos para o teste de carga viral do subtipo F (BR020) de HIV-1 em triplicata e sua média.

Diluição do vírus de subtipo B (BZ167)	Replicata 1 (cópias/mL)	Replicata 2 (cópias/mL)	Replicata 3 (cópias/mL)	Média da triplicata (cópias/mL)
Puro	494.000	632.000	463.000	529.667

Para o sobrenadante da cultura infectada pelo isolado viral BR020, a carga viral estimada foi de 529.667 cópias de RNA viral por mL.

Este teste foi realizado para que a curva padrão das reações de PCR em tempo real desenvolvida fosse construída. É indicado que a curva padrão de um material proveniente de cultura seja realizada utilizando uma diluição de 1:5 do material quantificado (NOLAN *et al.*, 2006). Desta forma, estimou-se o valor da quantificação das diluições partindo deste sobrenadante quantificado, como expresso na tabela a seguir.

Tabela 8: Valores estimados para as diluições seriadas (1:5) dos isolados virais BZ167 e BR020, a partir da carga viral calculada para o sobrenadante coletado da cultura destes isolados.

Diluições	BZ167 (cópias/mL)	BR020 (cópias/mL)
Puro	4.343.330	529.667
1 para 5	868.666	105.933
1 para 25	173.733	21.187
1 para 125	34.747	4.237
1 para 625	6.949	847
1 para 3125	1.390	169

4.3. Padronização da técnica de PCR em tempo real para detecção dos subtipos B e F de HIV-1 e triagem de seus recombinantes

4.3.1. Regiões genômicas escolhidas.

A escolha das regiões genômicas para o desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real, *pol* e *env*, foi feita baseando-se nas estruturas recombinantes brasileiras entre os subtipos B e F descritas no trabalho “*Identification of Two HIV-1 Circulating Recombinant Forms in Brazil.*” (Sá Filho et al, 2006), que inclui as formas recombinantes circulantes (CRF) 28 e 29.

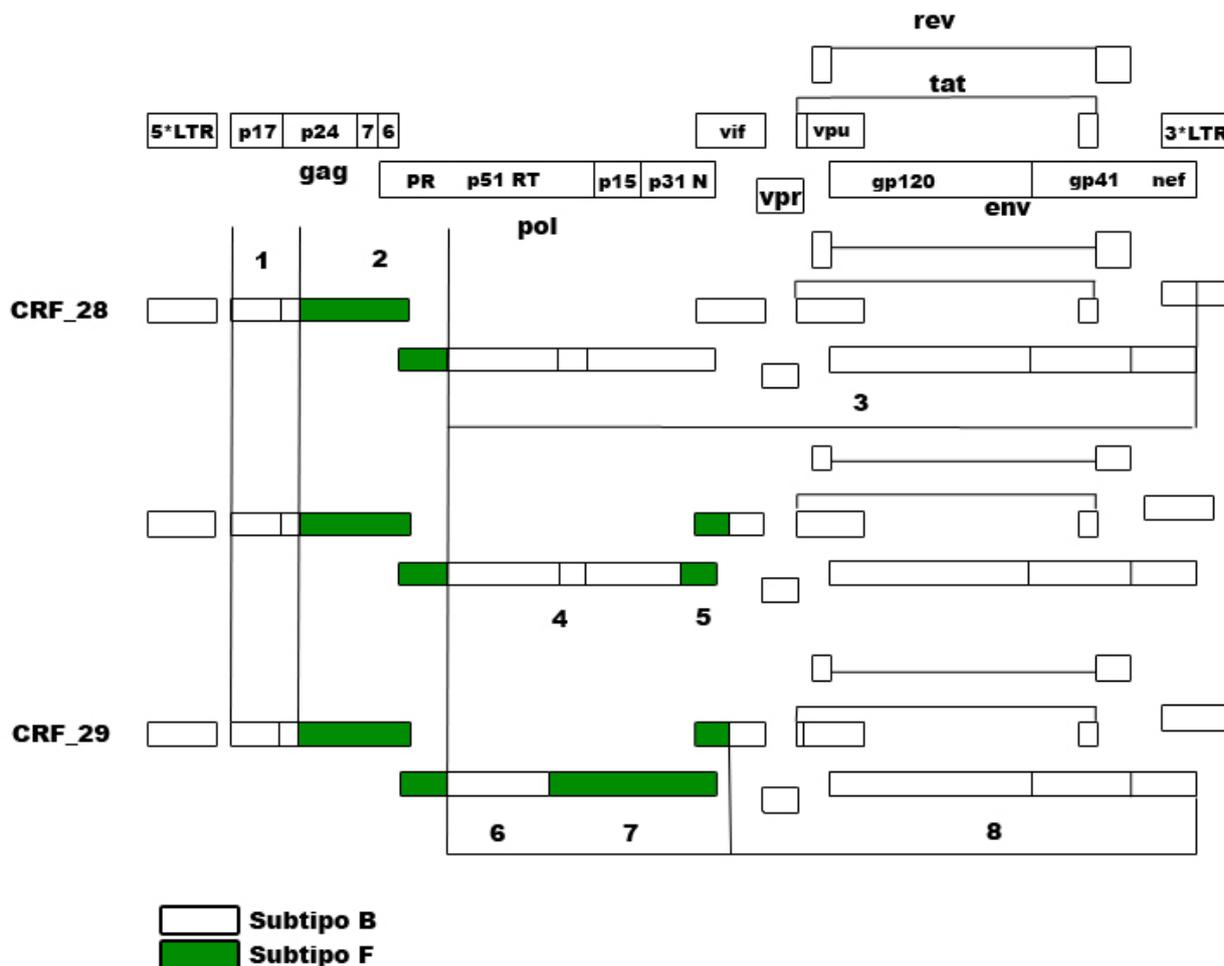


Figura 2: A. Figura esquemática representando o genoma de HIV-1.

B. Figura esquemática do seqüenciamento completo das estruturas recombinantes brasileiras. O subtipo F apresenta-se em verde, e o B, em branco. Figura extraída do trabalho “*Identification of Two HIV-1 Circulating Recombinant Forms in Brazil.*” (Sá Filho et al, 2006).

Sendo CRF uma estrutura recombinante entre subtipos, a estratégia para sua detecção deveria ter sido de tentar encontrar regiões do genoma que apresentassem diferentes subtipos. Isto pôde ser observado na região da protease (*pol*), que é encontrada com o subtipo F nestas estruturas recombinantes, e na região do envelope (*env*), que é encontrada com o subtipo B. Portanto, as primeiras regiões escolhidas para a padronização da PCR em tempo real foram estas regiões genômicas, como esquematizado na figura a seguir (regiões I e II):

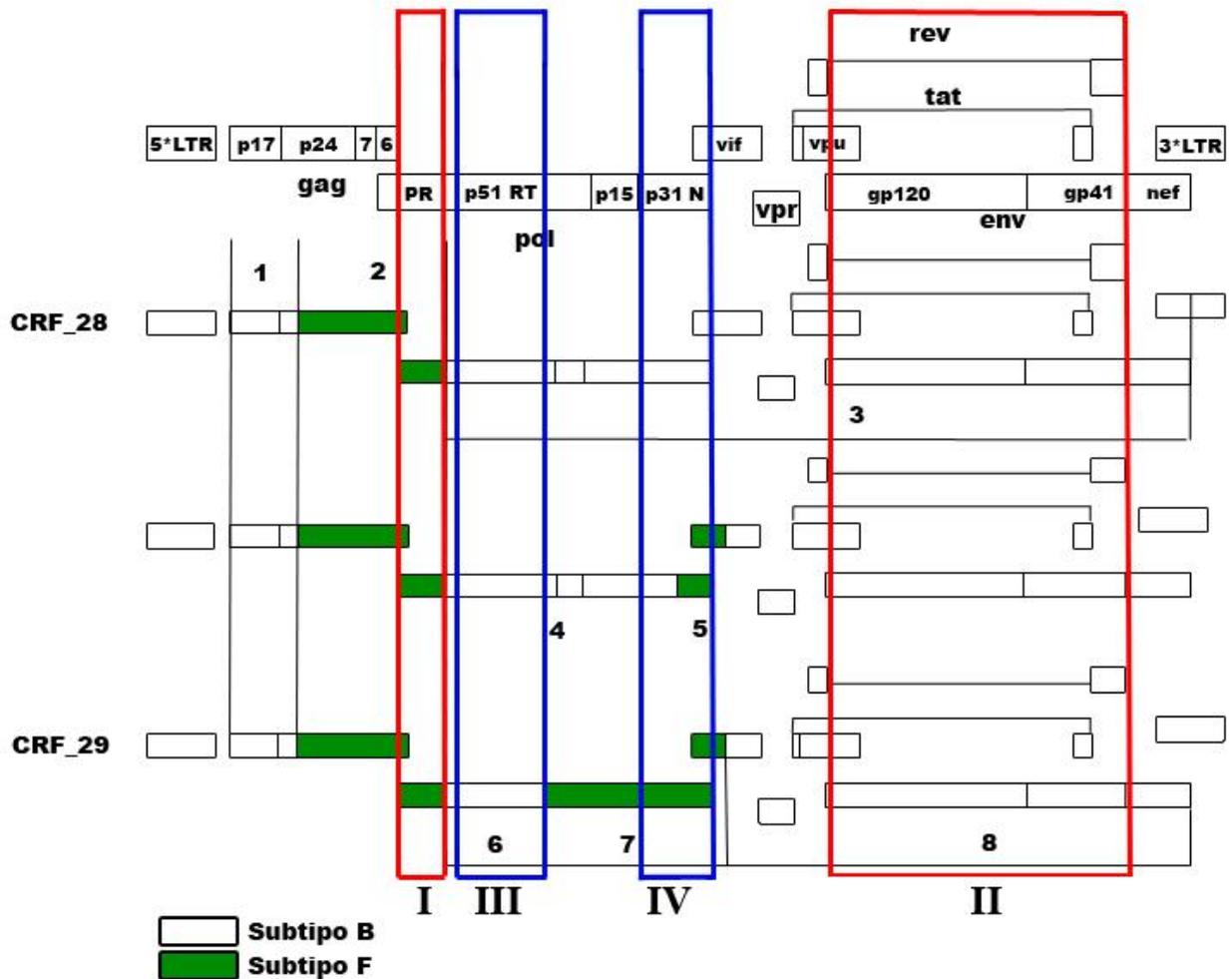


Figura 3: Destaque das regiões potencialmente capazes de detectar e diferenciar as CRF brasileiras 28 e 29: I – protease (*pol*); II – envelope; III – transcriptase reversa (*pol*); IV – integrase (*pol*). Figura adaptada do trabalho “*Identification of Two HIV-1 Circulating Recombinant Forms in Brazil.*” (Sá Filho et al, 2006).

Algumas outras regiões genômicas, indicadas na figura anterior, foram estudadas pois também auxiliariam na triagem destas CRF, contribuindo com sua identificação, como a região da transcriptase reversa, dentro de *pol*, (III), ou, então, contribuiriam para a diferenciação entre as próprias CRF, como a região da integrase, também dentro de *pol*.

4.3.2. Primers e sondas escolhidos

I. Região da protease (*pol*).

Alguns jogos de *primers* e sondas foram encontrados para esta região, sendo que em alguns casos, mais de uma opção de *primer* foi encontrada. Destas opções, analisando as diferenças entre as seqüências dos dois subtipos, BZ167 e BR020, o jogo que pareceu ser o melhor foi o seguinte, denominado PROT DT:

Tabela 9: PROT DT , jogo de *primers* e sondas selecionado para a região da protease (*pol*).

	Seqüência de Nucleotídeos	Tm	Pos. Gen.
Forward Primer (5'→3')	ATCACTCTTTGGCAACGACCC	60°	2259 - 2279
Reverse Primer (5'→3')	AACCTCCAATTCCTATCA	59°	2389 - 2409
Sonda Subtipo-Específica B (5'→3')	AATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAAC CAA	68°	2357 - 2385
Sonda Subtipo-Específica F (5'→3')	CAGTATTAGAAGACATAAATTTGCCA GGAAAATGGAAAC	69°	2344 - 2382

Legenda: Tm = Temperatura de *Melting*; Pos. Gen.= Posição Genômica em relação ao genoma HXB2

Nas sondas subtipo-específicas foram encontrados quatro nucleotídeos de diferença em relação ao outro subtipo que não o específico. Estas diferenças estão destacadas no alinhamento a seguir:

Posição em Rel.ao HXB2	2.259					2.318
F1.BR.93.93BR020_1	ATCACTCTTT	GGCAACGACC	CCTAGTCACA	ATAAGAGTAG	GGGGACAGCT	AAAGGAAGCT
B.BR.89.BZ167C.....	G...A.A...	...G..AT.
FORWARD PRIMER PROT DT	ATCACTCTTT	GGCAACGACC	C-----	-----	-----	-----
Posição em Rel.ao HXB2	2.329					2.388
F1.BR.93.93BR020_1	CAGGAGCAGA	TGATACAGTA	TTAGAAGACG	TAAATTTGCC	AGGAAAATGG	AAACCAAAAA
B.BR.89.BZ167AA	.G.....G....
SONDA PROT DT F	-----	-----CAGTA	TTAGAAGACG	TAAATTTGCC	AGGAAAATGG	AAAC-----
SONDA PROT DT B	-----	-----	-----AA	TGAATTTGCC	AGGAAATGG	AAACCAA---
Posição em Rel.ao HXB2	2.379					2.438
F1.BR.93.93BR020_1	AAACCAAAAA	TGATAGGGGG	AATTGGAGGT	TTTATCAAAG	TAAAACAGTA	TGATAGCATA
B.BR.89.BZ167G.....	...CAG...
REVERSE PRIMER PROT DT	-----	TGATAGGGGG	AATTGGAGGT	T-----	-----	-----

Figura 4: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da protease (*pol*). A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020.

Foi realizado um alinhamento com várias seqüências brasileiras obtidas do banco de dados disponibilizado pelo Laboratório Nacional Los Alamos (hiv-web.lanl.gov), para verificar a abrangência em amostras de campo.

Posição em Rel.ao HXB2	2.259					2.318
F1.BR.93.93BR020_1	ATCACTCTTT	GGCAACGACC	CCTAGTCACA	ATAAGAGTAG	GGGGACAGCT	AAAGGAAGCT
F1.BR.89.BZ126	A.....A.....G.....	..G.....
F1.BR.89.BZ163	A.....A.....R.....	..A.....
F1.BR.01.01BR125G.....
F1.BR.01.01BR087T...T...A.....G.....
29_BF.BR.99.99UFRJ_1AGA.....
BF.BR.94.94BR_RJ_97A.....T.....	..G.....
BF.BR.99.99UFRJ_2G.....A.....G...
BF.BR.94.94BR_RJ_41T.A.A.....A.....
BF.BR.99.99UFRJ_16A.A.....
BF.BR.99.99UFRJ_9A.A.....A.....	..A.....
BF.BR.94.94BR_RJ_59A.....
BF.BR.94.94UFRJ_58
BF1.BR.99.BREPM107T.....	G...A.....G.....	..C.....
BF1.BR.99.BREPM108G.....A.....G.....C
29_BF.BR.02.BREPM119T.....GA.A.....
BF.BR.99.BREPM275	AG.....A.	G...AG.....G.A.....	..C.....
BF.BR.99.BREPM278	A.....GA.AG.....G.A.....	..C.....
BF1.BR.99.BREPM11871AG.....
BF1.BR.99.BREPM11884AG.....	A.....
BF1.BR.99.BREPM11931	A.....ACAG.....G.A.....	..G.....
BF1.BR.99.BREPM11932	A.....ACAG.....G.A.....	..G.....
29_BF.BR.99.BREPM11948	A.....AGA.....
28_BF.BR.99.BREPM12313T.....GA.....T.....
28_BF.BR.99.BREPM12609AG.....G.....
28_BF.BR.99.BREPM12817	AA.....	G...AGA.....	A.....C.....
BF1.BR.00.BREPM13853A.A.....	..AT.....	..G.....
29_BF.BR.01.BREPM16704AG.....
BF1.BR.01.01BR042A.....G.....
BF1.BR.01.01BR047A.....
BF1.BR.01.01BR226	A.....A.AC.....A..G...
BF1.BR.01.01BR323	AG...T...A.A.....A.....
BF1.BR.02.02BR033	A.....A.....A.....	..G.....
BF1.BR.02.02BR034	A...T...A.A.....	A.....	..T.....
B.BR.89.BZ167C.....	G...A.A.....G..AT.
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	G.....C.....AGA.....G.A.....
B.BR.02.02BR013C.....AGA.....	A..G.A.....
B.BR.02.02BR011	AG.....A.....G.A.....C
B.BR.02.02BR008G.....	A.C...T.AGA.....G..AT.
B.BR.02.02BR002C.....	G...AGA.....G.....
BF.BR.99.BREPM269C.....AGA.....G.A.....
BF1.BR.02.02BR005	A.C.....AGA.....G..AT.	..G.....
BF1.BR.02.02BR006	A.T.....AGA.....G..AG.G
FORWARD PRIMER PROT DT	ATCACTCTTT	GGCAACGACC	C-----	-----	-----	-----

Figura 5a: Alinhamento de seqüências da região da protease (*pol*) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados para este sistema. A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020; as primeiras seqüências, em preto, são do subtipo F, seguidas por seqüências do subtipo B, em cinza.

Posição em Rel.ao HXB2	2.329					2.388
F1.BR.93.93BR020_1	CAGGAGCAGA	TGATACAGTA	TTAGAAGACG	TAAATTTGCC	AGGAAAATGG	AAACCAAAAA
F1.BR.89.BZ126AA
F1.BR.89.BZ163A
F1.BR.01.01BR125AG.....
F1.BR.01.01BR087AG.....T
29_BF.BR.99.99UFRJ_1TA
BF.BR.94.94BR_RJ_97AA
BF.BR.99.99UFRJ_2TAA..
BF.BR.94.94BR_RJ_41T
BF.BR.99.99UFRJ_16A
BF.BR.99.99UFRJ_9A.....	...A..A.TAT
BF.BR.94.94BR_RJ_59A	.G....A..
BF.BR.94.94UFRJ_58A
BF1.BR.99.BREPM107A
BF1.BR.99.BREPM108A
29_BF.BR.02.BREPM119A
BF.BR.99.BREPM275A.....	..C....TC	.G.G.....	...G.....
BF.BR.99.BREPM278AA	.G.G.....	...G.....
BF1.BR.99.BREPM11871A
BF1.BR.99.BREPM11884A	.G.....	...G.....
BF1.BR.99.BREPM11931A	.G.G.....	...G.....
BF1.BR.99.BREPM11932A	.G.G.....	...G.....
29_BF.BR.99.BREPM11948A
28_BF.BR.99.BREPM12313A
28_BF.BR.99.BREPM12609A
28_BF.BR.99.BREPM12817A
BF1.BR.00.BREPM13853AG.....
29_BF.BR.01.BREPM16704A
BF1.BR.01.01BR042A
BF1.BR.01.01BR047AA..	...G.....
BF1.BR.01.01BR226TA
BF1.BR.01.01BR323A
BF1.BR.02.02BR033TAG.....
BF1.BR.02.02BR034TG.....
B.BR.89.BZ167AA	.G.....	...G.....
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRUAA	.G.G.....	...G.....
B.BR.02.02BR013AA	.GG.....	...G.....
B.BR.02.02BR011	...G.....	..A.....AA	.G.....G..
B.BR.02.02BR008AA	.G.....	...G.....
B.BR.02.02BR002AAG.....
BF.BR.99.BREPM269AA	.G.....	...G.....	..G.....
BF1.BR.02.02BR005AG.....
BF1.BR.02.02BR006AG.....
SONDA PROT DT F	-----	-----CAGTA	TTAGAAGACA	TAAATTTGCC	AGGAAAATGG	AAAC-----
SONDA PROT DT B	-----	-----	-----AA	TGAATTTGCC	AGGAACATGG	AAACCAA---

Figura 5b: Continuação do alinhamento anterior

Posição em Rel.ao HXB2	2.379					2.438
F1.BR.93.93BR020_1	AAACCAAAAA	TGATAGGGGG	AATTGGAGGT	TTTATCAAAG	TAAAACAGTA	TGATAGCATA
F1.BR.89.BZ126A....
F1.BR.89.BZ163A....
F1.BR.01.01BR125	..G.....A....
F1.BR.01.01BR087TGGA.G..
29_BF.BR.99.99UFRJ_1GGA....
BF.BR.94.94BR_RJ_97A....
BF.BR.99.99UFRJ_2G.....CAA....
BF.BR.94.94BR_RJ_41GGAAG..
BF.BR.99.99UFRJ_16C.A....
BF.BR.99.99UFRJ_9T	..A.....T.....CA....
BF.BR.94.94BR_RJ_59GGA....
BF.BR.94.94UFRJ_58GA....
BF1.BR.99.BREPM107A....
BF1.BR.99.BREPM108CA....
29_BF.BR.02.BREPM119G.A....
BF.BR.99.BREPM275G.A.A....
BF.BR.99.BREPM278AA.A....
BF1.BR.99.BREPM11871A....
BF1.BR.99.BREPM11884A....
BF1.BR.99.BREPM11931A....
BF1.BR.99.BREPM11932A....
29_BF.BR.99.BREPM11948A....
28_BF.BR.99.BREPM12313GA....
28_BF.BR.99.BREPM12609GA....
28_BF.BR.99.BREPM12817A....
BF1.BR.00.BREPM13853	..G.....A....
29_BF.BR.01.BREPM16704GGA....
BF1.BR.01.01BR042A....
BF1.BR.01.01BR047GA....
BF1.BR.01.01BR226A....
BF1.BR.01.01BR323T...GGA....
BF1.BR.02.02BR033G...G..G.A.G..
BF1.BR.02.02BR034	..G.....A....
B.BR.89.BZ167G.....CAG...
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRUG.....CAG...
B.BR.02.02BR013G.....CAG...
B.BR.02.02BR011GCAG...
B.BR.02.02BR008G.....CAG...
B.BR.02.02BR002G.....CAG..G
BF.BR.99.BREPM269	..G.....G.....CAG...
BF1.BR.02.02BR005G.....CAG...
BF1.BR.02.02BR006G.....	...G.....CAG...
REVERSE PRIMER PROT DT	-----	TGATAGGGGG	AATTGGAGGT	T-----	-----	-----

Figura 5c: Continuação do alinhamento anterior

Por este alinhamento observou-se que, em sua maioria, as diferenças entre os subtipos B e F, no local de anelamento das sondas desenhadas, totalizavam em três nucleotídeos. Uma alteração na sonda que tinha sido escolhida para o subtipo F, portanto, foi realizada para que tivesse maior abrangência em amostras clínicas. Ainda assim, foi mantido o critério de escolha de sondas com provável capacidade de diferenciar os subtipos, que foi de no mínimo três nucleotídeos de diferença. Além disso, a seqüências dos *primers* não apresentaram diferenças persistentes em relação a todas as seqüências.

II. Região da transcriptase reversa (*pol*)

A região da transcriptase reversa foi rastreada devido à contribuição que pode dar na identificação das CRF 28 e 29, já que estas seqüências apresentam subtipo F na protease e B na transcriptase reversa, regiões adjacentes no genoma do HIV-1. Foram encontrados quatro jogos de *primers* e sondas, mas, analisando as diferenças entre as seqüências dos dois subtipos, BZ167 e BR020, o jogo que pareceu ser o melhor foi o seguinte, denominado RT DT:

Tabela 10: RT DT, jogo de *primers* e sondas selecionado para a região da transcriptase reversa (*pol*).

	Seqüência de Nucleotídeos	Tm	Pos. Gen.
Forward Primer (5'→3')	GATTAAAGTAAAGCAATTATGTAAACT CCTTAGG	59°	3368 - 3401
Reverse Primer (5'→3')	TGCTATTAAGTCTTTTGAYGGGTCAT	58°	3505 - 3530
Sonda Subtipo-Específica B (5'→3')	AAAACAGGGAAATTCTAAAAGAACCA GTACATGGAGTG	69°	3463 - 3500
Sonda Subtipo-Específica F (5'→3')	AGCCAAGGCACTAACAGACATAGTGC CACT	68°	3404 - 3433

Legenda: Tm = Temperatura de *Melting*; Pos. Gen.= Posição Genômica em relação ao genoma HXB2

Na sonda específica para o subtipo F foram encontrados quatro nucleotídeos de diferença em relação à seqüência do isolado BZ167, enquanto que a sonda específica para o subtipo B apresentou até seis nucleotídeos de diferença em relação ao isolado viral BR020. Estas diferenças estão destacadas no alinhamento a seguir:

Posição em Rel.ao HXB2	3.349						3.408
F1.BR.93.93BR020_1	CAAGTCAGAT	TTATCCAGGG	ATTAAAGTAA	AACAATTATG	TAAACTCCTT	AGGGGAGCCA	
B.BR.89.BZ167A..G.....A...	
FORWARD PRIMER RT DT	-----	-----G	ATTAAAGTAA	AACAATTATG	TAAACTCCTT	AGG-----	
Posição em Rel.ao HXB2	3.399						3.458
F1.BR.93.93BR020_1	AGGGGAGCCA	AGGCCTAAC	AGACATAGTG	CCACTGACTA	CAGAAGCAGA	GTTAGAATTG	
B.BR.89.BZ167A...AG...AA..AG	A.....	.C.....C..	
SONDA RT DT F	----AGCCA	AGGCCTAAC	AGACATAGTG	CCACT-----	-----	-----	
Posição em Rel.ao HXB2	3.459						3.518
F1.BR.93.93BR020_1	GCAGAGAATA	GGGAGATTCT	AAAAGAACCA	GTACATGGGG	CATATTATGA	CCCGTCAAAA	
B.BR.89.BZ167A..C.A.....A.	TG.....	...A.....	
SONDA RT DT B	----AAACA	GGGAAATTCT	AAAAGAACCA	GTACATGGAG	TC-----	-----	
Posição em Rel.ao HXB2	3.499						3.558
F1.BR.93.93BR020_1	CATATTATGA	CCCGTCAAAA	GACTTAATAG	CAGAAATACA	GAAACAAGGG	CAAGGCAAT	
B.BR.89.BZ167	TG.....	...A.....G..G...	..G..C....	
REVERSE PRIMER RT DT	-----ATGA	CCCGTCAAAA	GACTTAATAG	CA-----	-----	-----	

Figura 6: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da transcriptase reversa (*pol*). A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020.

Foi realizado um alinhamento com várias seqüências brasileiras obtidas do banco de dados disponibilizado pelo Laboratório Nacional Los Alamos (hiv-web.lanl.gov), e o alinhamento a seguir, com algumas destas seqüências, permite a análise da abrangência deste jogo em amostras clínicas.

Posição em Rel.ao HXB2	3.349	3.408
F1.BR.93.93BR020_1	CAAGTCAGAT TTATCCAGGG ATTTAAAGTAA AACCAATTATG TAAACTCCTT	AGGGGAGCCA
F1.BR.89.BZ126G..... .R....Y.
F1.BR.89.BZ163A..G..... .T.
F1.BR.01.01BR125G.... .GA.C....
F1.BR.01.01BR087G.....
BF.BR.94.94BR_RJ_97GG.....
BF.BR.99.99UFRJ_2G....GG.....
BF.BR.94.94BR_RJ_41GG.....
BF.BR.99.99UFRJ_16G...C....
BF.BR.94.94BR_RJ_59G.....
BF.BR.94.94UFRJ_58A....G..... .T..
BF1.BR.01.01BR042A....G..... .A...
BF1.BR.01.01BR047G.....
BF1.BR.01.01BR226G....G.....
BF1.BR.01.01BR323G...C....
BF1.BR.02.02BR033GG..... .T.
BF1.BR.02.02BR034G.....
B.BR.89.BZ167A....G..... .A...
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRUC....GG..... .A...A...
B.BR.02.02BR013G..... .A...
B.BR.02.02BR011C....G..... .A...
B.BR.02.02BR008G....GG..... .A...A...
B.BR.02.02BR002G...AG..... .GA...
BF.BR.99.BREPM269C....G..... .A...A...T.
BF1.BR.02.02BR005G....G..... .A...A...
BF1.BR.02.02BR006G....G..... .A...A...
29_BF.BR.99.99UFRJ_1C....G..... .A...
BF.BR.99.99UFRJ_9A....C..... G..... .G..... .A...
BF1.BR.99.BREPM107A....C..... G..... .G...G.... .A...
BF1.BR.99.BREPM108C....C..... A...G.... G..... .G.....C .A...
29_BF.BR.02.BREPM119C....C..... A...G.... G.....
BF.BR.99.BREPM275C....G..... .G..... .A...
BF.BR.99.BREPM278A....C..... G..... .G..... .A...
BF1.BR.99.BREPM11871A....C..... G..... .G..... .A...
BF1.BR.99.BREPM11884C....C..... G..... .G..... .A...
BF1.BR.99.BREPM11931C....C..... G...C....
BF1.BR.99.BREPM11932C....C..... A...G.... G...C.... .G.....
29_BF.BR.99.BREPM11948A....A..... GG...C.... .G..... .A...
28_BF.BR.99.BREPM12313T..... .C..... .A...
28_BF.BR.99.BREPM12609C....G..... .G..... .A...
28_BF.BR.99.BREPM12817GG..... .G..... .A...
BF1.BR.00.BREPM13853C....C..... A...G.... G..... .G..... .A...
29_BF.BR.01.BREPM16704CG...AG..... .G..... .A...T.
FORWARD PRIMER RT DT	-----G ATTTAAAGTAA	ARCAATTATG TAAACTCCTT AGG-----

Figura 7a: Alinhamento de seqüências da região da transcriptase reversa (*pol*) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema. A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020; as primeiras seqüências, em preto, são do subtipo F, seguidas por seqüências do subtipo B, em cinza.

Posição em Rel.ao HXB2	3.399	3.458
F1.BR.93.93BR020_1	AGGGGAGCCA AGGCACTAAC AGACATAGTG CCACTGACTA CAGAAGCAGA GTTAGAATTG	
F1.BR.89.BZ126	..R....Y..A.....	
F1.BR.89.BZ163T..A.....	
F1.BR.01.01BR125G.....
F1.BR.01.01BR087G.....
BF.BR.94.94BR_RJ_97G.....
BF.BR.99.99UFRJ_2A.....A.....G.....
BF.BR.94.94BR_RJ_41G T.....
BF.BR.99.99UFRJ_16T.....
BF.BR.94.94BR_RJ_59GA..T....AG...A....A..AG.....
BF.BR.94.94UFRJ_58T.....G T.....
BF1.BR.01.01BR042A.....G.....AC.....
BF1.BR.01.01BR047T.....G.....
BF1.BR.01.01BR226T..G.....
BF1.BR.01.01BR323GG.....
BF1.BR.02.02BR033T.....
BF1.BR.02.02BR034T.....A.....G.....
B.BR.89.BZ167A.....AG...A....A..AG A.....
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	..A..A..A.....AG..A.A....A..AG A.....
B.BR.02.02BR013A..A.....AG...A....A..A A.....
B.BR.02.02BR011A..A.....AG...A....A..AG A.....
B.BR.02.02BR008A..A.....AG...A A..T.A.A.A A.....
B.BR.02.02BR002GA..A.....AG...A....A..AG.....
BF.BR.99.BREPM269A.T..A.....AG.....A..AG.....
BF1.BR.02.02BR005A..A.....AG...A....A..AG A.....
BF1.BR.02.02BR006A..A.....AG...A....A..AG A.....
29_BF.BR.99.99UFRJ_1A..A.....AG...A....T.A..AG A.....
BF.BR.99.99UFRJ_9A.....GG.....A..A A.....
BF1.BR.99.BREPM107A.....AG..A.A....A..A A.....
BF1.BR.99.BREPM108A.....AG..A.A....A..A A.....
29_BF.BR.02.BREPM119AG...A....A..A A.....
BF.BR.99.BREPM275A.....AG..A.A T...A..A A.....
BF.BR.99.BREPM278A..A.....AG..A.A....T..A..AG A.....
BF1.BR.99.BREPM11871A.....G...A....A..A A.....
BF1.BR.99.BREPM11884A.....AG.GA.A....A..A G.....
BF1.BR.99.BREPM11931T.....GG...A....A..AG AG.....
BF1.BR.99.BREPM11932T.....GG...A....A..AG AG.....
29_BF.BR.99.BREPM11948A..AT.....AG..A.A....T..A..A A.....
28_BF.BR.99.BREPM12313A..A.....AG...A....A..AG A.....
28_BF.BR.99.BREPM12609A.....AG...A....A..AG A.....
28_BF.BR.99.BREPM12817A..A.....GG...A....A..AG A.....
BF1.BR.00.BREPM13853A.....AG..A.A....A..A A.....
29_BF.BR.01.BREPM16704A.T.....AG...A....A..A A.....
SONDA RT DT F	----AGCCA AGGCACTAAC AGACATAGTG CCACT-----	-----

Figura 7b: Continuação do alinhamento anterior

Posição em Rel.ao HXB2	3.459					3.518
F1.BR.93.93BR020_1	GCAGAGAATA	GGGAGATTCT	AAAAGAACCA	GTACATGGGG	CATATTATGA	CCCGTCAAAA
F1.BR.89.BZ126	T.....
F1.BR.89.BZ163	T.....
F1.BR.01.01BR125A....	T.....	..A....
F1.BR.01.01BR087A..C..T....
BF.BR.94.94BR_RJ_97G.....C....	..A....G
BF.BR.99.99UFRJ_2A....	TG.....
BF.BR.94.94BR_RJ_41G.....	T.....	..AA....
BF.BR.99.99UFRJ_16A....	..A....	T.....
BF.BR.94.94BR_RJ_59AT....	T.....A..	..A....
BF.BR.94.94UFRJ_58	T.....	..A....
BF1.BR.01.01BR042A....	..G....	T..C....
BF1.BR.01.01BR047	T.....	..A....
BF1.BR.01.01BR226A..C..C..	T.....
BF1.BR.01.01BR323A....	T..C....
BF1.BR.02.02BR033	T.....
BF1.BR.02.02BR034A....	T.....	..A....
B.BR.89.BZ167A..C..	..A....	A.TG....	..A....
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRUA..C..	..A....	A.TG....	..A....
B.BR.02.02BR013A..C..	A.TG....	..A....
B.BR.02.02BR011A..C..	TG.....	..A....
B.BR.02.02BR008A..C..	TG.....	..A....
B.BR.02.02BR002A..C..G..	A.T.....	..A....
BF.BR.99.BREPM269A..C..	A.TG....	..A....
BF1.BR.02.02BR005A..C..	..A....	TG.....	..AA....
BF1.BR.02.02BR006A..C..	TG.....	..A....
29_BF.BR.99.99UFRJ_1A..C..	A.TG....	..A....
BF.BR.99.99UFRJ_9A..C..	..A....	A.TG....	T..A....
BF1.BR.99.BREPM107A..C..	..A....	A.TG....	T..A....
BF1.BR.99.BREPM108C..	..A....	A.TG....	..AA....
29_BF.BR.02.BREPM119A..C..	..A....	A.TG....	..A....
BF.BR.99.BREPM275A..C..	..A....C..	A.TG....	..A....
BF.BR.99.BREPM278A..C..T..G..	A.TG....	..C....G
BF1.BR.99.BREPM11871A..C..	A.TG....	..A....
BF1.BR.99.BREPM11884A..C..	..A....G..	A.T.....	..AA....
BF1.BR.99.BREPM11931A..C..A..	A.TG....	..A....
BF1.BR.99.BREPM11932A..C..G..	A.TG....	..A....
29_BF.BR.99.BREPM11948A..C..	..A....	A..G....	..A....
28_BF.BR.99.BREPM12313A..C..G..	A.TG....	..A....
28_BF.BR.99.BREPM12609A..C..	..A....	A.TG....	..A....
28_BF.BR.99.BREPM12817A..C..	A.TG....	..A....
BF1.BR.00.BREPM13853A..C..	..A....	A.TG....	..A....
29_BF.BR.01.BREPM16704A..C..	..A....A..	A.TG....	..AG....
SONDA RT DT B	----	A A A C A	GGG A ATTCT	AAAAGAACCA	GTACATGG A G	T C-----

Figura 7c: Continuação do alinhamento anterior

Posição em Rel. ao HXB2	3 499					3.558
F1.BR.93.93BR020_1	CATATTATGA	CCCGTCAAAA	GACTTAATAG	CAGAAATACA	GAAACAAGGG	CAAGGGCAAT
F1.BR.89.BZ126	T.....T.....
F1.BR.89.BZ163	T.....T.....
F1.BR.01.01BR125	T.....	..A.....
F1.BR.01.01BR087T.....
BF.BR.94.94BR_RJ_97C.....	..A.....	G..T.....
BF.BR.99.99UFRJ_2	TG.....G.....	A...AT....
BF.BR.94.94BR_RJ_41	T.....	..AA.....
BF.BR.99.99UFRJ_16	T.....
BF.BR.94.94BR_RJ_59	T.....	A...A.....T.....	..G..G...C....
BF.BR.94.94UFRJ_58	T.....	..A.....	T.....	..G..G...C....
BF1.BR.01.01BR042	T...C.....G....
BF1.BR.01.01BR047	T.....	..A.....G.....	A.....
BF1.BR.01.01BR226	T.....
BF1.BR.01.01BR323	T...C.....C.....G....
BF1.BR.02.02BR033	T.....
BF1.BR.02.02BR034	T.....	..A.....G....
B.BR.89.BZ167	TG.....	..A.....G..G...	..G..C....
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	TG.....	..A.....G..G...C....
B.BR.02.02BR013	TG.....	..A.....C.....	..G..G...C....
B.BR.02.02BR011	TG.....	..A.....G..G...	..G..C....
B.BR.02.02BR008	TG.....	..A.....G..G...T....
B.BR.02.02BR002	T.....	..A.....G..G...C....
BF.BR.99.BREPM269	TG.....	..A.....G..G...C....
BF1.BR.02.02BR005	TG.....	..AA.....C.....	..G..G...	..G..C....
BF1.BR.02.02BR006	TG.....	..A.....G..G...C....
29_BF.BR.99.99UFRJ_1	TG.....	..A.....T.....	..G..G...C....
BF.BR.99.99UFRJ_9	TG.....	T..A.....G..G...C....
BF1.BR.99.BREPM107	TG.....	T..A.....G..G...C....
BF1.BR.99.BREPM108	TG.....	..AA.....C.....	..G..G...C....
29_BF.BR.02.BREPM119	TG.....	..A.....	..T.....G..G...C....
BF.BR.99.BREPM275	TG.....	..A.....G..G...C....
BF.BR.99.BREPM278	TG.....	..C.....	G.....	GG.....	..G..G..AC....
BF1.BR.99.BREPM11871	TG.....	..A.....	..T.....	A..G..G...T....
BF1.BR.99.BREPM11884	T.....	..AA.....G..G...C....
BF1.BR.99.BREPM11931	TG.....	..A.....G.....	..G..G...C....
BF1.BR.99.BREPM11932	TG.....	..A.....G.....	..G..G...C....
29_BF.BR.99.BREPM11948	.G.....	..A.....G..G...	..T...C....
28_BF.BR.99.BREPM12313	TG.....	..A.....G.....C..G..
28_BF.BR.99.BREPM12609	TG.....	..A.....	T.....	..G..G...	...AC....
28_BF.BR.99.BREPM12817	TG.....	..A.....G..G...	...T.C....
BF1.BR.00.BREPM13853	TG.....	..A.....G.....	..G..G...C....
29_BF.BR.01.BREPM16704	TG.....	..AG.....G..G...	A.T...C....
REVERSE PRIMER RT DT	-----ATGA	CCCWTC AAAA	GACTTAATAG	CA-----	-----	-----

Figura 7d: Continuação do alinhamento anterior

Por este alinhamento, verifica-se que os *primers* quase não apresentam diferenças entre as seqüências, tendo em cada um deles um nucleotídeo degenerado acrescentado. Já as sondas obedecem ao parâmetro escolhido, sendo que para algumas seqüências cada uma das sondas apresenta até cinco pontos de diferença em relação ao outro subtipo, o que garantiria sua detecção específica.

III. Região da integrase (*pol*).

O intuito de rastrear a região da integrase foi o fato de haver a presença de subtipos diferentes nas duas CRF descritas nesta região, já que a CRF_28 apresenta a integrase B, enquanto a CRF_29 possui integrase F. Baseando-se nas diferenças entre as seqüências dos

isolados virais BZ167 e BR020, nesta região, foi encontrado o seguinte jogo, denominado INT DT.

Tabela 11: INT DT, jogo de *primers* e sondas selecionado para a região da integrase (*pol*).

	Seqüência de Nucleotídeos	Tm	Pos. Gen.
Forward Primer (5'→3')	YAGTGGRTAYMTAGAAGCAGAAGTTA TY	56°	4469 - 4496
Reverse Primer (5'→3')	TTTTACTGGCCATCTTCCTGCTA	59°	4540 - 4562
Sonda Subtipo-Específica B (5'→3')	AGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACT TTMTCTTAAAA	69°	4502 - 4538
Sonda Subtipo-Específica F (5'→3')	AGCAGAAACAGGACAAGAAACAGCCT ACTTCA	69°	4499 - 4530

Legenda: Tm = Temperatura de *Melting*; Pos. Gen.= Posição Genômica em relação ao genoma HXB2

Na sonda específica para o subtipo F foram encontrados sete nucleotídeos de diferença em relação à seqüência do isolado BZ167, enquanto que a sonda específica para o subtipo B apresentou até dez nucleotídeos de diferença em relação ao isolado viral BR020. Assim como muitas diferenças foram encontradas para a região das sondas, muitas diferenças foram encontradas também no local de anelamento do *forward primer*, o que exigiria a inclusão de nucleotídeos degenerados. Estas diferenças estão destacadas no alinhamento a seguir:

Posição em Rel.ao HXB2	4.460					4.519
#F1.BR.93.93BR020_1	CCATGTAGCT	AGTGGGTACC	TAGAAGCAGA	AGTTATCCCA	GCAGAAACAG	GACAAGAGAC
#B.BR.89.BZ167	T.....CA..TAT...G....	.G..G..A..
FORWARD PRIMER INT DT	-----Y	AGTGGRTAYM	TAGAAGCAGA	AGTTATY---	-----	-----
Posição em Rel.ao HXB2	4.490					4.549
#F1.BR.93.93BR020_1	AGTTATCCCA	GCAGAAACAG	GACAAGAGAC	AGCCTACTTC	CTACTAAAGT	TAGCAGGAAG
#B.BR.89.BZ167T...G....	.G..G..A..	...A.....T	A.CT....A.
SONDA INT DT F	-----A	GCAGAAACAG	GACAAGAGAC	AGCCTACTTC	C-----	-----
SONDA INT DT B	-----	--AGACACAG	GGCAAGAAAC	AGCATACTTT	ATCTTAAAA	-----
Posição em Rel.ao HXB2	4.530					4.589
#F1.BR.93.93BR020_1	CTACTAAAGT	TAGCAGGAAG	ATGGCCAGTA	AAAACAATAC	ATACAGACAA	TGGCACCAAT
#B.BR.89.BZ167	A.CT....A.G....
REVERSE PRIMER INT DT	-----	TAGCAGGAAG	ATGGCCAGTA	AAA-----	-----	-----

Figura 8: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da integrase (*pol*). A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020.

Para verificar se todas estas diferenças observadas nos isolados virais são de fato representativas de cada um dos subtipos, foi realizado um alinhamento com várias seqüências brasileiras obtidas do banco de dados disponibilizado pelo Laboratório Nacional de Los Alamos (hiv-web.lanl.gov), e o alinhamento a seguir, com algumas destas seqüências, permite a análise da abrangência deste jogo em amostras clínicas.

Posição em Rel.ao HXB2	4.460					4.519
#F1.BR.93.93BR020_1	CCATGTAGCT	AGTGGGTACC	TAGAAGCAGA	AGTTATCCCA	GCAGAAACAG	GACAAGAGAC
#F1.BR.89.BZ126K.....	A.....	.G....A..
#F1.BR.89.BZ163	A.....A..
#F1.BR.01.01BR087T.A..
#F1.BR.01.01BR125A.....C..
#29_BF.BR.99.99UFRJ_1TG..A..
#BF.BR.94.94BR_RJ_97	Y.....Y...R....R..A..
#BF.BR.94.94BR_RJ_41C.....A..
#BF.BR.99.99UFRJ_16CAA..
#BF.BR.99.99UFRJ_9C..AG..C..
#BF.BR.94.94UFRJ_58T...A..
#BF1.BR.99.BREPM108A..
#29_BF.BR.02.BREPM119T.A..
#29_BF.BR.99.BREPM11948A..
#BF1.BR.00.BREPM13853A..
#29_BF.BR.01.BREPM16704A..
#BF1.BR.01.01BR042TG..A..
#BF1.BR.01.01BR047C..A...A..
#BF1.BR.01.01BR226T.A..
#B.BR.89.BZ167	T.....C	...A..TAT...G....	.G..G..A..
#BF1.BR.99.BREPM11931	T.....G..C	...A..TAT...G....A..
#BF1.BR.99.BREPM11932	T.....C	...A..TAT...A..
#B.BR.02.02BR002	T.....C	...A..TAT...G....	.G.....
#B.BR.02.02BR011	T.....C	...A..TAT...G....	.G..G..A..
#B.BR.02.02BR008	T.....C	...A..AT...G....	.G.....A..
#B.BR.02.02BR013	T.....C	...A..TAG....	.G.....A..
#BF.BR.99.99UFRJ_2	T.....	...A...A..
#BF.BR.94.94BR_RJ_59	T.....C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#BF1.BR.99.BREPM107	T.....C	...A..TAT...G....A..
#BF.BR.99.BREPM269	T.....C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#BF.BR.99.BREPM275C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#BF.BR.99.BREPM278C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#BF1.BR.99.BREPM11871	T.....C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#BF1.BR.99.BREPM11884	T.....C	...A..TAT...G....	.G..G..A..
#28_BF.BR.99.BREPM12313	T.....C	...A..TAT...G....	.G..G..A..
#28_BF.BR.99.BREPM12609	T.....C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#28_BF.BR.99.BREPM12817	T.....C	...A..AT...G....	.G.....A..
#BF1.BR.01.01BR323	T.....C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#BF1.BR.02.02BR005	T.....C	...A..TAT...G....	.G.....A..
#BF1.BR.02.02BR006	T.....C	...A..TAT...G.....A..
#BF1.BR.02.02BR033	T.....C	...A..TAT...G....	.G..G....
#BF1.BR.02.02BR034	T.....C	...A..TAT...G.....A..
FORWARD PRIMER INT DT	-----Y	AGTGGRTAYM	TAGAAGCAGA	AGTTATY---	-----	-----

Figura 9a: Alinhamento de seqüências da região da integrase (*pol*) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema. A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020; as primeiras seqüências, em preto, são do subtipo F, seguidas por seqüências do subtipo B, em cinza.

Posição em Rel.ao HXB2	4.490					4.549
#F1.BR.93.93BR020_1	AGTTATCCCA	GCAGAAACAG	GACAAGAGAC	AGCCTACTTC	CTACTAAAGT	TAGCAGGAAG
#F1.BR.89.BZ126	...K.....	A.....	.G.....	A.....	A.....
#F1.BR.89.BZ163	A.....	A.....	A.....
#F1.BR.01.01BR087	A.....	A.....
#F1.BR.01.01BR125	..A.....	C.....	A.....
#29_BF.BR.99.99UFRJ_1T.....	G.A.....	A.....
#BF.BR.94.94BR_RJ_97Y.....R.....R.A.....	A.Y.....
#BF.BR.94.94BR_RJ_41	..C.....	A.....	A.T.....
#BF.BR.99.99UFRJ_16	A.....	A.....
#BF.BR.99.99UFRJ_9	G.C.....	A.....
#BF.BR.94.94UFRJ_58T.....	A.....	A.T.....
#BF1.BR.99.BREPM108	A.....	A.....
#29_BF.BR.02.BREPM119GT.....	A.....
#29_BF.BR.99.BREPM11948	A.....	A.....
#BF1.BR.00.BREPM13853	A.....	A.....
#29_BF.BR.01.BREPM16704	A.....	A.....
#BF1.BR.01.01BR042	G.A.....	..T.....	A...G.....
#BF1.BR.01.01BR047	A.....G.....
#BF1.BR.01.01BR226	A.....	A.....
#B.BR.89.BZ167T.....G.....G.G.A.....	..A.....	T.A.CT...A.....
#BF1.BR.99.BREPM11931T.....G.....A.....	..A.....	T..CT...A.....C.....
#BF1.BR.99.BREPM11932T.....G.....A.....	..A.....	T..CT...A.....
#B.BR.02.02BR002T.....G.....G.....	..A.....	T..CT...A.....
#B.BR.02.02BR011T.....G.....G.G.A.....	..A.....	T.A.CT...A.....
#B.BR.02.02BR008T.....G.....G.....	..A.....	T..CT...A.....
#B.BR.02.02BR013T.....G.....G.....	..A.....	T..CT...A.....
#BF.BR.99.99UFRJ_2T.....G.....A.....	..A.....	T..CT...A.....
#BF.BR.94.94BR_RJ_59T.....G.....G.....	..A.....	T..CT...A.....
#BF1.BR.99.BREPM107T.....G.....A.....	..A.T..T.....	..CT...A.....G.....
#BF.BR.99.BREPM269T.....G.....G.....	..A.....	T..CT...A.....G.....
#BF.BR.99.BREPM275T.....G.....G.....	..A.T..T.....	A.CT...A.....
#BF.BR.99.BREPM278T.....G.....G.....	..A.T..T.....	..CT...A.....
#BF1.BR.99.BREPM11871T.....G.....G.....	..A.T..T.....	..CT...AC.....
#BF1.BR.99.BREPM11884T.....G.....G.G.A.....	..A.....	A.CT...A.....
#28_BF.BR.99.BREPM12313T.....G.....G.G.A.....	..A.....	T.A.CT...A.....
#28_BF.BR.99.BREPM12609T.....G.....G.....	..A.....	T..CT...A.....
#28_BF.BR.99.BREPM12817T.....G.....G.....	..A.....	T.A.CT...A.....
#BF1.BR.01.01BR323T.....G.....G.....	..A.....	T..TT...A.....
#BF1.BR.02.02BR005T.....G.....G.....	..A.....	T.A.CT...A.....
#BF1.BR.02.02BR006T.....G.....G.....	..A.....	T.A.T...A.....
#BF1.BR.02.02BR033T.....G.....G.G.....	..A.....	T.A.CT...A.....
#BF1.BR.02.02BR034T.....G.....G.....	..A.....	T.A.CT...A.....
SONDA INT DT F	-----A	GCAGAAACAG	GACAAGAAAC	AGCCTACTTC	A-----	-----
SONDA INT DT B	-----	--AGAGACAG	GCAAGAAAC	AGCACTACTTT	MTCTAAAA	-----

Figura 9b: Continuação do alinhamento anterior

Posição em Rel.ao HXB2	4.530					4.589
#F1.BR.93.93BR020_1	CTACTAAAGT	TAGCAGGAAG	ATGGCCAGTA	AAAACAATAC	ATACAGACAA	TGGCACCAAT
#F1.BR.89.BZ126	A.....T...
#F1.BR.89.BZ163	A.....
#F1.BR.01.01BR087	A.....C....
#F1.BR.01.01BR125	A.....T.....T..C....
#29_BF.BR.99.99UFRJ_1	A.....C....
#BF.BR.94.94BR_RJ_97	A..Y.....
#BF.BR.94.94BR_RJ_41	A..T.....
#BF.BR.99.99UFRJ_16	A.....
#BF.BR.99.99UFRJ_9	A.....GT.....G...C
#BF.BR.94.94UFRJ_58	A..T.....
#BF1.BR.99.BREPM108	A.....G.....
#29_BF.BR.02.BREPM119	A.....G.....C....
#29_BF.BR.99.BREPM11948	A.....C.....C....
#BF1.BR.00.BREPM13853	A.....G.....
#29_BF.BR.01.BREPM16704	A.....
#BF1.BR.01.01BR042	A...G....T..
#BF1.BR.01.01BR047	...G....G.G....C....
#BF1.BR.01.01BR226	A.....C....
#B.BR.89.BZ167	A.CT...A.G....
#BF1.BR.99.BREPM11931	..CT...A.C.....C.....G....
#BF1.BR.99.BREPM11932	..CT...A.G....G....
#B.BR.02.02BR002	..CT...A.G.....G....GT...
#B.BR.02.02BR011	A.CT...A.G....
#B.BR.02.02BR008	..CT...A.
#B.BR.02.02BR013	..CT...A.G....
#BF.BR.99.99UFRJ_2	A.....
#BF.BR.94.94BR_RJ_59	..CT...A.G....
#BF1.BR.99.BREPM107	..CT...A.G.....
#BF.BR.99.BREPM269	..CT...A.G.....G....C.....GT...
#BF.BR.99.BREPM275	A.CT...A.T.....T.....G....
#BF.BR.99.BREPM278	..CT...A.T.....G....
#BF1.BR.99.BREPM11871	..CT...ACT.....G....
#BF1.BR.99.BREPM11884	A.CT...A.G....
#28_BF.BR.99.BREPM12313	A.CT...A.
#28_BF.BR.99.BREPM12609	..CT...A.G.....G....T.....G....
#28_BF.BR.99.BREPM12817	A.CT...A.G....
#BF1.BR.01.01BR323	..TT...A.G....G....
#BF1.BR.02.02BR005	A.CT.....T.....G....
#BF1.BR.02.02BR006	A..T...A.G....
#BF1.BR.02.02BR033	A.CT...A.G....
#BF1.BR.02.02BR034	A.CT...A.T.....G....
REVERSE PRIMER INT DT	-----	TAGCAGGAAG	ATGGCCAGTA	AAA-----	-----	-----

Figura 9c: Continuação do alinhamento anterior

Por este alinhamento, verificou-se que o *forward primer* apresentou diferenças persistentes relativas aos subtipos, sendo necessário incluir degenerações em sua seqüência. O *reverse primer*, por sua vez, quase não apresentou diferenças entre as seqüências. Já as sondas, apesar de apresentarem grande número de diferenças também entre amostras clínicas, estas diferenças foram menos numerosas do que quando somente os isolados virais foram comparados, totalizadas em no mínimo cinco diferenças neste alinhamento, para que a abrangência fosse maior. Desta forma, foi a partir desta última análise que as sondas foram desenhadas, sendo que a sonda do subtipo F apresentou 5 diferenças em relação ao subtipo B, enquanto a sonda B, oito diferenças em relação ao subtipo F, sendo uma destas diferenças um nucleotídeo degenerado.

IV. Região do envelope.

A região V3 do envelope de HIV-1 foi rastreada para que se estabelecesse um jogo de *primers* e sondas que diferenciassem os dois subtipos. No entanto, esta região se mostrou variável demais para tanto. Isto porque seriam necessárias regiões conservadas dentre seqüências de HIV-1 para a localização dos *primers*, bem como regiões conservadas dentre as seqüências de cada subtipo, para a localização das sondas subtipo-específicas. Desta forma, outras partes da região *env* foram averiguadas, com este intuito.

Um sistema de *primers* e sondas capazes de amplificar e diferenciar os subtipos B e F, para a região da glicoproteína gp120, dentro do envelope de HIV-1, foi criado no projeto de Iniciação Científica de título “**Padronização de técnica de detecção de subtipos de HIV-1 e seus recombinantes em tempo real**”, desenvolvido neste laboratório, em 2005. Este sistema foi desenvolvido para diferenciar os mesmos isolados virais BZ167 (subtipo B) e BR020 (subtipo F) do atual trabalho, presentes no sobrenadante de cultura de células MT-4 por eles infectadas, e está sendo utilizado neste trabalho, agora com o intuito de também diferenciar estes subtipos em amostras clínicas. Este jogo ficou denominado como GP120 DT.

Tabela 12: GP120 DT, jogo de *primers* e sondas encontrado para a região da gp120 (*env*).

	Seqüência de Nucleotídeos	Tm	Pos. Gen.
Forward Primer (5'→3')	CAATTTRTAAACAAGTGGCAGGAA	60°	7488 - 7511
Reverse Primer (5'→3')	ATAATTCACCTCTCCAATTGTCYYTCA TAT	58°	7645 - 7674
Sonda Subtipo-Específica B (5'→3')	TAGGAAAAGCAATGTATGCCCTCCC A	68°	7513 - 7539
Sonda Subtipo-Específica F (5'→3')	ATTACAGGTCTACTATTGACAAGAGAT GGTGGTC	68°	7569 - 7602

Legenda: Tm = Temperatura de *Melting*; Pos. Gen.= Posição Genômica em relação ao genoma HXB2

Este jogo foi desenhado baseado nas diferenças encontradas entre os isolados virais, como evidenciado no alinhamento a seguir:

Posição em Rel.ao HXB2	7.484						7.543
F1.BR.93.93BR020_1	AAAACAAATT	GTAACATGT	GGCAGGAAGT	GGGACGAGCA	ATGTATGCCA	ATCCCATTC	GC
B.BR.89.BZ167T..	A...AA....C	C.....C.A	
FORWARD PRIMER GP120 DT	----CAAWTT	GTAACATGT	GGCAGGAA--	-----	-----	-----	-----
SONDA GP120 DT B	-----	-----	-----T	AGGAAAGCA	ATGTATGCC	CTCCCA	-----
Posição em Rel.ao HXB2	7.544						7.603
F1.BR.93.93BR020_1	AGGAAACATT	ACCTGTAACT	CAAATATTAC	AGGTCTGCTA	TTGACAAGAG	ATGGTGGTCT	
B.BR.89.BZ167	T..GC.A...	.GT...TCA.GT.A...	..A.....AA	
SONDA GP120 DT F	-----	-----	----ATTAC	AGGTCTGCTA	TTGACAAGAG	ATGGTGGT	C-
Posição em Rel.ao HXB2	7.642						7.701
F1.BR.93.93BR020_1	GAAATATGAA	AGACAATTGG	AGAAGTGAAT	TATATAAATA	TAAAGTAGTA	GAAATTGAAC	
B.BR.89.BZ167	..G.....G	G.....	A..G.....	
REVERSE PRIMER GP120 DT	---ATATGAR	RGACAATTGG	AGAAGTGAAT	TAT-----	-----	-----	-----

Figura 10: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da gp120 (*env*). A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020.

No alinhamento acima, foram destacados, nas seqüências de *primers* e sondas, as posições de nucleotídeos que divergem entre estes dois subtipos, demonstrando que, na aplicação somente para estes dois isolados virais, o sistema apresenta *primers* potencialmente capazes de amplificar igualmente os subtipos (no máximo duas diferenças), assim como sondas discriminantes (com cinco diferenças cada uma, em relação ao outro subtipo).

Foi realizado um alinhamento, com várias seqüências brasileiras obtidas do banco de dados disponibilizado pelo Laboratório Nacional Los Alamos (hiv-web.lanl.gov), e o alinhamento a seguir, com algumas destas seqüências, permitiu a análise da abrangência deste jogo em amostras clínicas.

Posição em Rel.ao HXB2	7.484					7.543
F1.BR.93.93BR020_1	AAAACAAATT	GTAACATGT	GGCAGGAAGT	GGGACGAGCA	ATGTATGCCA	ATCCCATGTC
F1.BR.89.BZ126	.G.....	A.....G	C.....A
F1.BR.89.BZ163GG	C.....CT.
F1.BR.01.01BR087G.....G	C.....
F1.BR.01.01BR125G.....G	C.....
BF.BR.94.94BR_RJ_41GT.....	A.....G	C.....
BF.BR.94.94BR_RJ_97	A.....G	C.....
BF.BR.99.99UFRJ_2	A.....G	C...T.....
BF.BR.99.99UFRJ_16	.T.G....	..G.....	A.C.....G	C.....
BF.BR.99.99UFRJ_9	.G.....T.....G...	A...A...C	C...G....
BF.BR.94.94BR_RJ_59	A...T.....	A.....C	C...G....
BF.BR.94.94UFRJ_58	A.....	A.....G	C.....
BF1.BR.01.01BR323	A.....
BF1.BR.02.02BR005T.....A.G...	..G.A...G	C.....
BF1.BR.02.02BR034AG...	A.....
B.BR.89.BZ167T...	A...AA...C	C.....C.A
B.BR.02.02BR008-...	A.--.G...	A...AA...C	C.....CAG
B.BR.02.02BR011	.C...TC..C	A.....G...	A...AA...C	C.....CAA
B.BR.02.02BR013	A.....CG.	A...AA...C	C.....CCA
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	A.....A...	A...AA...C	C.....CAG
B.BR.02.02BR002	A.....G...	A...AA...C	C.....AA
29_BF.BR.01.BREPM16704C	A.....T.C...	A...AA...	.C.C.C..C	C.....CCG
BF1.BR.01.01BR047	A.....	A...AA...C	C.....CAA
BF1.BR.01.01BR226	..C--...	A.--.....-	A...AA...-T...C	C.....CAG
29_BF.BR.99.99UFRJ_1	A.....G...	A...AA...C	C.....CAA
BF1.BR.99.BREPM107	A.....G...	A...AA...C	C.....CAG
BF1.BR.99.BREPM108	.G.....A...	A...AA...C	C.....CCA
29_BF.BR.02.BREPM119	.G.....	A.....	A...AA...C	C.....CAA
BF.BR.99.BREPM269	A.....G...G.	A...AA...C	C.....G
BF.BR.99.BREPM275	A.....A...	A...AA...	T.T.....C	C...T..CAG
BF.BR.99.BREPM278	A.....C...A...	A...AA...C	C...T..CAG
BF1.BR.99.BREPM11871	A.....GA...	A...AA...C	C.....CAG
BF1.BR.99.BREPM11884	A.....G...	A...AA...C	T...CA.A
BF1.BR.99.BREPM11931	A.....G...	A...A...C	C.....CCA
BF1.BR.99.BREPM11932	A.....G...	A...AA...C	C.....CCA
29_BF.BR.99.BREPM11948	A.....C...	A...AA...C	C.....CAG
28_BF.BR.99.BREPM12313	.G.....	A.....G...	A...AA...C	C.....CAA
28_BF.BR.99.BREPM12609	A.....G...	A...AA...CC	C.....C.A
28_BF.BR.99.BREPM12817	A.....G...	A...AA...C	C.....CA.
BF1.BR.00.BREPM13853	A.....A...A	A...AA...	.C.....C	C.....CAA
BF1.BR.01.01BR042	A.....G...	A...AA...C	C.....AG
BF1.BR.02.02BR033	A.....A.G...	A...AA...C	C.....CCA
FORWARD PRIMER GP120 DT	----CAAATT	RTAAACAKGT	GGCAGGAA--	-----	-----	-----
SONDA GP120 DT B	-----	-----	-----T	AGGAAAGCA	ATGTATGCCC	CTCCCA----

Figura 11a: Alinhamento de seqüências da região da gp120 (*env*) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema. A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020; as primeiras seqüências, em preto, são do subtipo F, seguidas por seqüências do subtipo B, em cinza.

Posição em Rel.ao HXB2	7.544					7.603
F1.BR.93.93BR020_1	AGGAAACATT	ACCTGTA ACT	CAAATATTAC	AGGTCTGCTA	TTGACAAGAG	ATGGTGGTCT
F1.BR.89.BZ126A.....A
F1.BR.89.BZ163G.....A.....A
F1.BR.01.01BR087A.....A
F1.BR.01.01BR125	...G.A...GA.A.....C.G
BF.BR.94.94BR_RJ_41A...C.....A.....GG
BF.BR.94.94BR_RJ_97TA.....A.....AC
BF.BR.99.99UFRJ_2T.	...G.....A.....A
BF.BR.99.99UFRJ_16G.TYAG.....A.A.....	..A.....AG
BF.BR.99.99UFRJ_9	G.....	...C.....AA.....AA
BF.BR.94.94BR_RJ_59A.....AA
BF.BR.94.94UFRJ_58T.A.....A
BF1.BR.01.01BR323G....C..C..AT..A
BF1.BR.02.02BR005T....C.GA.A.A.....GA
BF1.BR.02.02BR034A....	.A.....AT..AA
B.BR.89.BZ167	T.GC.A...	.GT...TCA.GT.A...	.A.....AA
B.BR.02.02BR008	T...CTAG..	.GA...TCA.G.....	.A.....CAG
B.BR.02.02BR011	G...TA...A	.G...CTCA.GT.....	.A.....AA
B.BR.02.02BR013	...CTA...A	.GA...TCA.A..	...G.....	.A...G.AA
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	T...C.A...A	.GA...TCA.G.....	.A.....AA
B.BR.02.02BR002	...C.A...A	.G...TCA.GA.A...	.A...C...GG
29_BF.BR.01.BREPM16704	...C.A..A	.GA...TCA.	...CA..C..	.CTG..A...	.CA...AT.AG
BF1.BR.01.01BR047	...C.A...A	.GA...TCA.G...A...	C.A.....AG
BF1.BR.01.01BR226	C...C.A..C	.GA...CTCA.A.A...A
29_BF.BR.99.99UFRJ_1T....	.G...TCA.GT.....	.A.....AAA
BF1.BR.99.BREPM107	...C.A...A	.GT...TCA.G.....	.A.....A.GG
BF1.BR.99.BREPM108	...C.A..C	.GAATCTTAG	.GT.....	...GA.A...	.A.....G..GA
29_BF.BR.02.BREPM119	...C.A...A	.GA...CTCA.G...A...	.A.....GAA
BF.BR.99.BREPM269	C...C.A...A	.GA...TCA.	...C.....	...GA.A...	.A.....AA
BF.BR.99.BREPM275	C...C.A...A	.GA...TCA.A.A...A
BF.BR.99.BREPM278	...C.A...A	.GA...CTCA.AA.....G
BF1.BR.99.BREPM11871	...C.G...A	.AA...TCA.G.....	.A.T.....AC
BF1.BR.99.BREPM11884	.A...AC..A	.A...TCA.G...A...	.A.....AA
BF1.BR.99.BREPM11931	...C.A...A	.GA...TCA.GT.....	.A.....A..AA
BF1.BR.99.BREPM11932	...C.A...A	.GA...TCA.GT..T..	.A.....A..AA
29_BF.BR.99.BREPM11948	T....A...A	.AT...TCA.G.....	.A.....AG
28_BF.BR.99.BREPM12313	...C.AC..A	.A...TCA.	...G.....	...G.....	C.A.....	...G..GG
28_BF.BR.99.BREPM12609	...C.A...A	.GA...TCA.G.....	.A.....GTC
28_BF.BR.99.BREPM12817	...GCA...A	.GA...TTA.G...T..	.A.....AAC
BF1.BR.00.BREPM13853	...C.A...A	.GA...TCA.	..T...C..	...GG..A...	.A.....GG
BF1.BR.01.01BR042	...C.G...A	.GA...TCA.GT.....	.A.....AA
BF1.BR.02.02BR033	...C.A...A	.GA...CA.G...A.G	.A.....A
SONDA GP120 DT F	-----	-----	---- ATTAC	AGGTCTACTA	TTGACAAGAG	ATGGTGGTC-

Figura 11b: Continuação do alinhamento anterior

Posição em Rel.ao HXB2	7.642					7.701
F1.BR.93.93BR020_1	GAAATATGAA	AGACAATTGG	AGAAGTGAAT	TATATAAATA	TAAAGTAGTA	GAAATTGAAC
F1.BR.89.BZ126G..
F1.BR.89.BZ163G..
F1.BR.01.01BR087C...A.T.
F1.BR.01.01BR125C...G.
BF.BR.94.94BR_RJ_41
BF.BR.94.94BR_RJ_97C.....
BF.BR.99.99UFRJ_2
BF.BR.99.99UFRJ_16
BF.BR.99.99UFRJ_9	..G.....	G.....C
BF.BR.94.94BR_RJ_59	..G.....	G.....
BF.BR.94.94UFRJ_58
BF1.BR.01.01BR323
BF1.BR.02.02BR005CCC..A.....G.
BF1.BR.02.02BR034G.....C.....A...
B.BR.89.BZ167	..G.....	G.....	A..G.....
B.BR.02.02BR008	..G.C.....	G.....	A.....G.
B.BR.02.02BR011	..G.....	G.....	A.....G.
B.BR.02.02BR013	G.....	C.....G.
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	..G.....	G.....	A.....
B.BR.02.02BR002	..G.....	G.....	GA...G...A.....T...	..G.G..G...A.....CC..
29_BF.BR.01.BREPM16704	..G.....	G.....	AGG.....G.
BF1.BR.01.01BR047	G.....	T.....	A.....
BF1.BR.01.01BR226	..G.....	G.....G.....G...	A.....G.
29_BF.BR.99.99UFRJ_1	..G.....	G.....	A.....G.
BF1.BR.99.BREPM107	..G.....	G.....	A.....
BF1.BR.99.BREPM108	..G.....	G.....	A.....
29_BF.BR.02.BREPM119	..G.....	G.....A..	A.....
BF.BR.99.BREPM269	..G.C.....	G.....G..	A.....
BF.BR.99.BREPM275	G.....	AG.G...G.
BF.BR.99.BREPM278	C...TG...T...T.T.	AT.G...CG.
BF1.BR.99.BREPM11871	..G.....	G.....C.....	A.....G.
BF1.BR.99.BREPM11884	..G.....	G.....	A.....G.
BF1.BR.99.BREPM11931	G.....	AG.....G.
BF1.BR.99.BREPM11932	..G.....	G.....	T.....C.....	AG.....G.
29_BF.BR.99.BREPM11948	..G.....	G.....	C.....G.
28_BF.BR.99.BREPM12313	..G.....	G.....	AG.....
28_BF.BR.99.BREPM12609	..G.....	G.....	A.....G.
28_BF.BR.99.BREPM12817	..G.....	G.....	A.....G.
BF1.BR.00.BREPM13853	..G.....	G.....	A.....
BF1.BR.01.01BR042	..G.....	G.....G.....	AG.....G.
BF1.BR.02.02BR033	..G.C.....	G.....	AG.....G.
REVERSE PRIMER GP120 DT	--ATATGAR	RGACAATTGG	AGAAGTGAAT	TAT-----	-----	-----

Figura 11c: Continuação do alinhamento anterior

Por este alinhamento observa-se que alguns nucleotídeos degenerados tiveram que ser incluídos na síntese de ambos os *primers*, aumentando a abrangência de sua amplificação, mas sem perda de eficiência por estas degenerações se localizarem em região bem anterior à extremidade 3', não interferindo no anelamento e na extensão.

A seqüência das sondas, por sua vez, quando confrontada com outras seqüências de mesmo subtipo, demonstra que as variações de nucleotídeos que haviam entre os isolados virais BZ167 e BR020 nem sempre são características de seqüências do mesmo subtipo, o que poderia gerar hibridizações inespecíficas (destaques na cor cinza, no alinhamento).

Frente a isso, um novo sistema de *primers* e sondas foi desenhado, para a região *env*, com o intuito de discriminar os subtipos, caso o sistema anterior não atingisse o objetivo, ou, por outro lado, como confirmação. Este novo sistema localiza-se na região da glicoproteína gp41, e ficou

denominado como GP41 DT.

Tabela 13: GP41 DT, jogo de *primers* e sondas encontrado para a região da gp41 (*env*).

	Seqüência de Nucleotídeos	Tm	Pos. Gen.
Forward Primer (5'→3')	CGCARAACCARCARGAAAAG	60°	8170 - 8189
Reverse Primer (5'→3')	GCCAITKTGWTATGTCAAACCAAT	60°	8236 - 8259
Sonda Subtipo-Específica B (5'→3')	TTATTGSMATTGGATAARTGGGCAAGT TTGTGG	70°	8201 - 8233
Sonda Subtipo-Específica F (5'→3')	ATTATTGSMATTGGATAARTGGGCAA GTTTGTG	68°	8200 - 8232

Legenda: Tm = Temperatura de *Melting*; Pos. Gen.= Posição Genômica em relação ao genoma HXB2

Este jogo foi desenhado baseado nas diferenças encontradas entre os isolados virais BZ167 e BR020, estando as diferenças evidenciadas no alinhamento a seguir:

Posição em Rel.ao HXB2	8.136					8.195
F1.BR.93.93BR020_1	TACTCAAAAG	AAATATACAG	GTTAATTGAA	GACTCGCAGA	ACCAGCAGGA	AAAGAATGAA
B.BR.89.BZ167	...A..GGCT	T.....C	C.....	..A.....A.A..A..
FORWARD PRIMER GP41 DT	-----	-----	-----	----CGCARA	ACCARCARGA	AAAG-----
Posição em Rel.ao HXB2	8.196					8.255
F1.BR.93.93BR020_1	CAAGAATTAT	TAGCATTTGA	CAAATGGGCA	AGTCTGTGGA	ATTGGTTTGA	CATAACACAG
B.BR.89.BZ167G.A.....	T.....	...T....GA.
SONDA GP41 DT F	----ATTAT	TAGCATTGGA	CAAATGGGCA	AGTCTGTG--	-----	-----
SONDA GP41 DT B	-----TTAT	TGGAATTGGA	TAAATGGGCA	AGTTTGTGG-	-----	-----
Posição em Rel.ao HXB2	8.226					8.285
F1.BR.93.93BR020_1	AGTCTGTGGA	ATTGGTTTGA	CATAACACAG	TGGCTGTGGT	ATATAAAAAT	ATTCATAATG
B.BR.89.BZ167	...T.....GA.
REVERSE PRIMER GP41 DT	-----	ATTGGTTTRA	CATAACACAG	TGGC-----	-----	-----

Figura 12: Alinhamento de seqüências dos isolados virais BZ167 e BR020 e os *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados para a região da gp41 (*env*). A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020.

No alinhamento acima, observa-se que as seqüências dos *primers* apresentam algumas discordâncias entre os isolados. Ambas as sondas igualmente apresentam quatro nucleotídeos divergentes em relação ao subtipo não específico.

Foi realizado um alinhamento com várias seqüências brasileiras obtidas do banco de dados disponibilizado pelo Laboratório Nacional Los Alamos (hiv-web.lanl.gov), e o alinhamento a seguir, com algumas destas seqüências, permite a análise da abrangência deste jogo em amostras clínicas.

Posição em Rel.ao HXB2	8.136				8.195	
F1.BR.93.93BR020_1	TACTCAAAAAG	AAATATACAG	GTTAATTGAA	GACTCGCAGA	ACCAGCAGGA	AAAGAATGAA
F1.BR.89.BZ126T.C.	.G.....	C.A..A...
F1.BR.89.BZ163T.	A.A..A...
F1.BR.01.01BR087G.T.	T.....T..G.....
F1.BR.01.01BR125T.T..G.....	T.....	G.....
BF.BR.94.94BR_RJ_41G.T.	A.A.....
BF.BR.94.94BR_RJ_97T.C.	.G.....	G.....
BF.BR.99.99UFRJ_16T.	A.G.....	..T.....
BF.BR.99.99UFRJ_9G.CA	C.....A..A...
BF.BR.94.94BR_RJ_59C.T..G.....C
BF.BR.94.94UFRJ_58T.A	C.A..A...	G.....	.G.....
BF1.BR.01.01BR323T.T.G.	.A.....	T.....
BF1.BR.02.02BR034G.T.	A.A.....TA.....
B.BR.89.BZ167	..A..GGCT	T.....C	C.....	.A...A.	..A..A.
B.BR.02.02BR008	..A...CA	T.....TC	C.....	.A.....
B.BR.02.02BR011	..A...GCT	T.....T.C	C.....	.A..A..A.	..A..A..
B.BR.02.02BR013	..A...CA	C.....C	C.....	.A...AC	G...A..A.
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	..A...GCT	T...C..TC	C.....	.A...A.A.
B.BR.02.02BR002	..A..GGCA	T.....C	C...C.....	.A...A.	..A.....
BF.BR.99.99UFRJ_2	..T...C...	.G.....	ACG...A.
BF1.BR.02.02BR005	..A..GGCT	T.....C	C..G.....	.A.....
29_BF.BR.01.BREPM16704	C..A..CGCT	TC.....TC	A..GC.....	.A...ACA.
BF1.BR.01.01BR047	..A..GGCT	T.....C	T.....	.A...C.	T...A..A.
BF1.BR.01.01BR226	..A..G.CT	T.....	T.....	.A...A.	..A..A.
29_BF.BR.99.99UFRJ_1	..A..GGT.	T.....TC	C.....	.AG...A.	..A..A.
BF1.BR.99.BREPM107	..A..GGCA	T.....C	A..GC.....	A.A..A..A.A.
BF1.BR.99.BREPM108	..A..G.T.A	C...C.....	A.A.....A.
29_BF.BR.02.BREPM119	..A..GGCT	T.....C	C...C.....	A.....	..A..A.	..A.....
BF.BR.99.BREPM269	..A..G.TT	TG.....C	C.....	.A.....	..A.....	..A.....
BF.BR.99.BREPM275	..A..GG.T	T.....A	C..GC.....	A.A...A.	..A..A.
BF.BR.99.BREPM278	..A..GGTA	T.....C	C.....	A.A...A.	..A..A.
BF1.BR.99.BREPM11871	..A..GGCT	T.....C	C.....	.AG...A.	..A..A.G
BF1.BR.99.BREPM11884	..A..G.CT	T.....C	C.....	.A...A.	..A..A.
BF1.BR.99.BREPM11931	..A..G.CT	T.....	C.....	.A...A.	..A.....
BF1.BR.99.BREPM11932	..A..G.CT	T.....	C.....	.A...A.	..A.....
29_BF.BR.99.BREPM11948	..A..GGCT	T.....C	T.....	.GAG...AT	..A..A.
28_BF.BR.99.BREPM12313	..A..GGCT	T.....C	C...C.....	.A...A.	..A..A.	..A.....
28_BF.BR.99.BREPM12609	..A..G.CA	TG.....C	C.....	A.AG...A.	..A..A.
28_BF.BR.99.BREPM12817	..A..GGC.	T.....A	T.....	.AG...A.	..A..A.
BF1.BR.00.BREPM13853	..A..GGCT	T.....A	C...C.....	.A...A.	..A..A.
BF1.BR.01.01BR042	..A..GGCT	T.....A	C...C.....	.A.....	..A..A.
BF1.BR.02.02BR006	..A..GGCT	T.....C	C.....	.A.....	..A.....
BF1.BR.02.02BR033	..A..GGCT	T.....C	C.....	.A...A.	TT..A..A.
FORWARD PRIMER GP41 DT	-----	-----	-----	----CGCARA	ACCARCARGA	AAAG-----

Figura 13a: Alinhamento de seqüências da região da gp41 (*env*) provenientes do Banco de Dados do Laboratório Nacional Los Alamos, nos subtipos B e F, incluindo a seqüência dos isolados virais BZ167 e BR020 e dos *primers* e sondas subtipo-específicas desenhados neste sistema. A seqüência tomada como consenso é a do subtipo BR020; as primeiras seqüências, em preto, são do subtipo F, seguidas por seqüências do subtipo B, em cinza.

Posição em Rel.ao HXB2	8.196					8.255
F1.BR.93.93BR020_1	CAAGAATTAT	TAGCATTGGA	CAAATGGGCA	AGTCTGTGGA	ATTGGTTTGA	CATAACACAG
F1.BR.89.BZ126	.G.	.G.T.A.T
F1.BR.89.BZ163	.G.	.G.	.	.	AG	.T.A.C
F1.BR.01.01BR087	A..C.	.G.	.TC.	.	.	.T.A.C
F1.BR.01.01BR125	.C.	.	.A.	.	G..A.	.T.A.T
BF.BR.94.94BR_RJ_41	.	.G.T.A.C
BF.BR.94.94BR_RJ_97	.G..C	.G.A.T.A.C
BF.BR.99.99UFRJ_16T..C
BF.BR.99.99UFRJ_9	.	.G.	.G.	.	.	.T.A.C
BF.BR.94.94BR_RJ_59	.	.G.	.	.	C.....	.T.A.C
BF.BR.94.94UFRJ_58	A.....	.G.A..A.T.A.C
BF1.BR.01.01BR323	.GC.	.	T.	.	.	.T.A.A
BF1.BR.02.02BR034	.	.	T.	.	.	.AGC
B.BR.89.BZ167	.	.G.A.	T.	.T..G	.A.	.
B.BR.02.02BR008	.	.G.A.	T..G.	.T.	.A.	.T.A.C
B.BR.02.02BR011	A.G.....	.G.A.....	TG.G.....	.C.....	.CAG	.A.A
B.BR.02.02BR013	.	.	TTCG.....	.T.....	.AG	.T.A.A
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	.	.G.A..A.	T.....	.T.....	.A.	.A.T
B.BR.02.02BR002	.C.	.AA.	T..G.	GA.T.	G.....A.	.A.T
BF.BR.99.99UFRJ_2	.	.G.T..C
BF1.BR.02.02BR005	.	.GT.	.	.C.....	G.....	T..T.A.C
29_BF.BR.01.BREPM16704	.	.GCA.	T..G.	.A.T.	G.....	.A.A
BF1.BR.01.01BR047	.	.G..A.	TC.....	.T.....	.	.A.A
BF1.BR.01.01BR226	.C.	.A.	T.....	.A.T.....	.	T..T.A.T
29_BF.BR.99.99UFRJ_1	.T.	.GCA.	T.C.....	.T.....	.AG	.T.A.T
BF1.BR.99.BREPM107	.	.G.A.	T..G.	.A.T.....	.	.T.A.C
BF1.BR.99.BREPM108	.C.	.G.	T..G.	.T.....	G.....	.A.C
29_BF.BR.02.BREPM119	.G.	.G.A.	T..G.	.A.T.A.	.	.C
BF.BR.99.BREPM269	A..C.	.G.A.	TC.G.	.T.....	.AG	.A
BF.BR.99.BREPM275	.	.G.A.	T.....	.A.T.....	G.....	.A.C
BF.BR.99.BREPM278	.G.	.G.T.A.T
BF1.BR.99.BREPM11871	.C.	.GCA..A.	TTCG.....	.T.....	G.....CAG	.A.A
BF1.BR.99.BREPM11884	.G.	.G.A..A.	T.....	.T.....	.	.A
BF1.BR.99.BREPM11931	.	.GCA.	TGC.....	.T.....	.AG	.A.A
BF1.BR.99.BREPM11932	.	.GCA.	TGC.....	.T.A.	.AG	.A.A
29_BF.BR.99.BREPM11948	.	.CA.	T..G.	.T.....	G.....	.A.A
28_BF.BR.99.BREPM12313	.G.	.GCA.	.C.G.	.T.....	.	.T.A.C
28_BF.BR.99.BREPM12609	.C.	.GCA.	T.CG.	.CT.	.	.A.C
28_BF.BR.99.BREPM12817	.	.GCA.	T.CG.	.T.....	.A.	.A.A
BF1.BR.00.BREPM13853	.G.	.G.	T..G.	.A.T.....	.	.A
BF1.BR.01.01BR042	.	.G.A.	T..G.	.A.T.....	.	.T..GA
BF1.BR.02.02BR006	.G.	.G.A.	TC.G.	.T.....	.AG	.A.A
BF1.BR.02.02BR033	.C.	.G..A.	T.C.	.T.....	.	.T.A.C
SONDA GP41 DT B	-----TTAT	T C SMATTGGA	TAAR T GGGCA	AGT T TGTGG-	-----	-----
SONDA GP41 DT F	-----ATTAT	TR G CATTGGA	CAA A TGGGCA	AGT C TGTG--	-----	-----

Figura 13b: Continuação do alinhamento anterior

Posição em Rel.ao HXB2	8.226	8.285
F1.BR.93.93BR020_1	AGTCTGTGGA ATTGGTTTGA CATAACACAG TGGCTGTGGT ATATAAAAAT ATTCATAATG	
F1.BR.89.BZ126T..A.T
F1.BR.89.BZ163AG.....T..A.C
F1.BR.01.01BR087T..A.CG.....
F1.BR.01.01BR125G.....A.....T..A.TG.....T.....
BF.BR.94.94BR_RJ_41T..A.CC.....
BF.BR.94.94BR_RJ_97T..A.CG.....
BF.BR.99.99UFRJ_16T..CG.....
BF.BR.99.99UFRJ_9T..A.CG.C.....
BF.BR.94.94BR_RJ_59C.....T..A.CG.....
BF.BR.94.94UFRJ_58T..A.C
BF1.BR.01.01BR323T..A.A
BF1.BR.02.02BR034AGC
B.BR.89.BZ167	...T...G...A...	
B.BR.02.02BR008	...T.....A.....T..A.C
B.BR.02.02BR011	...C.....CAG.....A.A
B.BR.02.02BR013	...T.....AG.....T..A.A
B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU	...T.....A.....A.TT.....
B.BR.02.02BR002	GA.T.....G.....A.....A.TG.....
BF.BR.99.99UFRJ_2T...C.....A.....C.....G..
BF1.BR.02.02BR005	...C.....G.....T...T..A.C
29_BF.BR.01.BREPM16704	...A.T.....G.....A.AC...G.C.....
BF1.BR.01.01BR047	...T.....A.A
BF1.BR.01.01BR226	...A.T.....T...T..A.TG.....A
29_BF.BR.99.99UFRJ_1	...T.....AG.....T..A.T
BF1.BR.99.BREPM107	...A.T.....T..A.C
BF1.BR.99.BREPM108	...T.....G.....A.CG.....
29_BF.BR.02.BREPM119	...A.T.A.....C
BF.BR.99.BREPM269	...T.....AG.....AA
BF.BR.99.BREPM275	...A.T.....G.....A.C
BF.BR.99.BREPM278T..A.TG.....
BF1.BR.99.BREPM11871	...T.....G.....CAG.....A.A
BF1.BR.99.BREPM11884	...T.....AT.....
BF1.BR.99.BREPM11931	...T.....AG.....A.AC...C..T.....
BF1.BR.99.BREPM11932	...T.A.....AG.....A.AC...C..T.....
29_BF.BR.99.BREPM11948	...T.....G.....A.AG.....A
28_BF.BR.99.BREPM12313	...T.....T..A.CG.....
28_BF.BR.99.BREPM12609	...CT.....A.C
28_BF.BR.99.BREPM12817	...T.....A.....A.AG.....
BF1.BR.00.BREPM13853	...A.T.....A
BF1.BR.01.01BR042	...A.T.....T...GAC.....
BF1.BR.02.02BR006	...T.....AG.....A.A
BF1.BR.02.02BR033	...T.....T..A.CG.....
REVERSE PRIMER GP41 DT	----- ATTGGTTTGA CATAWCAMAI TGGC-----	-----

Figura 13c: Continuação do alinhamento anterior

Com este alinhamento foi possível perceber que nucleotídeos degenerados deveriam ser acrescentados não só nas seqüências dos *primers*, mas também das sondas, garantindo assim a abrangência do sistema. As sondas foram desenhadas com seis diferenças em relação ao subtipo não específico, considerando nucleotídeos degenerados.

4.3.3. Ensaio de PCR em tempo real

4.3.3.1 Curva de calibração

O protocolo para a construção da curva de calibração foi realizado para todas as reações de amplificação desenvolvidas, sendo uma curva diferente para cada subtipo, já que as sondas não são as mesmas, resultando em ensaios que podem apresentar eficiências distintas. A curva de cada PCR para cada subtipo foi realizada repetidamente permitindo a avaliação da reprodutibilidade de cada ensaio e o prosseguimento com cálculos de eficiência de cada um destes ensaios.

Todos os ensaios de amplificação foram realizados utilizando cinco pontos de diluição de cada isolado viral de cultura, cujas quantificações foram estimadas na Tabela 8. As reações foram realizadas em duplicata, na presença da sonda específica do isolado. A média aritmética dos valores de Ct de cada curva, bem como a média dos valores de Ct de todas as curvas foram calculadas, expressas em tabelas, permitindo a construção de uma curva padrão, e, assim, o cálculo de eficiência. A média aritmética, juntamente com o cálculo do desvio padrão para cada ponto da diluição seriada, também permitiu a avaliação da reprodutibilidade do ensaio, por meio do cálculo do coeficiente de variação em cada PCR desenvolvida.

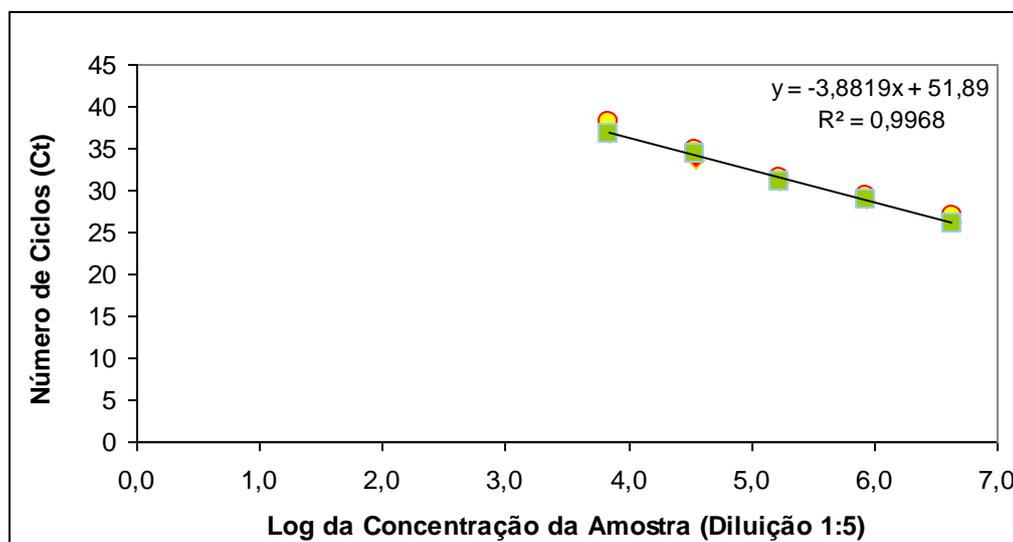
I. Região da protease (*pol*)

Sonda B-específica e isolado viral BZ167

Tabela 14: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando PROT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
4.343.330	6,64	26,15	26,85	25,85	26,08
868.666	5,94	28,80	29,20	28,75	28,23
173.733	5,24	31,05	31,35	31,05	30,30
34.747	4,54	33,60	34,85	34,30	33,23
6.949	3,84	36,65	38,20	36,70	35,70

Gráfico 1: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da protease do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando PROT DT e sonda específica para o subtipo B.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,8819x + 51,89$, sendo $-3,8819$ sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9968$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 15: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando PROT DT e sonda específica para subtipo B.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
4.343.330	6,64	26,08	0,51	1,96
868.666	5,94	28,23	0,25	0,89
173.733	5,24	30,30	0,17	0,56
34.747	4,54	33,23	0,63	1,90
6.949	3,84	35,70	0,88	2,46

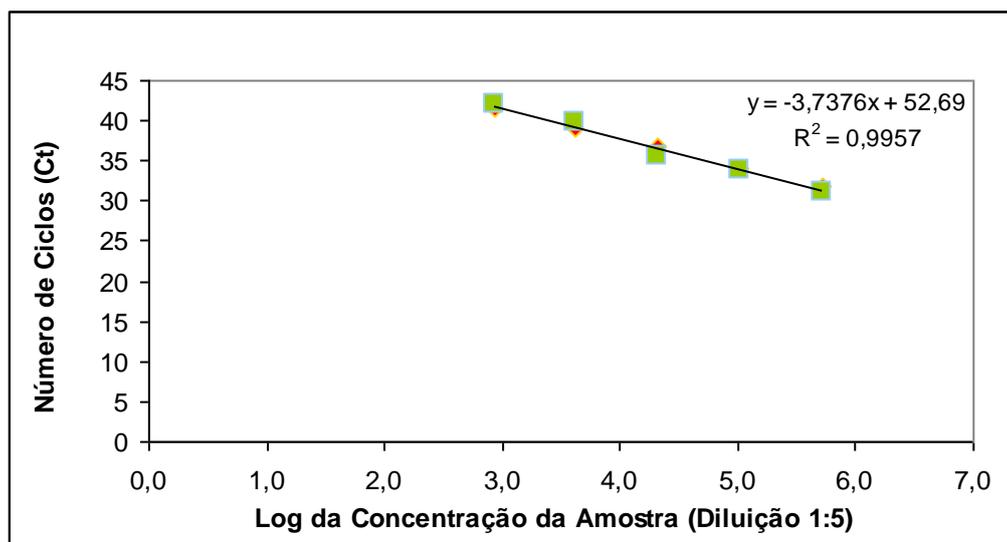
Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 14; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{DP}{M}\right) \cdot 100$.

Sonda F-específica e isolado viral BR020

Tabela 16: Média dos valores de Cts obtidos de dois ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando PROT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Média dos dois ensaios
529.667	5,72	31,90	31,00	31,45
105.933	5,03	34,15	33,70	33,93
21.187	4,33	36,70	35,45	36,08
4.237	3,63	39,00	39,80	39,40
847	2,93	41,60	41,95	41,78

Gráfico 2: Gráfico representativo da realização de duas curvas de calibração da amplificação da região da protease do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando PROT DT e sonda específica para o subtipo F.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,7376x + 52,69$, sendo $-3,7376$ sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9957$. Os dois diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as dois diferentes curvas.

Tabela 17: Cálculo do coeficiente de variação de dois ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando PROT DT e sonda específica para subtipo F.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
529.667	5,72	31,45	0,64	2,03
105.933	5,03	33,93	0,32	0,94
21.187	4,33	36,08	0,88	2,44
4.237	3,63	39,40	0,57	1,45
847	2,93	41,78	0,25	0,60

Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos dois diferentes ensaios, descritos na tabela 16; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{OP}{M} \right) \cdot 100$.

Tabela 18: Eficiência e correlação do sistema PROT DT.

Análise	Subtipo B	Subtipo F
Inclinação	-3,8819	-3,7376
Cálculo de Eficiência	1,809696771	1,851617897
Eficiência	80,96967714	85,16178971
Correlação	0,9968	0,9957

Legenda: Inclinação = inclinação da reta, dada por seu coeficiente angular; Cálculo de eficiência = utilização da fórmula, descrita por Pfaffl, $\text{Eficiência} = 10^{\left(\frac{Ct}{\text{inclinação}} \right)}$; Eficiência = $(1 - \text{cálculo de eficiência}) \times 100$; Correlação = r^2 , fornecido pela linha de tendência.

A linearização de ambos os ensaios foi evidenciada pelos valores de correlação obtidos de $r^2 = 0,9968$ para o sistema do subtipo B, e $r^2 = 0,9957$ para o F. Quanto à eficiência, os cálculos estimam aproximadamente 80,97% para o sistema do subtipo B e 85,16% para o F. Os cálculos também avaliaram a reprodutibilidade do ensaio, indicada pelos valores de coeficiente de variação, que foram, para o menor e maior ponto da diluição seriada respectivamente, 2,46 e 1,96 para o sistema do subtipo B, e 0,60 e 2,03 para o sistema do subtipo F. Para ambos os sistemas, de forma geral, os coeficientes de variação encontrados para cada ponto de diluição foram menores que 2,50.

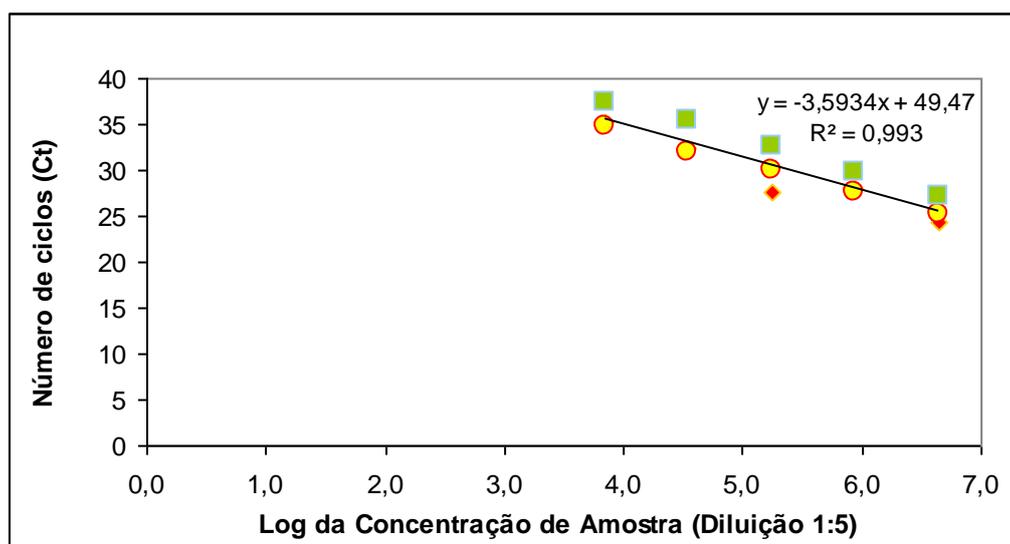
II. Região da transcriptase reversa (*pol*)

Sonda B-específica e isolado viral BZ167

Tabela 19: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando RT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
4.343.330	6,638	24,25	25,30	27,25	25,60
868.666	5,939	27,95	27,65	29,85	28,48
173.733	5,240	27,65	30,10	32,55	30,10
34.747	4,541	32,45	32,00	35,35	33,27
6.949	3,842	35,15	34,70	37,45	35,77

Gráfico 3: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da transcriptase reversa do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando RT DT e sonda específica para o subtipo B.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,5934x + 49,47$, sendo -3,5934 sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,993$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 20: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando RT DT e sonda específica para subtipo B.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
4.343.330	6,64	25,60	1,52	5,94
868.666	5,94	28,48	1,19	4,18
173.733	5,24	30,10	2,45	8,14
34.747	4,54	33,27	1,81	5,44
6.949	3,84	35,77	1,48	4,14

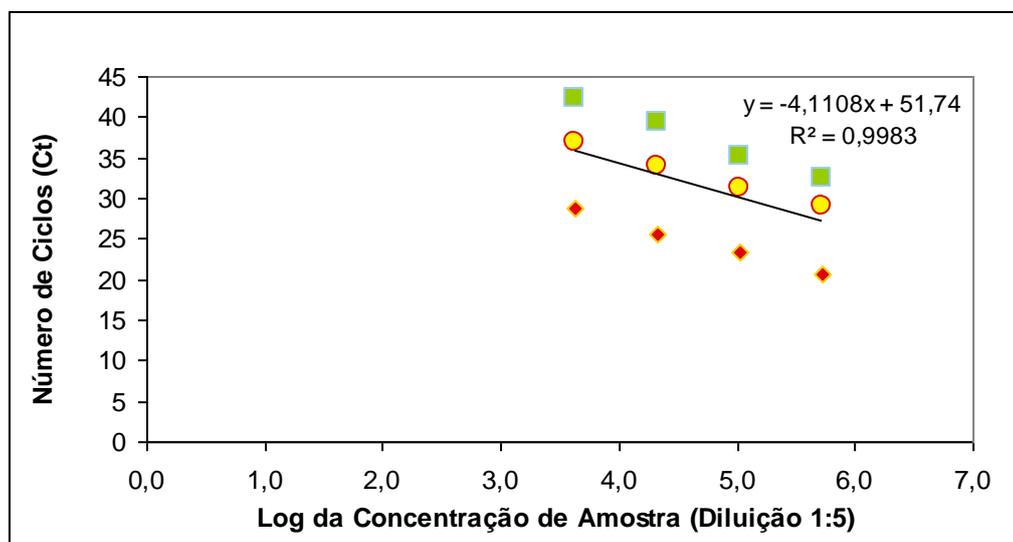
Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 19; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{OP}{M} \right) \cdot 100$.

Sonda F-específica e isolado viral BR020

Tabela 21: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de quatro pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando RT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
529.667	5,724	20,65	29,10	32,50	27,42
105.933	5,025	23,35	31,35	35,15	29,95
21.187	4,326	25,55	34,00	39,40	32,98
4.237	3,627	28,75	37,00	42,20	35,98

Gráfico 4: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da transcriptase reversa do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando RT DT e sonda específica para o subtipo F.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -4,1108x + 51,74$, sendo $-4,1108$ sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9983$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 22: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando RT DT e sonda específica para subtipo F.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
529.667	5,72	27,42	6,10	22,25
105.933	5,03	29,95	6,02	20,10
21.187	4,33	32,98	6,98	21,16
4.237	3,63	35,98	6,78	18,84

Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 21; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{DP}{M} \right) \cdot 100$.

Tabela 23: Eficiência e correlação do sistema RT DT.

Análise	Subtipo B	Subtipo F
Inclinação	-3,5934	-4,1108
Cálculo de Eficiência	1,897964008	1,750901248
Eficiência	89,79640078	75,09012478
Correlação	0,9930	0,9983

Legenda: Inclinação = inclinação da reta, dada por seu coeficiente angular; Cálculo de eficiência = utilização da fórmula, descrita por Pfaffl, $\text{Eficiência} = 10^{(1/\text{inclinação})}$; Eficiência = $(1 - \text{cálculo de eficiência}) \times 100$; Correlação = r^2 , fornecido pela linha de tendência.

A linearização de ambos os ensaios foi evidenciada pelos valores de correlação obtidos de $r^2 = 0,9930$ para o sistema do subtipo B, e $r^2 = 0,9983$ para o F. Quanto à eficiência, os cálculos estimam aproximadamente 89,80% para o sistema do subtipo B e 75,09% para o F. Os cálculos também avaliaram a reprodutibilidade do ensaio, indicada pelos valores de coeficiente de variação, que foram, para o menor e maior ponto da diluição seriada respectivamente, 4,14 e 5,94 para o sistema do subtipo B, e 18,84 e 22,25 para o sistema do subtipo F.

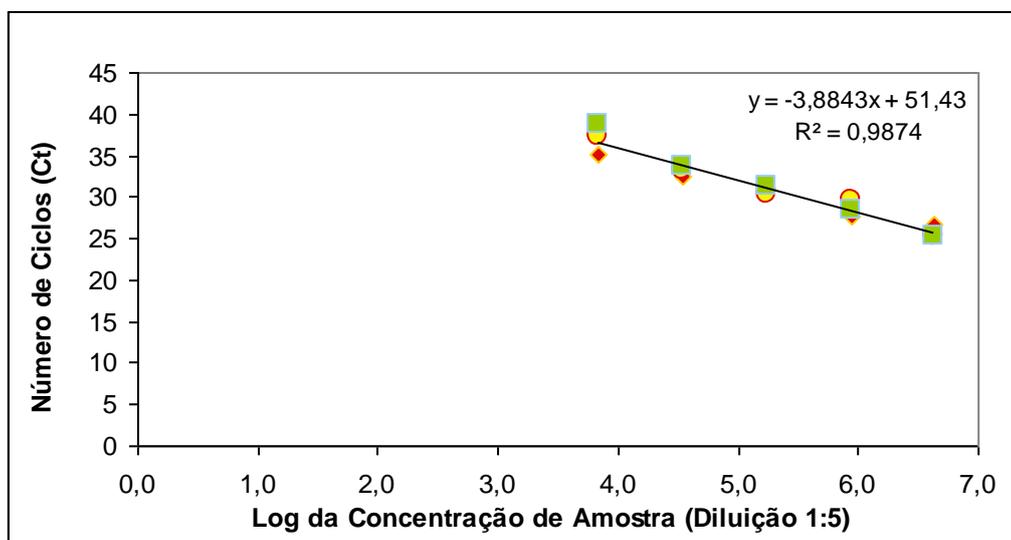
III. Região da integrase (*pol*)

Sonda B-específica e isolado viral BZ167

Tabela 24: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando INT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
4.343.330	6,638	26,75	25,15	25,25	25,72
868.666	5,939	27,70	29,70	28,50	28,63
173.733	5,240	30,95	30,40	31,25	30,87
34.747	4,541	32,50	33,15	33,60	33,08
6.949	3,842	35,25	37,30	38,65	37,07

Gráfico 5: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da integrase do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando INT DT e sonda específica para o subtipo B.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,8843x + 51,43$, sendo $-3,8843$ sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9974$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 25: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando INT DT e sonda específica para subtipo B.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
4.343.330	6,64	25,72	0,90	3,50
868.666	5,94	28,63	1,01	3,53
173.733	5,24	30,87	0,43	1,39
34.747	4,54	33,08	0,55	1,66
6.949	3,84	37,07	1,71	4,61

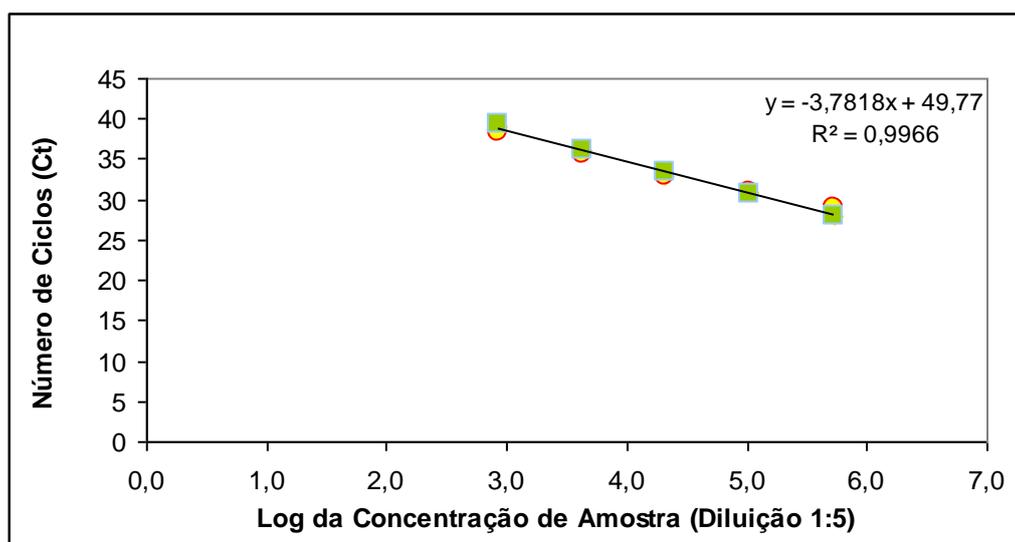
Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 24; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{OP}{M} \right) \cdot 100$.

Sonda F-específica e isolado viral BR020

Tabela 26: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando INT DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
529.667	5,724	27,90	28,95	27,95	28,27
105.933	5,025	30,80	31,00	30,75	30,85
21.187	4,326	32,90	32,95	33,40	33,08
4.237	3,627	36,05	35,55	36,05	35,88
847	2,928	39,10	38,40	39,40	38,97

Gráfico 6: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da integrase do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando INT DT e sonda específica para o subtipo F.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,7818x + 49,77$, sendo $-3,7818$ sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9966$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 27: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando INT DT e sonda específica para subtipo F.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
529.667	5,72	28,27	0,59	2,09
105.933	5,03	30,85	0,13	0,42
21.187	4,33	33,08	0,28	0,85
4.237	3,63	35,88	0,29	0,81
847	2,93	38,97	0,51	1,31

Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 26; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \frac{OP}{M} \cdot 100$.

Tabela 28: Eficiência e correlação do sistema INT DT.

Análise	Subtipo B	Subtipo F
Inclinação	-3,8843	-3,7818
Cálculo de Eficiência	1,809033645	1,838333698
Eficiência	80,90336454	83,83336979
Correlação	0,9874	0,9966

Legenda: Inclinação = inclinação da reta, dada por seu coeficiente angular; Cálculo de eficiência = utilização da fórmula, descrita por Pfaffl, $\text{Eficiência} = 10^{(1/\text{inclinação})}$; Eficiência = $(1 - \text{cálculo de eficiência}) \times 100$; Correlação = r^2 , fornecido pela linha de tendência.

A linearização de ambos os ensaios foi evidenciada pelos valores de correlação obtidos de $r^2 = 0,9874$ para o sistema do subtipo B, e $r^2 = 0,9966$ para o F. Quanto à eficiência, os cálculos estimam aproximadamente 80,90% para o sistema do subtipo B e 83,83% para o F. Os cálculos também avaliaram a reprodutibilidade do ensaio, indicada pelos valores de coeficiente de variação, que foram, para o menor e maior ponto da diluição seriada respectivamente, 4,61 e 3,50 para o sistema do subtipo B, e 1,31 e 2,09 para o sistema do subtipo F. Para ambos os sistemas, estes são os maiores valores de coeficientes de variação encontrados.

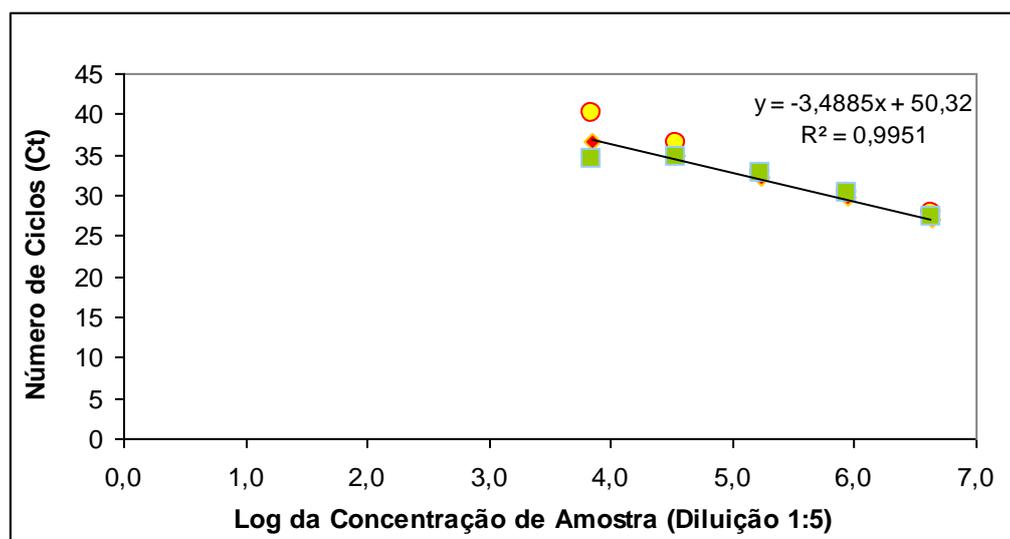
IV. Região da gp120 (env)

Sonda B-específica e isolado viral BZ167

Tabela 29: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando GP120 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
4.343.330	6,638	26,00	27,70	27,25	26,98
868.666	5,939	28,60	30,15	30,20	29,65
173.733	5,240	31,15	32,75	32,65	32,18
34.747	4,541	33,35	36,40	34,75	34,83
6.949	3,842	35,20	40,05	34,50	36,58

Gráfico 7: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da gp120 do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP120 DT e sonda específica para o subtipo B.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,4885x + 50,32$, sendo -3,4885 sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9951$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 30: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando GP120 DT e sonda específica para subtipo B.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
4.343.330	6,64	26,98	0,88	3,26
868.666	5,94	29,65	0,91	3,07
173.733	5,24	32,18	0,90	2,80
34.747	4,54	34,83	1,53	4,39
6.949	3,84	36,58	3,02	8,26

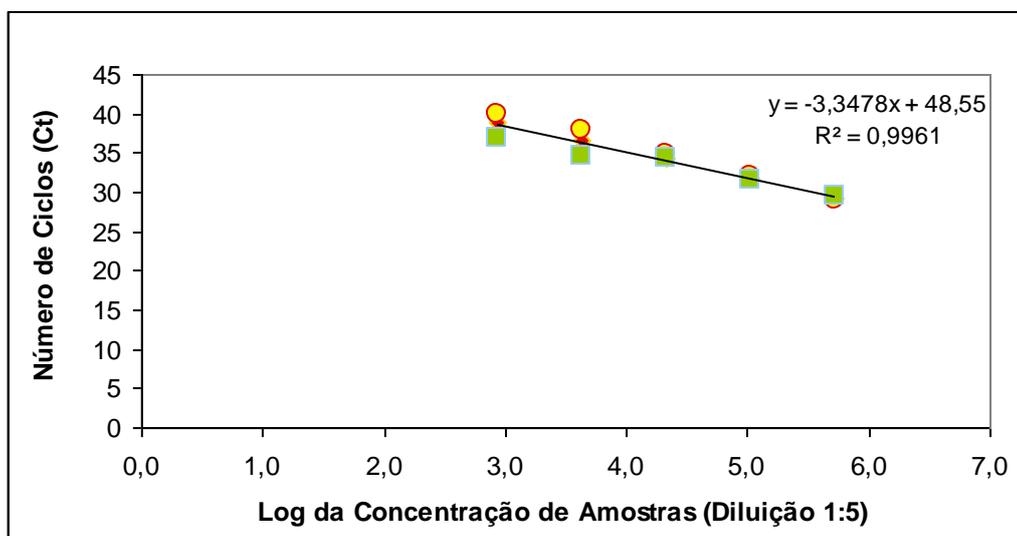
Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 29; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{OP}{M} \right) \cdot 100$.

Sonda F-específica e isolado viral BR020

Tabela 31: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando GP120 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
529.667	5,724	29,25	28,90	29,40	29,18
105.933	5,025	31,85	31,95	31,45	31,75
21.187	4,326	34,20	34,80	34,30	34,43
4.237	3,627	36,65	37,90	34,70	36,42
847	2,928	38,85	39,85	36,95	38,55

Gráfico 8: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da gp120 do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP120 DT e sonda específica para o subtipo F.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,3478x + 48,55$, sendo $-3,3478$ sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9961$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 32: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando GP120 DT e sonda específica para subtipo F.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
529.667	5,72	29,18	0,26	0,89
105.933	5,03	31,75	0,26	0,82
21.187	4,33	34,43	0,32	0,93
4.237	3,63	36,42	1,61	4,42
847	2,93	38,55	1,47	3,81

Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 31; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{OP}{M}\right)100$.

Tabela 33: Eficiência e correlação do sistema GP120 DT.

Análise	Subtipo B	Subtipo F
Inclinação	-3,4885	-3,3478
Cálculo de Eficiência	1,934889447	1,989315316
Eficiência	93,48894469	98,93153157
Correlação	0,9951	0,9961

Legenda: Inclinação = inclinação da reta, dada por seu coeficiente angular; Cálculo de eficiência = utilização da fórmula, descrita por Pfaffl, $\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{inclinação})}$; Eficiência = $(1 - \text{cálculo de eficiência}) \times 100$; Correlação = r^2 , fornecido pela linha de tendência.

A linearização de ambos os ensaios foi evidenciada pelos valores de correlação obtidos de $r^2 = 0,9951$ para o sistema do subtipo B, e $r^2 = 0,9961$ para o F. Quanto à eficiência, os cálculos estimam aproximadamente 93,49% para o sistema do subtipo B e 98,93% para o F. Os cálculos também avaliaram a reprodutibilidade do ensaio, indicada pelos valores de coeficiente de variação, que foram, para o menor e maior ponto da diluição seriada respectivamente, 8,26 e 3,26 para o sistema do subtipo B, e 3,81 e 0,89 para o sistema do subtipo F.

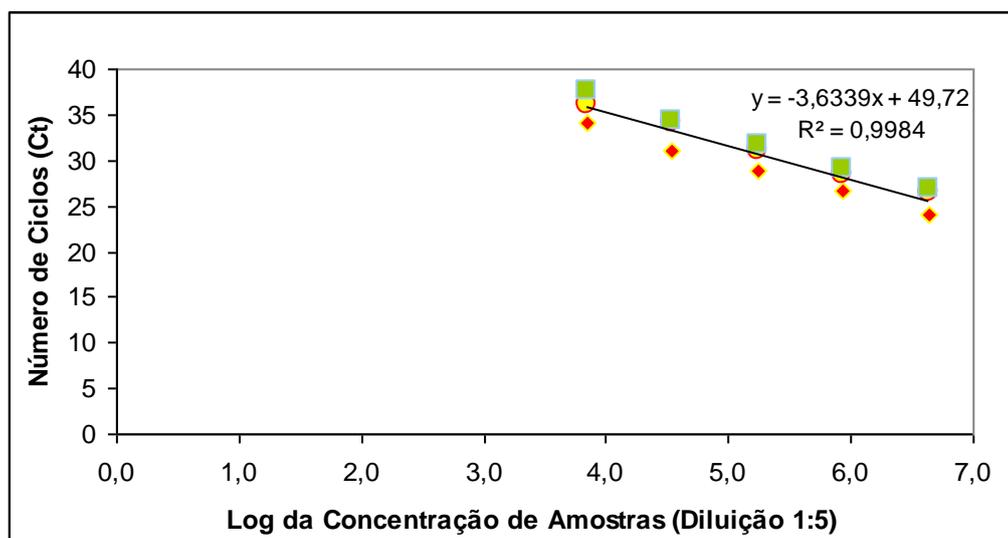
V. Região da gp41 (env)

Sonda B-específica e isolado viral BZ167

Tabela 34: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BZ167, utilizando GP41 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
4.343.330	6,638	23,95	26,55	26,80	25,77
868.666	5,939	26,65	28,40	29,15	28,07
173.733	5,240	28,90	30,95	31,80	30,55
34.747	4,541	31,05	34,00	34,25	33,10
6.949	3,842	34,15	36,10	37,60	35,95

Gráfico 9: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da gp41 do isolado viral BZ167, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP41 DT e sonda específica para o subtipo B.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,6339x + 49,72$, sendo $-3,6339$ sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9984$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 35: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BZ167, utilizando GP41 DT e sonda específica para subtipo B.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
4.343.330	6,64	25,77	1,58	6,13
868.666	5,94	28,07	1,29	4,60
173.733	5,24	30,55	1,49	4,88
34.747	4,54	33,10	1,78	5,38
6.949	3,84	35,95	1,73	4,81

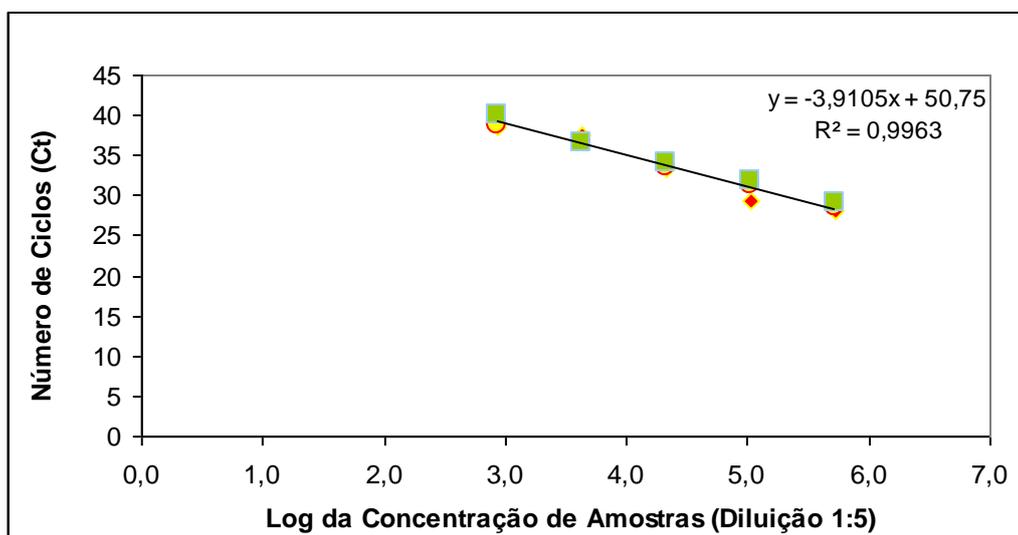
Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 34; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{OP}{M} \right) \cdot 100$.

Sonda F-específica e isolado viral BR020

Tabela 36: Média dos valores de Cts obtidos de três ensaios de amplificação em duplicata de cinco pontos de diluição do isolado viral BR020, utilizando GP41 DT, e média final dos valores de Ct para todas as repetições.

Amostra	Log Amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos três ensaios
529.667	5,724	28,15	28,50	29,05	28,57
105.933	5,025	29,40	31,45	31,80	30,88
21.187	4,326	33,30	33,50	33,95	33,58
4.237	3,627	37,55	36,65	36,55	36,92
847	2,928	38,60	38,90	40,15	39,22

Gráfico 10: Gráfico representativo da realização de três curvas de calibração da amplificação da região da gp41 do isolado viral BR020, nas diluições de 1 para 5 do sobrenadante de cultura de seis dias de cultivo, utilizando GP41 DT e sonda específica para o subtipo F.



Legenda: A equação da reta foi dada por $y = -3,9105x + 50,75$, sendo -3,9105 sua inclinação, com uma correlação de $r^2 = 0,9963$. Os três diferentes símbolos representam a média dos valores de Ct obtidos para as três diferentes curvas.

Tabela 37: Cálculo do coeficiente de variação de três ensaios de amplificação do isolado viral BR020, utilizando GP41 DT e sonda específica para subtipo F.

Amostra	Log Amostra	Média de Ct	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
529.667	5,72	28,57	0,43	1,51
105.933	5,03	30,88	1,30	4,21
21.187	4,33	33,58	0,33	0,98
4.237	3,63	36,92	0,55	1,49
847	2,93	39,22	0,82	2,09

Legenda: Média de Ct = média aritmética dos valores de Ct obtidos nos três diferentes ensaios, descritos na tabela 36; Desvio Padrão = desvio padrão calculado entre os valores de Ct obtidos nos diferentes ensaios; Coeficiente de Variabilidade = calculado utilizando a fórmula $CV = \left(\frac{OP}{M} \right) \cdot 100$.

Tabela 38: Eficiência e correlação do sistema GP41 DT.

Análise	Subtipo B	Subtipo F
Inclinação	-3,6339	-3,9105
Cálculo de Eficiência	1,884457897	1,80186303
Eficiência	88,44578971	80,18630302
Correlação	0,9984	0,9963

Legenda: Inclinação = inclinação da reta, dada por seu coeficiente angular; Cálculo de eficiência = utilização da fórmula, descrita por Pfaffl, $Eficiência = 10^{(1/ \text{inclinação})}$; Eficiência = $(1 - \text{cálculo de eficiência}) \times 100$; Correlação = r^2 , fornecido pela linha de tendência.

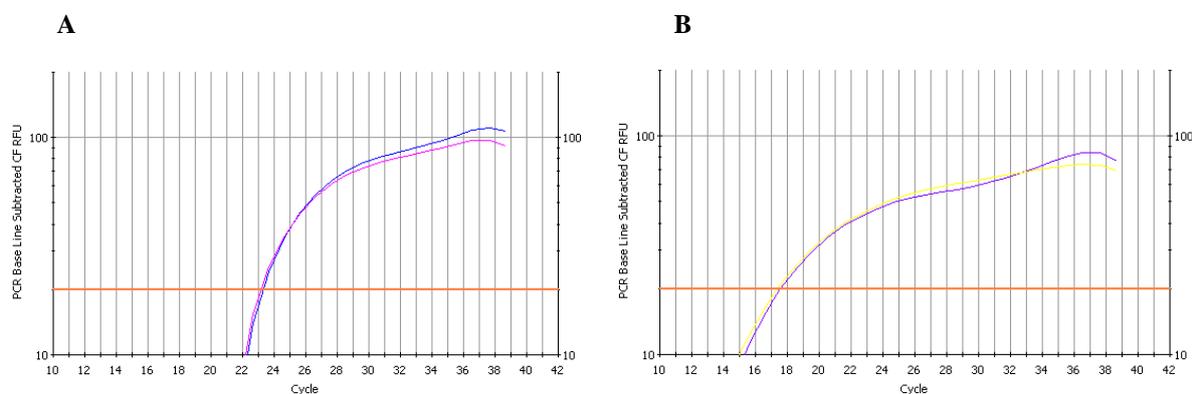
A linearização de ambos os ensaios foi evidenciada pelos valores de correlação obtidos de $r^2 = 0,9984$ para o sistema do subtipo B, e $r^2 = 0,9963$ para o F. Quanto à eficiência, os cálculos estimam aproximadamente 88,45% para o sistema do subtipo B e 80,19% para o F. Os cálculos também avaliaram a reprodutibilidade do ensaio, indicada pelos valores de coeficiente de variação, que foram, para o menor e maior ponto da diluição seriada respectivamente, 4,81 e 6,13 para o sistema do subtipo B, e 2,09 e 1,51 para o sistema do subtipo F.

4.3.3.2. Reações de especificidade

Após extração, reação de transcrição reversa e a primeira amplificação específica dos isolados virais BZ167 e BR020, como descrito na metodologia, estes isolados foram submetidos à amplificação em tempo real, em duplicata, na presença de sua sonda específica e na presença da sonda específica para outro subtipo.

I. Região da protease (*pol*)

Gráfico 11: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com PROT DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



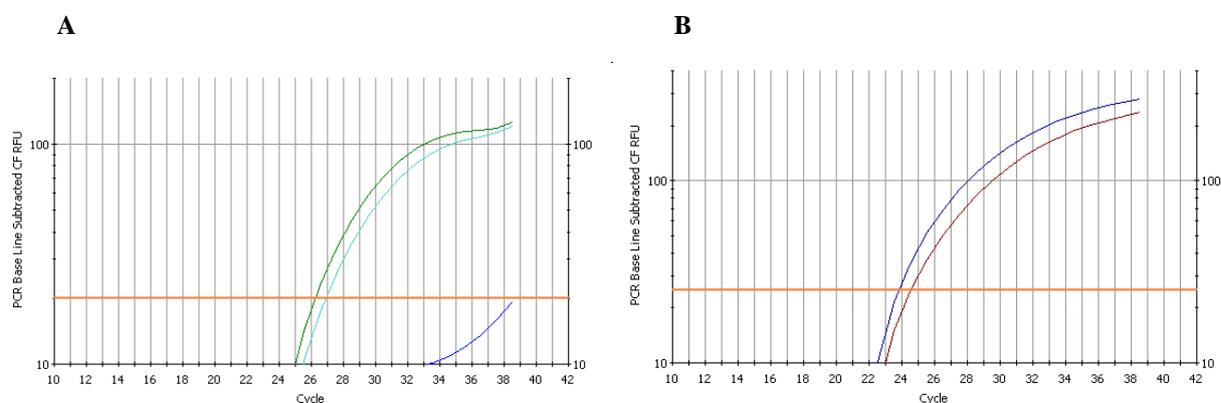
Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

Tabela 39: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com PROT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)
1 - BZ167	23,2	NA
2 - BZ167	23,1	NA
1 - BR020	NA	17,6
2 - BR020	NA	17,4

II. Região da transcriptase reversa (*pol*)

Gráfico 12: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com RT DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



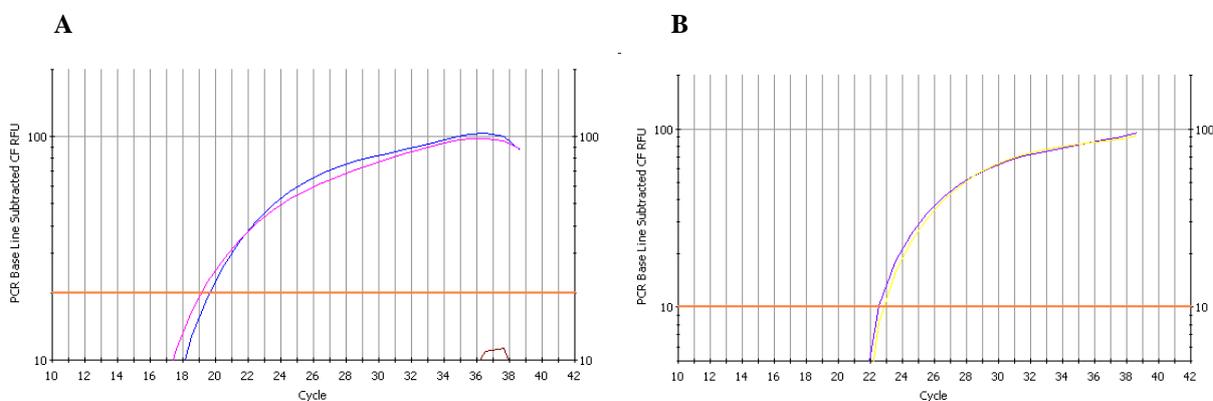
Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

Tabela 40: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com RT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)
1 - BZ167	26,2	NA
2 - BZ167	26,9	NA
1 - BR020	NA	24,6
2 - BR020	NA	23,8

III. Região da integrase (*pol*)

Gráfico 13: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com INT DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



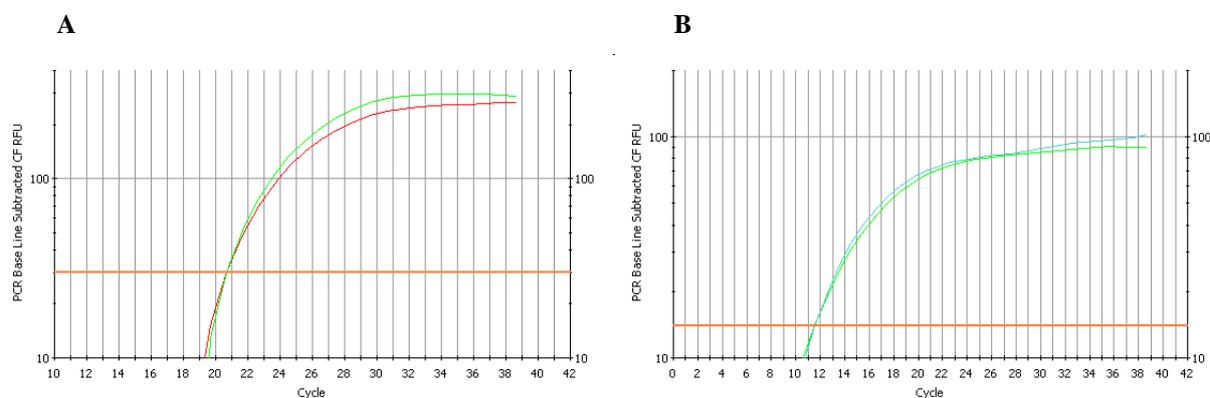
Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

Tabela 41: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com INT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)
1 - BZ167	19,6	NA
2 - BZ167	19,2	NA
1 - BR020	NA	22,5
2 - BR020	NA	22,8

IV. Região da gp120 (*env*)

Gráfico 14: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com GP120 DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



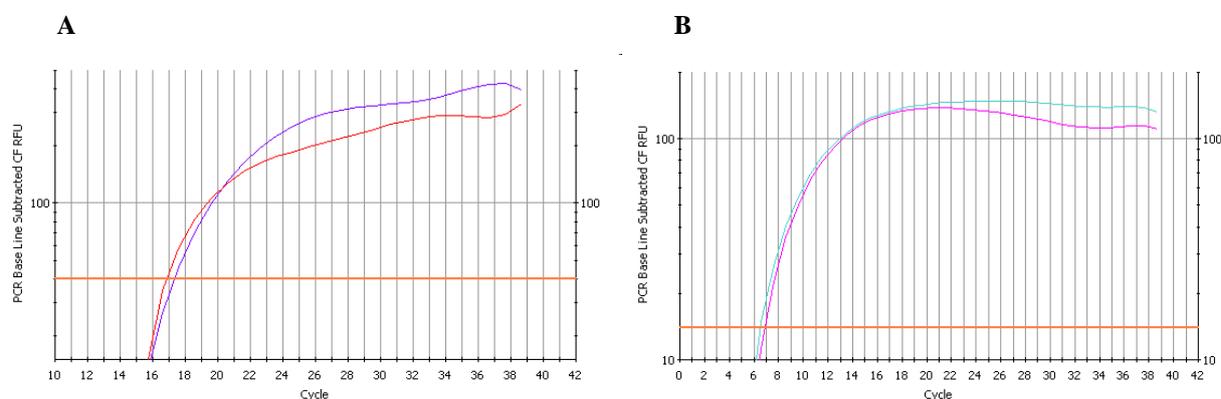
Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

Tabela 42: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP120 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)
1 - BZ167	20,6	NA
2 - BZ167	20,7	NA
1 - BR020	NA	11,6
2 - BR020	NA	11,6

V. Região da gp41 (*env*)

Gráfico 15: Amplificação dos vírus BZ167 e BR020 com GP41 DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

Tabela 43: Valores de Ct para as replicatas dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP41 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)
1 - BZ167	17,3	NA
2 - BZ167	16,8	NA
1 - BR020	NA	6,5
2 - BR020	NA	6,8

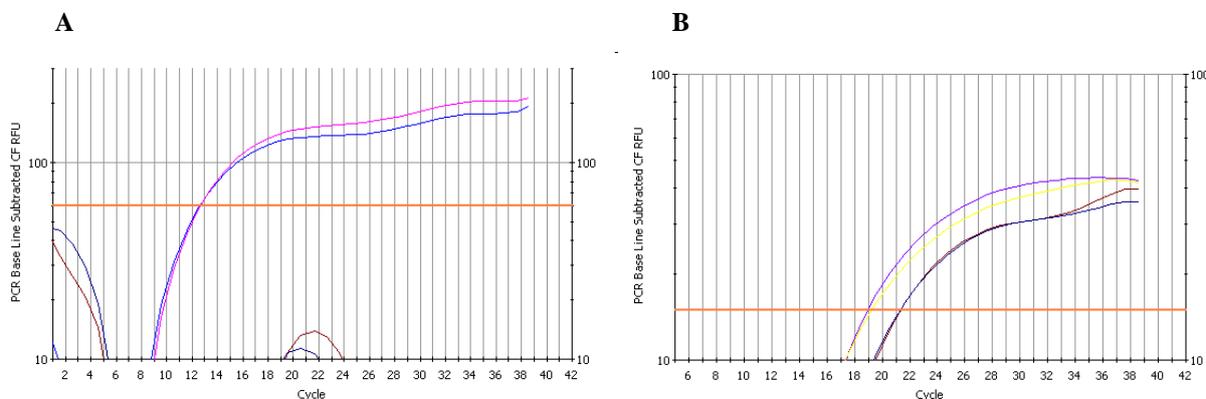
Todos os ensaios confirmaram a detecção dos subtipos por sua sonda específica. No experimento em que cada subtipo foi amplificado na presença da sonda específica ao outro não foi detectado sinal além do *background* da reação, indicando a especificidade das sondas em relação a seus subtipos. Vale observar os valores de Ct muito menores, indicando maiores concentrações iniciais de cada reação, resultado de uma reação *Nested-PCR* (descrita em Métodos).

4.3.3.3. Ensaio de PCR em tempo real para sobrenadante de co-cultivo

Para detectar o subtipo predominante no co-cultivo com os isolados virais BZ167 e BR020, foram comparadas aqui as detecções dos mesmos na primeira e quinta passagem de cultura, para as cinco regiões do genoma do HIV-1 aqui estudada.

I. Região da protease (*pol*)

Gráfico 16: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com PROT DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

Tabela 44: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com PROT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

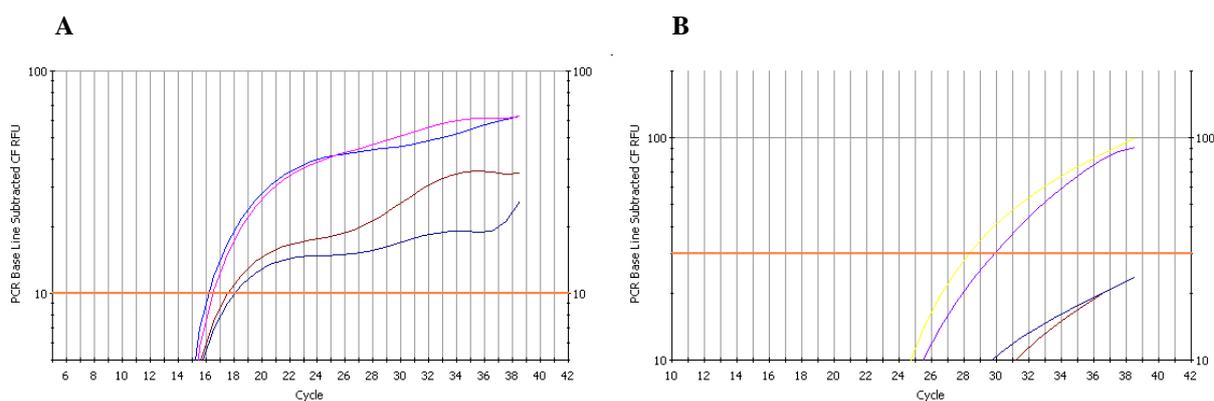
Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Média	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)	Média
1 - BF 1A	12,6	12,6	21,4	21,35
2 - BF 1A	12,6		21,3	
1 - BF 5A	NA	NA	19	19,1
2 - BF 5A	NA		19,2	

Os resultados obtidos aqui indicam que ambos os subtipos eram detectados na primeira passagem, apesar de não poder ser concluído qual deles se apresentava em maior número de cópias, já que a referência de cópias iniciais foi perdida ao ser realizada uma reação de *Nested-PCR*.

Já na quinta passagem, o subtipo B já não é mais detectado na região da protease, enquanto o subtipo F persiste, com valores menores de Ct, o que seria um indicativo de uma concentração inicial maior do que aquela presente na primeira passagem.

II. Região da transcriptase reversa (*pol*)

Gráfico 17: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com RT DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

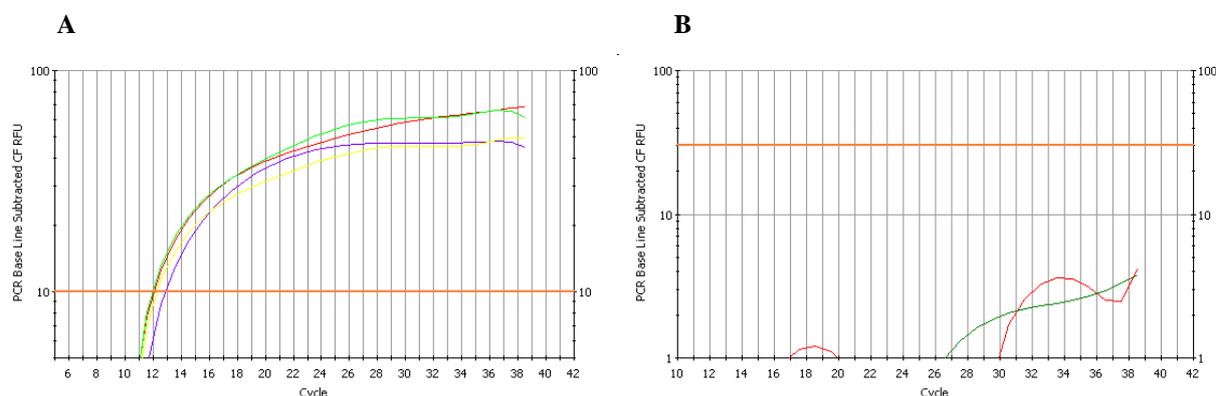
Tabela 45: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com RT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Média	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)	Média
1 - BF 1A	16,2	16,35	NA	NA
2 - BF 1A	16,5			
1 - BF 5A	17,6	17,85	29,9	29,1
2 - BF 5A	18,1		28,3	

Na região da transcriptase reversa, na primeira passagem, foi detectada presença somente do subtipo B. Já na quinta passagem, o subtipo passa ser detectado, enquanto os valores de Ct apresentados pela detecção do subtipo B se mantiveram ou aumentaram.

III. Região da integrase (*pol*)

Gráfico 18: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com INT DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

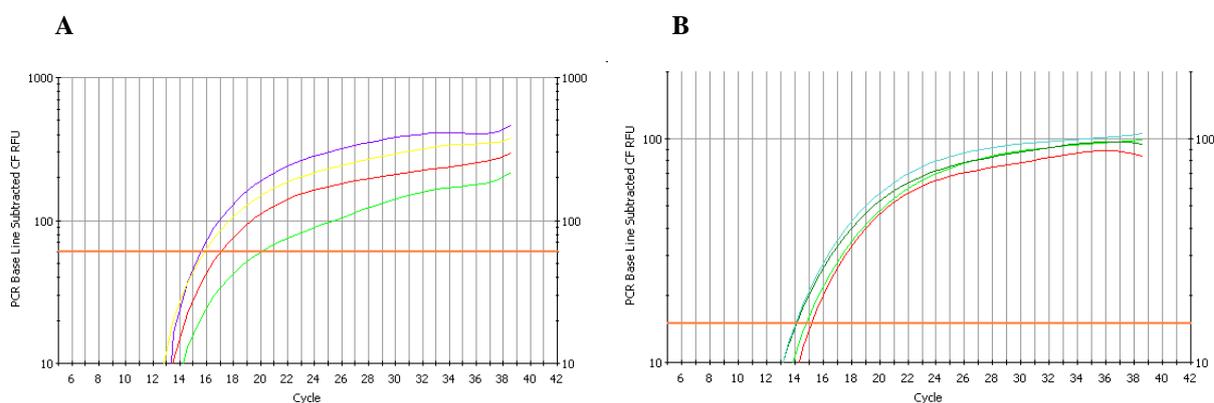
Tabela 46: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com INT DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Média	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)	Média
1 - BF 1A	12,9	12,6	NA	NA
2 - BF 1A	12,3			
1 - BF 5A	12	11,95	NA	NA
2 - BF 5A	11,9		NA	

Para esta região, a integrase, não foi possível detectar o subtipo F, desde a primeira passagem do co-cultivo. Por outro lado, não foram observados diferentes valores de Ct nas diferentes passagens desta cultura.

IV. Região da gp120 (*env*)

Gráfico 19: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com GP120 DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

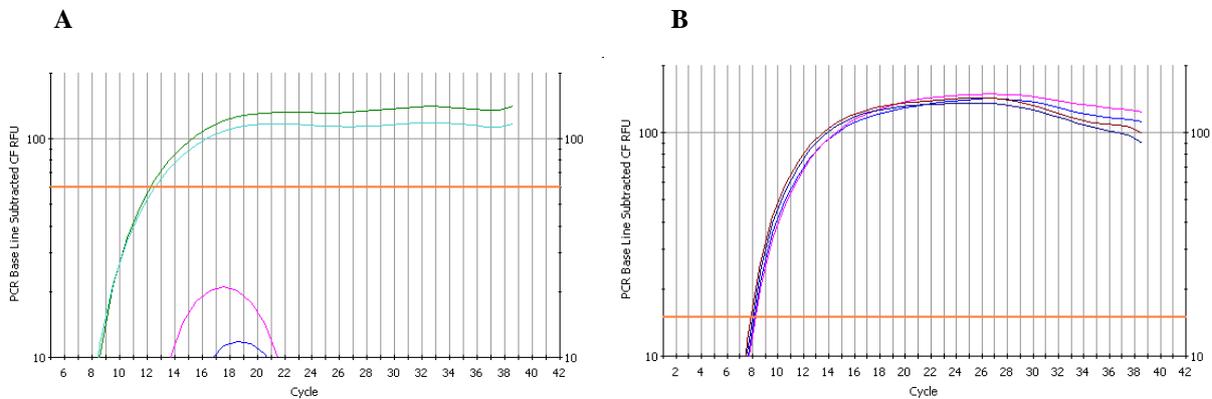
Tabela 47: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP120 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Média	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)	Média
1 - BF 1A	15,5	15,65	15,2	15
2 - BF 1A	15,8		14,8	
1 - BF 5A	17	18,5	14,1	14,05
2 - BF 5A	20		14	

A região da gp120, do envelope, foi detectada para ambos os subtipos, mas os valores de Ct apresentaram uma relação inversa, comparando os subtipos, já que para o subtipo B os valores se apresentaram maiores, enquanto que para o subtipo F, os valores pareceram diminuir, indo da primeira para a quinta passagem.

V. Região da gp41 (*env*)

Gráfico 20: Amplificação do sobrenadante de primeira e quinta passagem de co-cultivo com os vírus BZ167 e BR020 com GP41 DT. **A** = Reações na presença da sonda B-específica. **B** = Reações na presença da sonda F-específica.



Legenda: Eixo x = Número de ciclos; Eixo y = Unidade de fluorescência relativa; a linha vermelha horizontal em cada gráfico indica o *threshold* da reação; as curvas de cores diferentes indicam a amplificação de cada replicata.

Tabela 48: Valores de Ct para as replicatas de sobrenadante de primeira e quinta passagem do co-cultivo dos vírus BZ167 e BR020, amplificados com GP41 DT, na presença da sonda B-específica e F-específica.

Replicatas	Sonda B-específica Cycle Threshold (Ct)	Média	Sonda F-específica Cycle Threshold (Ct)	Média
1 - BF 1A	12,3	12,4	8	8,05
2 - BF 1A	12,5		8,1	
1 - BF 5A	NA	NA	7,8	7,85
2 - BF 5A	NA		7,9	

A região da gp41 se apresentou semelhante a da protease, tendo sido detectado os dois vírus na primeira passagem, mas somente vírus do subtipo F foi detectado na quinta passagem, com valores de Ct estáveis em relação à primeira passagem.

4.4. Validação dos sistemas desenvolvidos com amostras clínicas (testes futuros)

O seqüenciamento das amostras clínicas foi analisada nas seguintes topologias filogenéticas.

I. Região da protease (*pol*)

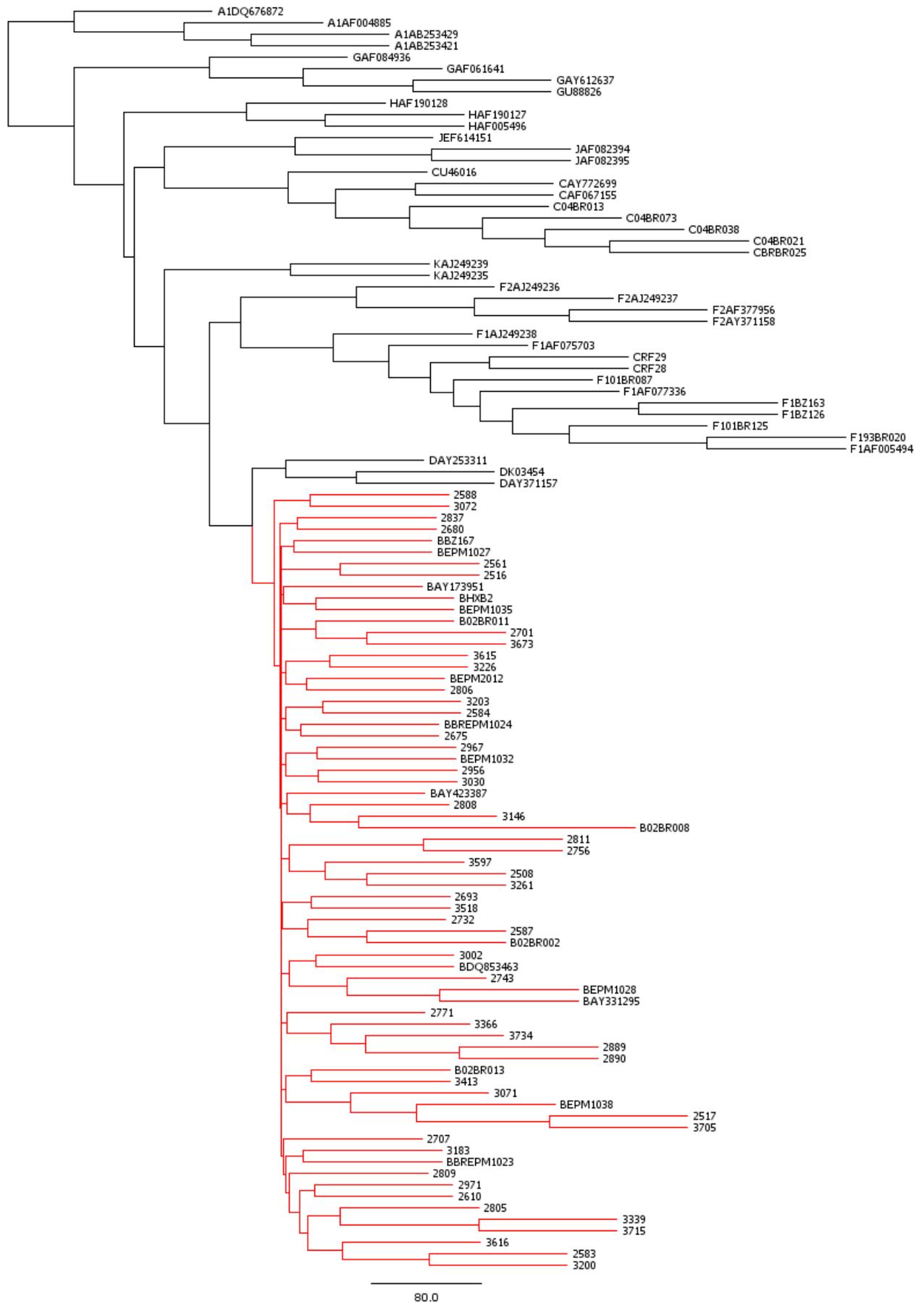


Figura 14a: Classificação Filogenética para a região da protease (gene *pol*) inferida por Neighbor-Joining. Os subtipos do HIV-1, A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K, são indicados pela primeira letra do nome da seqüência. As seqüências analisadas são indicadas por quatro dígitos. O subtipo A1 foi utilizado como *outgroup*. As seqüências analisadas foram destacadas em vermelho, quando do subtipo B, e em azul, quando do subtipo F.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2588, 3072, 2837, 2680, 2561, 2516, 2701, 3673, 3615, 3226, 2806, 3203, 2584, 2675, 2967, 2956, 3030, 2808, 3146, 2811, 2756, 3597, 2508, 3261, 2693, 3518, 2732, 2587, 3002, 2743, 2771, 3366, 3734, 2889, 2890, 3413, 3071, 2517, 3705, 2707, 3183, 2809, 2971, 2610, 2805, 3339, 3715, 3616, 2583 e 3200. Por esta análise, não foram encontradas amostras de subtipo F.



Figura 14b: Legenda idem à legenda da figura anterior.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2770, 3716, 3710, 2645, 2782, 2944, 3070, 2813, 2562, 3202, 3724, 3196, 2702, 2745, 3674, 2942, 3212, 2835, 2988, 3504, 3338, 2941, 2781, 2636, 3387, 2703, 3001, 2969, 3408, 2630, 3600, 2878, 3000, 2545, 3315, 2933, 3182, 3552, 3313, 2518, 3725, 2555, 2999, 3008, 3147, 3289, 2585, 3314, 2990 e 3290. Por esta análise, não foram encontradas amostras de subtipo F.

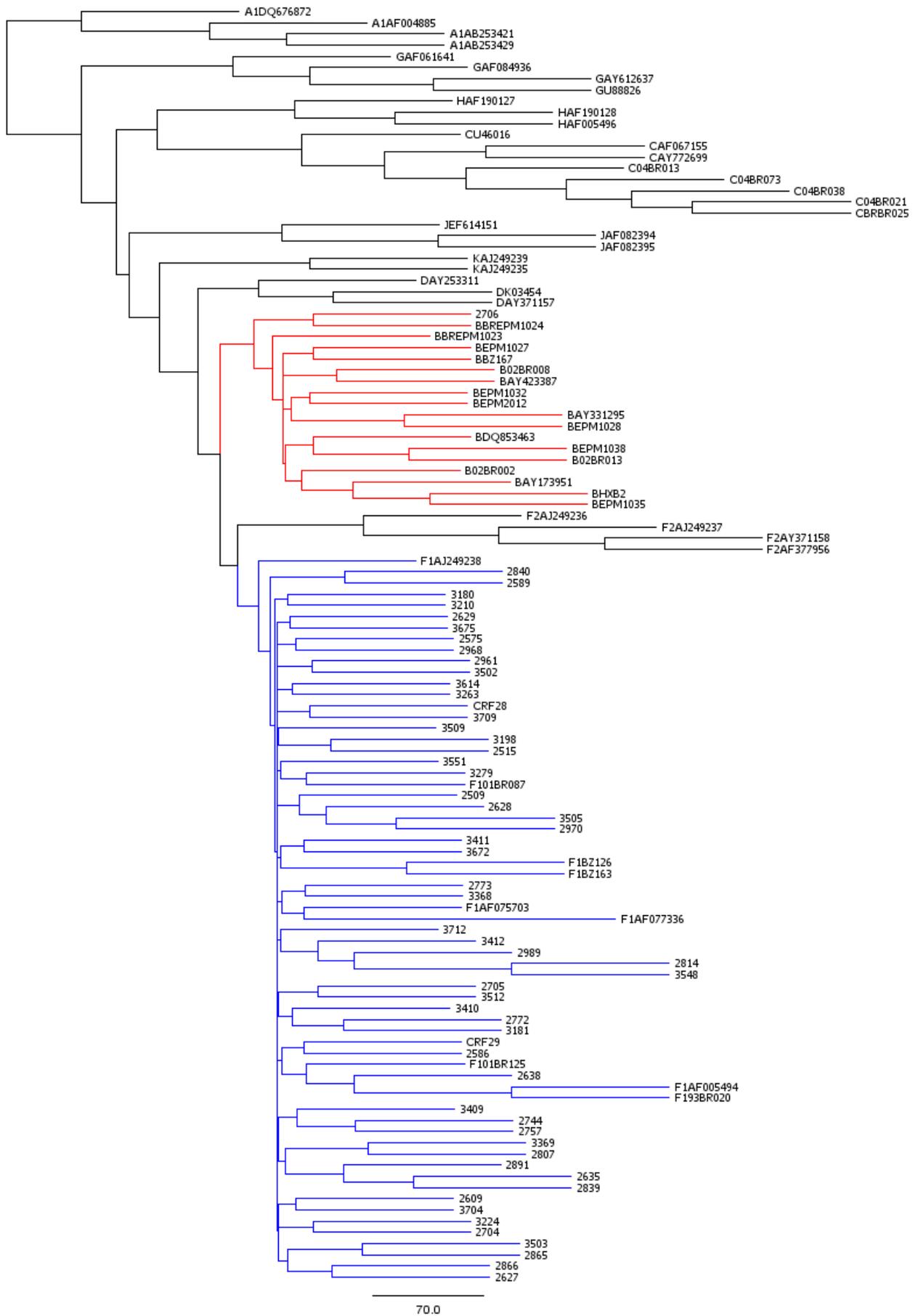


Figura 14c: Legenda idem à legenda da figura anterior.

Apresentou-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, somente a amostra 2706. Como subtipo F: 2840, 2589, 2575, 2968, 3512, 2705, 2586, 3675, 2773, 3368, 2629, 3279, 2515, 3198, 3509, 2638, 3180, 3210, 3410, 2772, 3181, 3712, 3412, 2989, 3548, 2814, 3672, 3411, 3263, 3614, 2961, 3502, 3409, 2757, 2744, 3709, 2628, 2509, 3505, 2970, 3551, 2891, 2635, 2839, 2807, 3369, 2609, 3224, 2704, 2866, 2627, 3704, 2865 e 3503.

De 155 amostras seqüenciadas para esta região, 97 destas foram analisadas como do subtipo B, enquanto 58 como subtipo F.

II. Região da transcriptase reversa (*pol*)

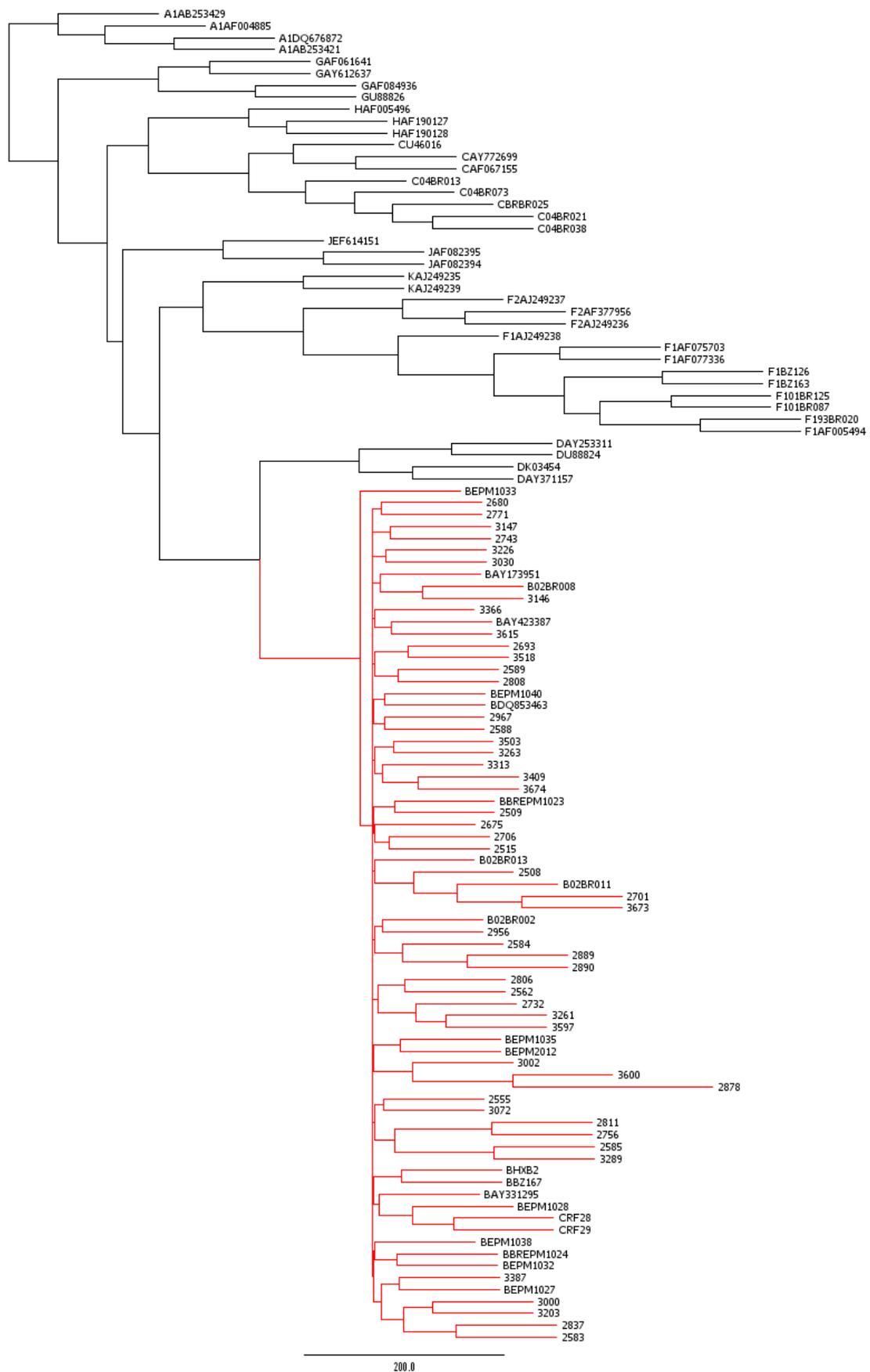
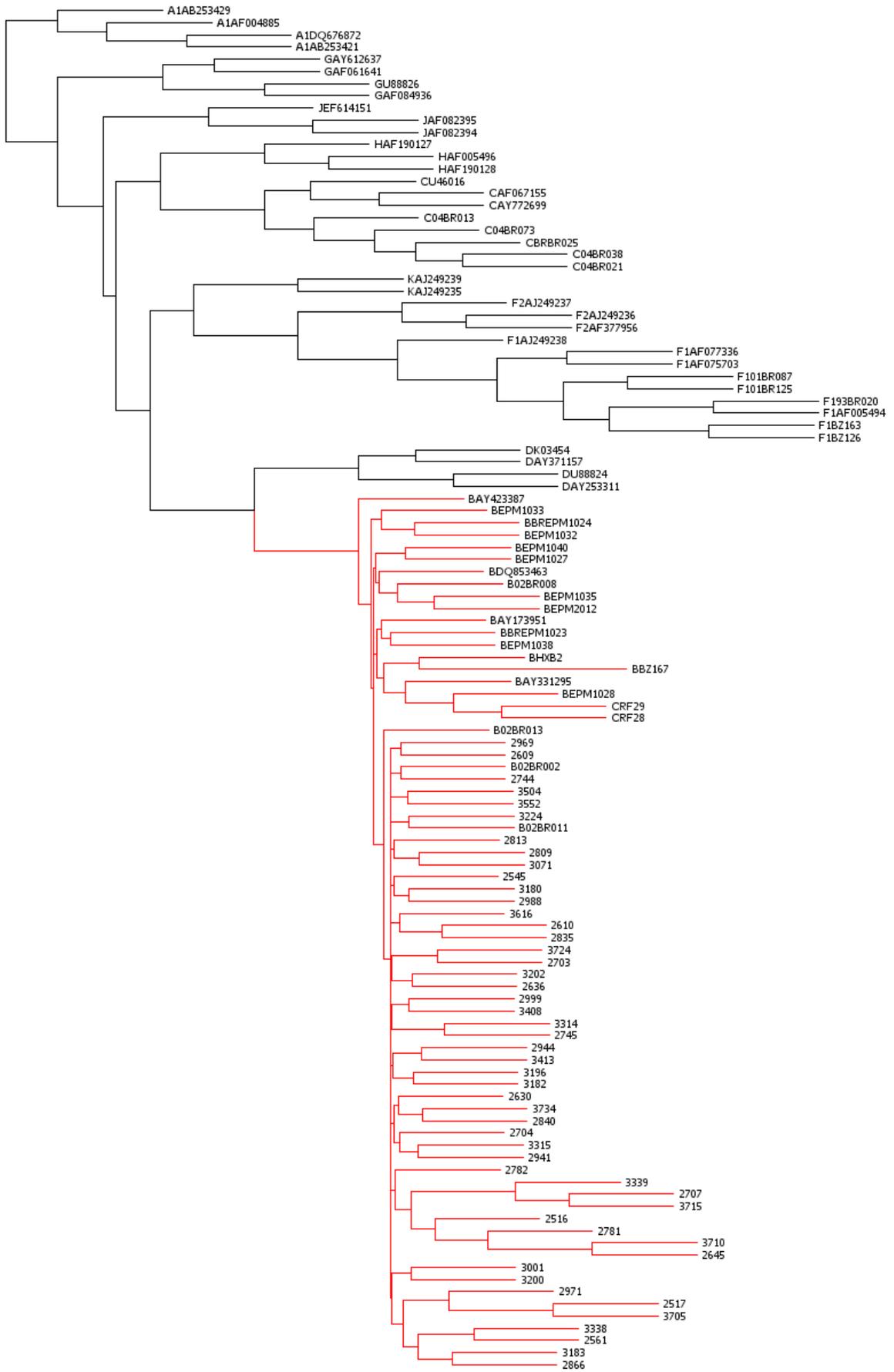


Figura 15a: Classificação Filogenética para a região da transcriptase reversa (gene *pol*) inferida por Neighbor-Joining. Os subtipos do HIV-1, A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K, são indicados pela primeira letra do nome da seqüência. As seqüências analisadas são indicadas por quatro dígitos. O subtipo A1 foi utilizado como *outgroup*. As seqüências analisadas foram destacadas em vermelho, quando do subtipo B, e em azul, quando do subtipo F.

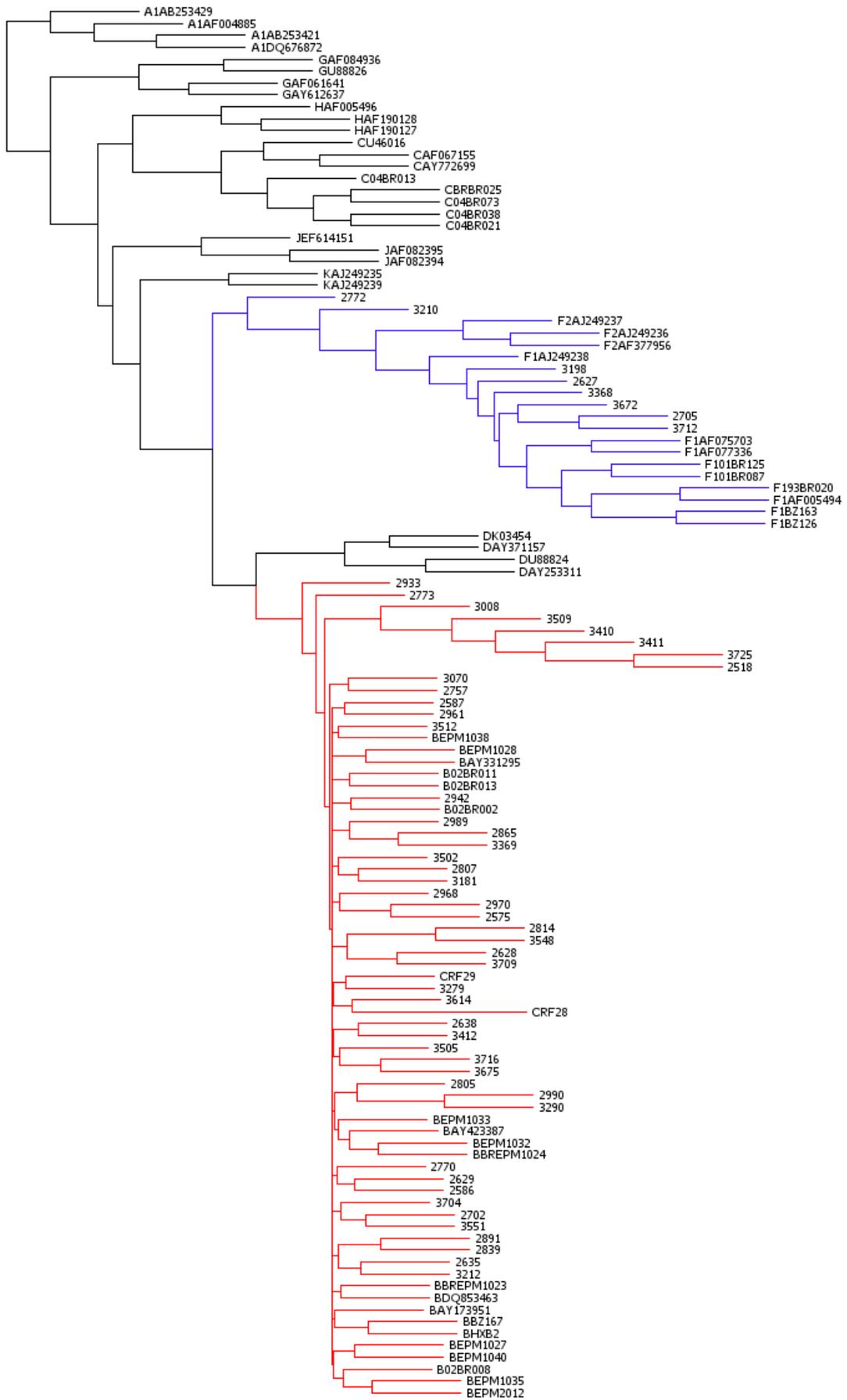
Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2680, 2771, 3147, 2743, 3226, 3030, 3146, 3366, 3615, 2693, 3518, 2589, 2808, 2967, 2588, 3503, 3263, 3313, 3409, 3674, 2509, 2675, 2706, 2515, 2508, 2701, 3673, 2956, 2584, 2889, 2890, 2806, 2562, 2732, 3261, 3597, 3002, 3600, 2878, 2555, 3072, 2811, 2756, 2585, 3289, 3387, 3000, 3203, 2837 e 2583.



100.0

Figura 15b: Legenda idem à legenda da figura anterior

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2969, 2609, 2744, 3504, 3552, 3224, 2813, 2809, 3071, 2545, 3180, 2988, 3616, 2610, 2835, 3724, 3703, 3202, 2636, 2999, 3408, 3314, 2745, 2944, 3413, 3196, 3182, 2630, 3734, 2840, 2704, 3315, 2941, 2782, 3339, 2707, 3715, 2516, 2781, 3710, 2645, 3001, 3200, 2971, 2517, 3705, 3338, 2561, 3183 e 2866 . Por esta análise, não foram encontradas amostras de subtipo F.



90.0

Figura 15c: Legenda idem à legenda da figura anterior.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2933, 2773, 3008, 3509, 3410, 3411, 3725, 2518, 3070, 2757, 2587, 2961, 3512, 2942, 2989, 2865, 3369, 3502, 2807, 3181, 2968, 2970, 2575, 2814, 3548, 2628, 3709, 3279, 3614, 2638, 3412, 3505, 3716, 3675, 2805, 2990, 3290, 2770, 2629, 2586, 3704, 2702, 3551, 2891, 2839, 2635 e 3212. Como subtipo F: 2772, 3210, 3198, 2627, 3368, 3672, 2705, 3712.

De 155 amostras seqüenciadas para esta região, 147 destas foram analisadas como do subtipo B, enquanto 8 como subtipo F.

III. Região da integrase (*pol*)

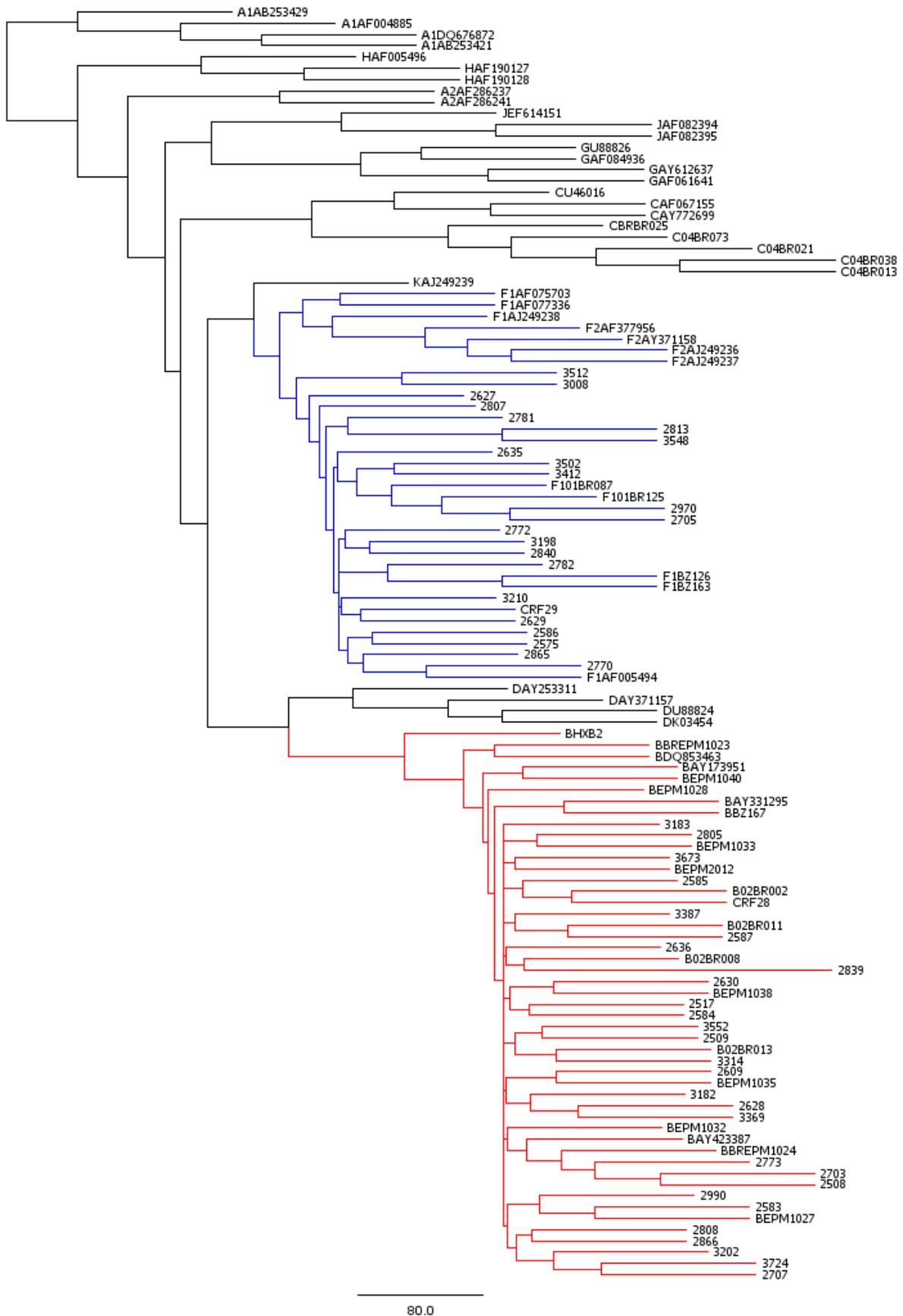


Figura 16a: Classificação Filogenética para a região da integrase (gene *pol*) inferida por Neighbor-Joining. Os subtipos do HIV-1, A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K, são indicados pela primeira letra do nome da seqüência. As seqüências analisadas são indicadas por quatro dígitos. O subtipo A1 foi utilizado como *outgroup*. As seqüências analisadas foram destacadas em vermelho, quando do subtipo B, e em azul, quando do subtipo F.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 3183, 2805, 3673, 2585, 3387, 2587, 2636, 2839, 2630, 2517, 2584, 3552, 2509, 3314, 2609, 3182, 2628, 3369, 2773, 2703, 2508, 2990, 2583, 2808, 2866, 3202, 3724 e 2707. Como subtipo F: 3512, 3008, 2627, 2807, 2781, 2813, 3548, 2635, 3502, 3412, 2970, 2705, 2772, 3198, 2840, 2782, 3210, 2629, 2586, 2575, 2865 e 2770.



Figura 16b: Legenda idem à legenda da figura anterior.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 3712, 3147, 2589, 2971, 3212, 3196, 3290, 3597, 2562, 2515, 2891, 2835, 2999, 3071, 2837, 3658, 2743, 2704, 3002, 3146, 3072, 3181, 2988, 3615, 2989, 2680, 3509, 2744, 2757, 3503, 3261, 3409, 3030, 3672, 2702, 2806, 2811, 2967, 3675, 2555, 3366, 2645, 2518, 3725, 2889, 3634, 2809, 3070, 3413, 2701, 2516, 2693, 2732, 3704, 2814, 2706, 2756, 3504, 2610, 2771, 3616, 3505. Por esta análise, não foram encontradas amostras de subtipo F.

De 112 amostras seqüenciadas para esta região, 90 destas foram analisadas como do subtipo B, enquanto 22 como subtipo F.

IV. Região da gp120 (*env*)

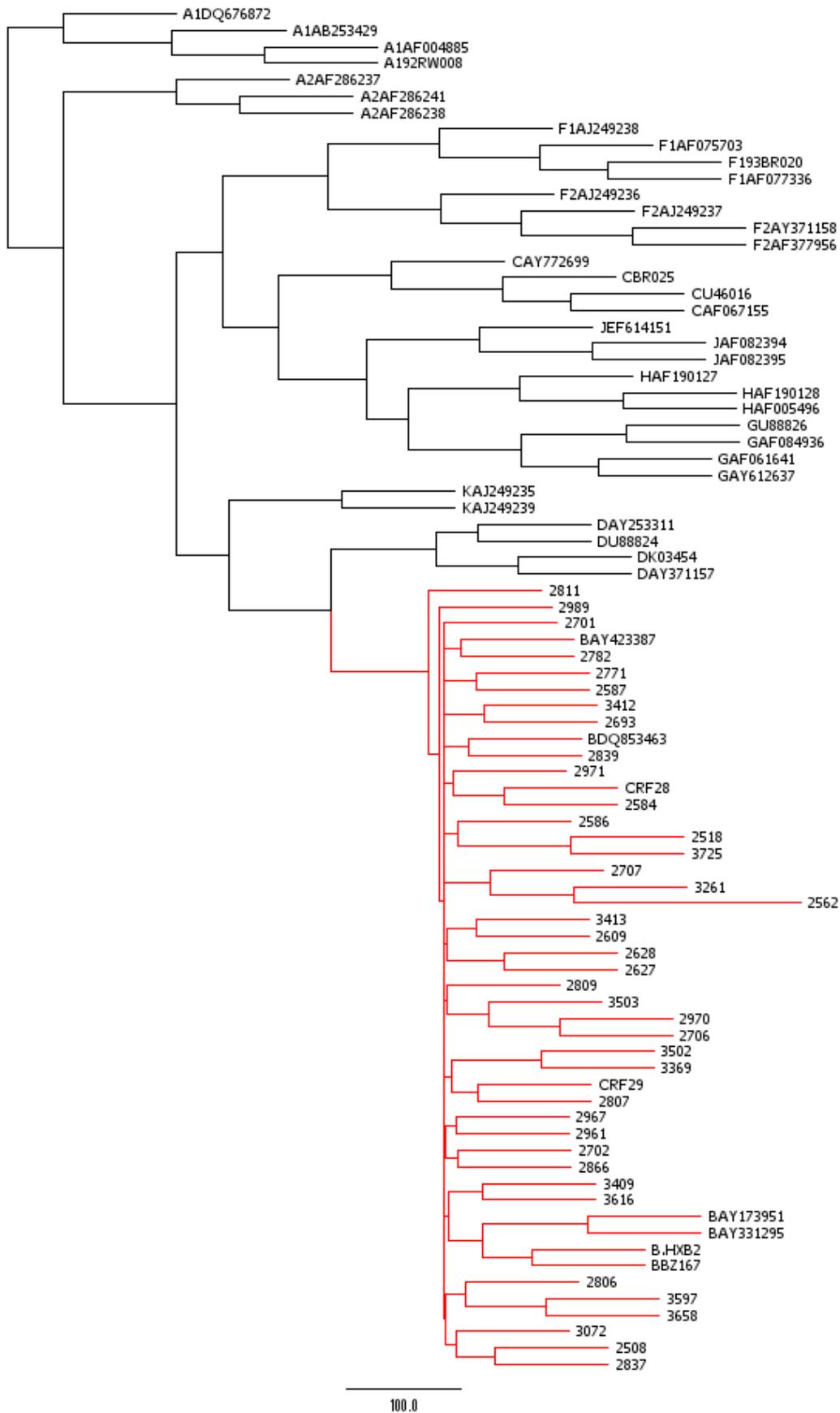


Figura 17a: Classificação Filogenética para a região da gp120 (gene *env*) inferida por Neighbor-Joining. Os subtipos do HIV-1, A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K, são indicados pela primeira letra do nome da seqüência. As seqüências analisadas são indicadas por quatro dígitos. O subtipo A1 foi utilizado como *outgroup*. As seqüências analisadas foram destacadas em vermelho, quando do subtipo B, e em azul, quando do subtipo F.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2811, 2989, 2701, 2782, 2771, 2587, 3412, 2693, 2839, 2971, 2584, 2586, 2518, 3725, 2707, 3261, 2562, 3413, 2609, 2628, 2627, 2809, 3503, 2970, 2706, 3502, 3369, 2807, 2967, 2961, 2702, 2866, 3409, 3616, 2806, 3597, 3658, 3072, 2508 e 2837. Por esta análise, não foram encontradas amostras de subtipo F.

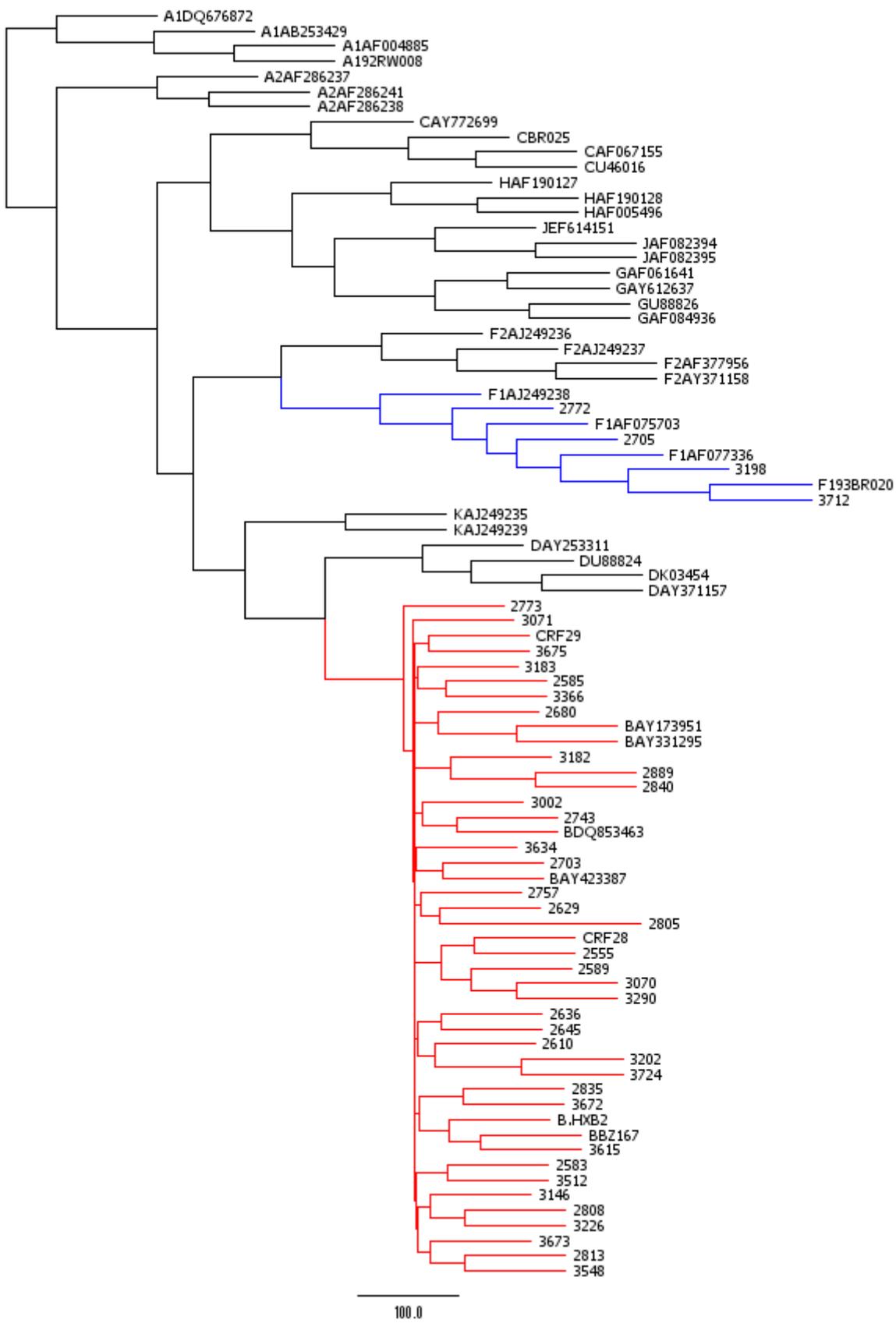
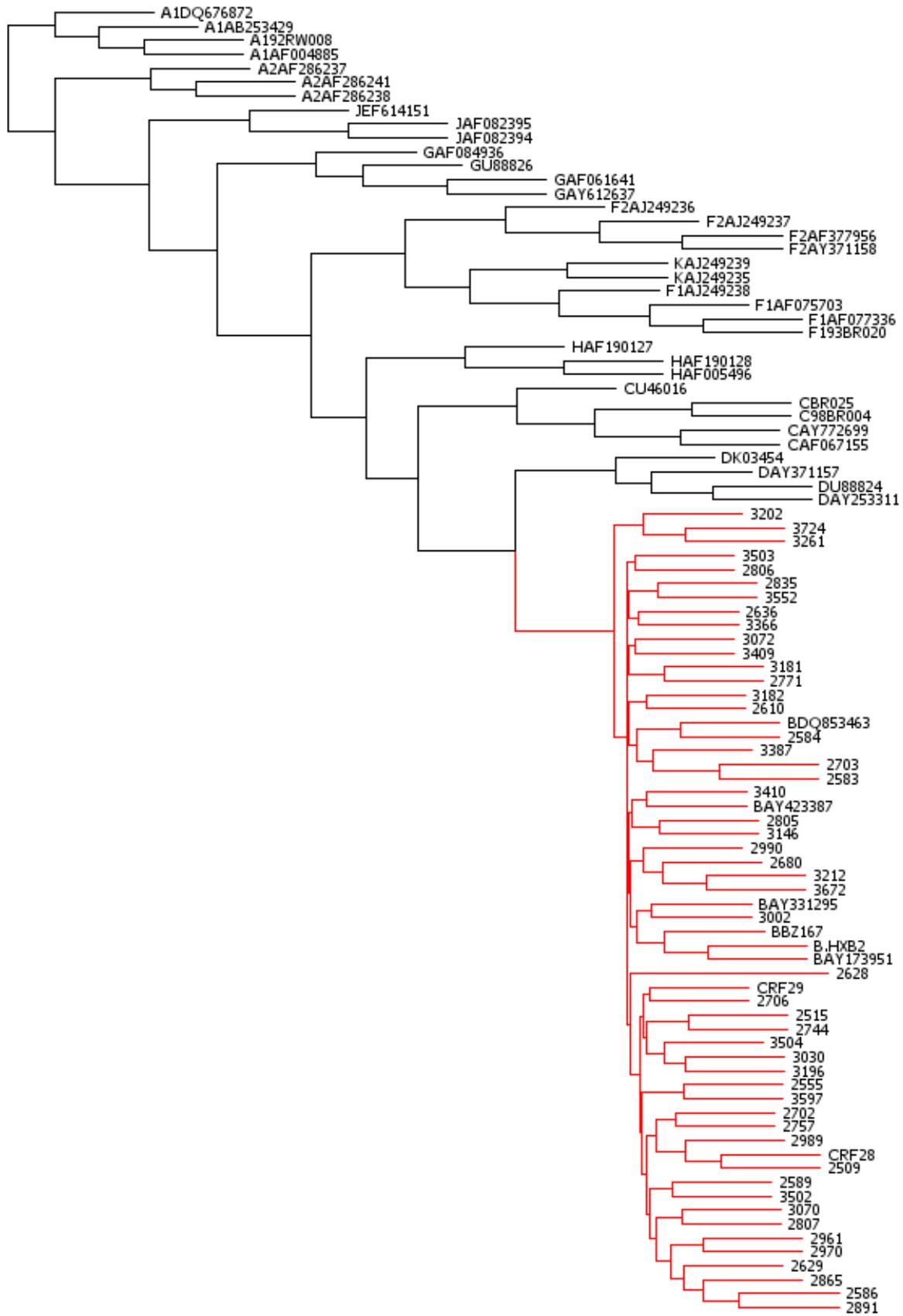


Figura 17b: Legenda idem à legenda da figura anterior.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2773, 3071, 3675, 3183, 2585, 3366, 2680, 3182, 2889, 2840, 3002, 2743, 3634, 3703, 2757, 2629, 2805, 2555, 2589, 3070, 3290, 2636, 2645, 2610, 3202, 3724, 2835, 3672, 3615, 2583, 3512, 3146, 2808, 3226, 3673, 2813 e 3548. Como subtipo F: 2772, 2705, 3198 e 3712.

De 81 amostras seqüenciadas para esta região, 77 destas foram analisadas como do subtipo B, enquanto 4 como subtipo F.

V. Região da gp41 (*env*)



100.0

Figura 18a: Classificação Filogenética para a região da gp41 (gene *env*) inferida por Neighbor-Joining. Os subtipos do HIV-1, A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J e K, são indicados pela primeira letra do nome da seqüência. As seqüências analisadas são indicadas por quatro dígitos. O subtipo A1 foi utilizado como *outgroup*. As seqüências analisadas foram destacadas em vermelho, quando do subtipo B, e em azul, quando do subtipo F.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 3202, 3724, 3261, 3503, 2806, 2835, 3552, 2636, 3366, 3072, 3409, 3181, 2771, 3182, 2610, 2584, 3387, 2703, 2583, 3410, 2805, 3146, 2990, 2680, 3212, 3672, 3002, 2628, 2706, 2515, 2744, 3504, 3030, 3196, 2555, 3597, 2702, 2757, 2989, 2509, 2589, 3502, 3070, 2807, 2961, 2970, 2629, 2865, 2586 e 2891. Por esta análise, não foram encontradas amostras de subtipo F.

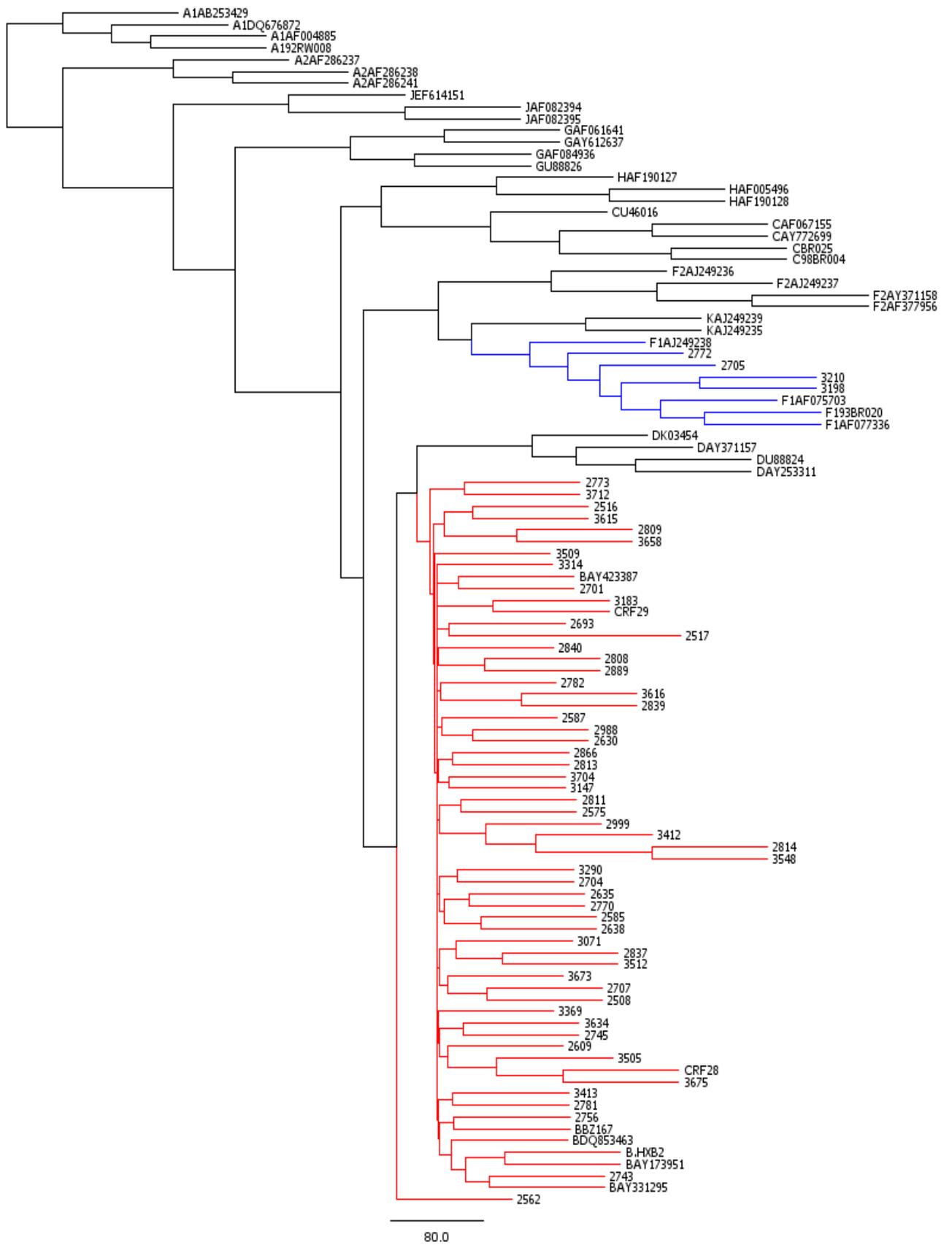


Figura 25: Legenda idem à legenda da figura anterior.

Apresentaram-se como subtipo B, de acordo com a análise filogenética, as seguintes amostras: 2773, 3712, 2516, 3615, 2809, 3658, 3509, 3314, 2701, 3183, 2693, 2517, 2840, 2808, 2889, 2782, 3616, 2839, 2587, 2988, 2630, 2866, 2813, 3704, 3147, 2811, 2575, 2999, 3412, 2814, 3548, 3290, 2704, 2635, 2770, 2585, 2638, 3071, 2837, 3512, 3673, 2707, 2508, 3369, 3634, 2745, 2609, 3505, 3675, 3413, 2781, 2756, 2743 e 2562. Como subtipo F: 2772, 2705, 3210 e 3198.

De 108 amostras seqüenciadas para esta região, 104 destas foram analisadas como do subtipo B, enquanto 4 como subtipo F.

5. DISCUSSÃO

Os ensaios de cultura sugeriram a grande diferença no comportamento dos isolados virais utilizados, BZ167 (subtipo B) e BR020 (subtipo F). Os parâmetros avaliados para esta observação foram os valores de CCID₅₀ calculados e a carga viral mensurada no mesmo intervalo de tempo de cultivo para os dois isolados virais. Os valores de CCID₅₀ indicam que é necessário um título viral muito menor do isolado BZ167 para infectar 50% das células, comparando com o isolado BR020. Já a carga viral dosada do sobrenadante da cultura, coletado após seis dias de cultivo, demonstram uma produção viral maior para o isolado BZ167, com uma diferença de até dez vezes, em relação ao BR020. Além disso, em cultura, os efeitos citopáticos, determinados pela evidência da formação de sincícios, eram evidenciados muito mais rapidamente para este isolado de subtipo B. Este resultado por si indica uma maior capacidade replicativa (*fitness*) deste protótipo B em relação ao F estudado.

Esta diferença entre estes dois isolados levanta a importância da escolha dos subtipos a serem utilizados em ensaios de competição. Para comparar o comportamento de isolados virais de subtipos diferentes em um co-cultivo, seja na análise de qual subtipo prevaleceria na cultura, seja quanto à formação de recombinantes, seria ideal que as propriedades intrínsecas a cada isolado não trouxesse interferências ao ensaio, podendo resultar em dados finais sub ou superestimados. Isto poderia ter ocorrido no ensaio de co-cultivo realizado em nosso estudo, onde o isolado viral BZ167 apresenta uma capacidade replicativa muito maior que o isolado BR020, podendo ser esperado que este primeiro isolado se sobressaísse na cultura, dificultando a detecção do outro isolado ou mesmo a detecção de estruturas recombinantes resultantes entre ambos. Uma alternativa para tanto seria utilizar um isolado viral de subtipo F de maior capacidade replicativa do que o isolado BR020, ou um isolado viral de subtipo B de menor capacidade replicativa do que o isolado BZ167.

A descoberta, em 2006, de duas CRF brasileiras, identificadas como CRF 28 e 29, que seriam estruturas recombinantes entre os subtipos B e F (DE SA FILHO *et al.*, 2006), juntamente com a grande proporção de recombinantes BF até então já descrita na epidemia brasileira, levantou a necessidade de entender a dinâmica dos recombinantes entre estes subtipos, bem como vantagens adaptativas e de escape à terapia anti-retroviral. A otimização da detecção destas estruturas seria uma ferramenta para a busca destes entendimentos.

Mesmo sendo a epidemia brasileira estabelecida não somente pelos subtipos B e F, mas também pelo subtipo C, e mesmo tendo sido descrita no mesmo ano uma CRF brasileira entre os

subtipos B e C no sul do país (SANTOS *et al.*, 2006), o presente trabalho se ateve a detectar recombinantes com o perfil das primeiras CRF citadas. A descoberta, neste ano de 2008, de duas outras formas recombinantes circulantes no Rio de Janeiro (GUIMARAES *et al.*, 2008), também entre os subtipos B e F, foi recente demais para que sua análise fosse aqui incluída. No entanto, como o desenvolvimento dos sistemas de detecção desenvolvidos levou em conta amostras clínicas já descritas, devem se estender também a estas CRF BF.

Baseando-se neste trabalho em que foram descobertas as CRF 28 e 29, foram escolhidas as regiões genômicas para as quais seriam desenvolvidos sistemas para amplificação e detecção em tempo real. Esta escolha foi feita de modo que fossem regiões discriminatórias de recombinantes, ou seja, pelo menos duas regiões, regiões que se recombinaram nas CRF descritas e, além disso, regiões que apresentam grande importância na caracterização do HIV-1. Por estas razões se iniciou a busca nas regiões da protease (*pol*), que é do subtipo F nas CRF, e do envelope, que é B. Além da diferença nos subtipos, são regiões para as quais muitos estudos foram e estão voltados. No caso da protease há trabalhos associando resistência primária a inibidores de protease do subtipo F (GONZALEZ *et al.*, 2003; CALAZANS *et al.*, 2005). Já o envelope é muito estudado para entender o tropismo celular escolhido pelo HIV-1, mediado pelos co-receptores CXCR4 ou CCR5.

Estas duas regiões, além de sua importância, possuem particularidades que prejudicariam o desenvolvimento do objetivo deste trabalho que é ter grande abrangência em amostras de campo brasileiras.

A protease é uma enzima essencial para o ciclo replicativo do HIV-1, como já foi delineado na introdução. A sequência genômica que a codifica é muito pequena (aproximadamente 300 pares de bases), e apesar de ser alvo de grande pressão seletiva devido ao tratamento anti-retroviral, é uma região muito conservada, sendo duas ou três vezes menos divergente que o envelope, que, por sua vez, é utilizado para subtipar sequências devido a sua grande diversidade que é de 10 a 20% entre os subtipos do grupo M (WAINBERG, 2004). Esta característica da protease não significou dificuldade para desenhar *primers* universais para as sequências de amostras clínicas descritas, já que deveriam possuir sítios de anelamento conservados para tanto, mas sim para encontrar um sítio de anelamento com diferenças nucleotídicas suficientes para discriminar entre B e F, sendo estas diferenças conservadas dentro de cada subtipo. Enquanto ao comparar as sequências dos isolados virais BZ167 e BR020 foram encontrados quatro nucleotídeos de diferença em cada sonda subtipo-específica, ao alinhar as sequências destas sondas com sequências de amostras clínicas já descritas, somente três destas diferenças se mostraram persistentes para cada subtipo. Apesar de no mínimo três nucleotídeos

de diferença ser o critério escolhido para diferenciação entre os subtipos, este é um número arriscado para que ocorra um resultado falso-negativo, já que o HIV-1 é um vírus caracterizado por sua grande variabilidade; assim, uma mutação nucleotídica ao acaso poderia prejudicar o anelamento das sondas.

Em contraste com a conservação de alguns aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento de receptores e co-receptores, mudanças em aminoácidos produzem variações antigênicas que possibilitam os vírus de escapar do reconhecimento do sistema imune do hospedeiro (YAMAGUCHI-KABATA, 2004). É por isto que a região do envelope, descrita por sua grande variabilidade, ao contrário da região da protease, representou dificuldade tanto para que regiões conservadas fossem encontradas nos dois subtipos, para anelamento dos *primers*, quanto para que regiões conservadas fossem encontradas dentro de cada subtipo para anelamento das sondas, além disso, distintas na mesma região em relação ao outro subtipo. Como resultado disto, ao buscar *primers* e sondas na região da glicoproteína gp120, nucleotídeos degenerados tiveram de ser incluídos nas seqüências dos *primers*, enquanto as variações de nucleotídeos que haviam entre os isolados virais BZ167 e BR020, evidenciadas nos alinhamentos que nem sempre são características de seqüências do mesmo subtipo, poderiam gerar hibridizações inespecíficas.

Frente a esta provável dificuldade no momento de aplicar os sistemas em amostras de campo, outras regiões também foram estudadas, com intuito de dar suporte a estas primeiras, como a região da transcriptase reversa e outra região do envelope, como a da glicoproteína gp41, ou mesmo como intuito de contribuir na diferenciação entre as CRF descritas, como a região da integrase.

A região da transcriptase reversa, apesar de apresentar as mesmas características de conservação e importância no ciclo replicativo do HIV-1 que a protease, possui uma seqüência genômica maior, o que permitiu que um sistema de *primers* e sondas fosse encontrado, possuindo os *primers* grande abrangência, e ambas as sondas até cinco diferenças entre os subtipos.

Estudos da integrase demonstram que é uma proteína codificada por uma região genômica muito conservada entre indivíduos infectados, bem como em todos os retrovírus, sendo que, até pouco tempo, esta relativa conservação foi favorecida pelo fato desta região genômica não ser alvo da terapia anti-retroviral (BURNS *et al.*, 2002). Estas características trariam as mesmas dificuldades para esta aplicação, como encontradas em regiões como a região da protease, sujeita a pressão seletiva exercida por seus inibidores, como já explicado acima. Mas, apesar desta conservação, alinhamentos de seqüências de amostras clínicas já descritas demonstraram que há diferenças nucleotídicas entre os subtipos em estudo, sendo estas

diferenças conservadas dentro de cada um destes. Por esta razão, as sondas apresentaram de cinco (F-específica) a oito diferenças (B-específicas) em relação ao subtipo não específico.

A região da gp41 apresentou as mesmas dificuldades encontradas no desenho dos *primers* do primeiro jogo do envelope. Não somente os *primers*, mas também as sondas tiveram que ser sintetizadas com nucleotídeos degenerados para que houvesse sensibilidade na detecção das amostras de campo.

De uma forma geral, a inserção de nucleotídeos degenerados em *primers* foi direcionada a posições afastadas de sua extremidade 3' de forma que não prejudicassem o anelamento ou mesmo a performance destes oligonucleotídeos.

Os cálculos de eficiência foram realizados para cada sistema desenvolvido e para cada sonda desenhada. Para os valores de eficiência obtidos, chamam atenção alguns aspectos. Primeiramente, nenhum valor de eficiência para a sonda B coincidiu com o valor obtido para sonda F. Diferentemente de quando se quer amplificar alvos diferentes em uma mesma reação (reações multiplex), ou em reações com alvo e controle endógeno (quantificação relativa) em que os valores de eficiência para os sistemas desenvolvidos para cada alvo devem ser semelhantes, os sistemas desenvolvidos em nosso trabalho são considerados sistemas independentes. Neste caso, a triagem do subtipo seria feita por comparação da detecção obtida por cada ensaio, não necessitando de eficiências semelhantes para as duas sondas.

Outro ponto relevante quanto ao cálculo de eficiência está relacionado aos valores obtidos. O valor de eficiência recomendado para a padronização de uma PCR é de aproximadamente 100% e é calculada durante a fase exponencial da reação, quando há completa disposição dos reagentes a serem consumidos e conseqüente crescimento na amplificação do material alvo. Quanto mais a eficiência estiver próxima de 100%, pode-se dizer que o material alvo tende a ser amplificado a uma taxa de $2^{(n+1)}$, ou seja, a quantidade de material presente será mais próxima do dobro a cada ciclo, em relação ao ciclo anterior. Como o objetivo deste trabalho não exige extrema acurácia como em uma quantificação, é aceitável que o valor obtido seja menor que 100% (SAUNDERS, 2004).

Valores de eficiência maiores que 100%, como encontrado para a região da protease com a sonda F, são difíceis de explicar, conforme literatura, mas até 110% pode ser aceito (PFAFFL *et al.*, 2001).

O sistema que apresentou menor valor de eficiência foi o da região da transcriptase reversa, para a sonda F, e foi de 75%. Esta baixa eficiência pode ser explicada pela considerável amplificação inespecífica pelos *primers*, que pôde ser evidenciada em uma curva de dissociação realizada. Suporte para esta explicação também está no fato deste sistema necessitar de

quantidade de material genético maior para possível detecção dos subtipos, em comparação com outros sistemas, bem como de maior número de ciclos na reação de *Nested-PCR*. Mas, mesmo havendo amplificação inespecífica, o sistema se mostrou específico, já que a amplificação do produto inespecífico evidenciada na curva de dissociação também estava presente na amplificação do controle negativo, constituído de um plasma humano sabidamente HIV-negativo.

Os testes de reprodutibilidade dos ensaios foram definidos pelos valores de coeficiente de variação dos pontos de diluição das curvas de calibração, que, de uma forma geral, encontraram-se mais altos nos pontos de menor e/ou de maior concentração. Além disso, o maior valor calculado para este coeficiente em todos os sistemas foi de 8,26, com exceção do sistema da transcriptase reversa para o subtipo F, em que o menor valor encontrado foi de 18,84 e o maior foi de 22,25, sendo este último valor referente ao ponto mais concentrado da curva. Ainda sim, estes valores podem ser considerados aceitáveis levando em consideração trabalhos já descritos em que coeficientes de variação de até 45% foram encontrados (MCDERMOTT *et al.*, 1999; CHRISTOPHERSON *et al.*, 2000; GIBELLINI *et al.*, 2004).

Após testes de especificidade das sondas, para detecção dos isolados virais BZ167 e BR020, os sistemas desenvolvidos foram aplicados no material genético presente no sobrenadante coletado do co-cultivo destes dois isolados, em diferentes passagens. Os resultados obtidos da primeira e quinta passagem foram interpretados por comparação, primeiramente dentro do próprio sistema, se houve queda ou aumento nos valores de Ct para ambos os subtipos, e, depois, esta variação foi comparada entre os sistemas das diferentes regiões.

As regiões da protease e gp41 apresentaram resultados semelhantes, em que o subtipo B era detectado na primeira passagem do cultivo viral, com valores de Ct, com médias de 12,6 e 12,4 respectivamente, enquanto não houve sinal de amplificação deste isolado na quinta passagem do co-cultivo. O subtipo F, por sua vez, apresentou na região da protease uma queda de 2 Cts da primeira para a quinta passagem, (média de 21,35 para 19,1 respectivamente), o que representa grande diferença se isto fosse revertido em número de cópias iniciais. Valores menores de Cts indicam concentração inicial de material genético maior. Assim, comparando a primeira e a quinta passagem, pode-se dizer que haviam mais cópias de isolados virais de protease de subtipo F na quinta do que na primeira passagem. Esta queda na média dos valores de Ct na detecção do subtipo F ao longo do tempo também ocorreu para a região da gp41, apesar desta diferença não ter sido tão notável, com médias de Ct de 8,05 a 7,85 respectivas à primeira e à quinta passagem.

A região da integrase apresentou um resultado particular de média de valores de Ct com pouca diferença para o subtipo B, que foi de uma ligeira queda de 12,6 da primeira passagem para 12 na quinta, enquanto o subtipo F não foi detectado nem na primeira nem na quinta passagem. Isto pode ser possível considerando que a primeira passagem foi coletada após 3 a 4 dias de cultivo. Explicações para tanto podem sugerir que a produção deste vírus, nesta região, foi suprimida pela presença do subtipo B em decorrência de recombinação intergênica com a emergência somente de vírus com integrase do subtipo B.

A região da transcriptase reversa teve comportamento diferente em relação à integrase, pois, o subtipo B apresentou uma mudança maior entre a primeira e a quinta passagem, com aumento nos valores de Ct (média de Cts de 16,35 a 17,85), enquanto o subtipo F foi detectado tardiamente somente na quinta passagem (média de Cts de 29,1). Talvez, se passagens mais tardias do que a quinta tivessem sido analisadas, este perfil observado para a transcriptase reversa tivesse sido observado também para a integrase.

Por fim, a região da gp120 demonstrou uma relação inversa dos subtipos B e F entre a primeira e a quinta passagem. Houve um aumento nas médias dos valores Ct da amplificação do isolado viral de subtipo B, de 15,65 para 18,5, sendo que um aumento nos valores de Ct indicam diminuição na concentração inicial de material genético. Ao contrário, para o subtipo F, esta concentração parece ter aumentado, já que houve uma ligeira queda na média dos valores de Ct de 15 para 14,05.

Estes resultados distintos para as diferentes regiões sugerem dinâmicas replicativas diferentes para os dois isolados virais, já que em um mesmo momento não houve a predominância do mesmo subtipo em todas as regiões.

De 157 amostras clínicas provenientes de Santos, foram obtidas seqüências para as cinco regiões aqui estudadas. De 155 seqüências obtidas para a protease, 101 destas foram subtipadas por seqüenciamento e filogenia como do subtipo B e 54 como do subtipo F. A região da transcriptase reversa, por sua vez, apresentou também sua maioria do subtipo B, já que, também de 155 seqüências obtidas, 147 foram subtipadas como B, mas somente 8 como F. Esta diferente proporção de subtipos na região protease-RT já evidencia o teor de recombinação entre os subtipos B e F encontrado nestas amostras. E fechando a região *pol*, para a integrase foram obtidas 112 seqüências, sendo destas 90 do subtipo B e 22 do subtipo F.

A região do envelope foi a região com maior dificuldade no processamento, desde sua amplificação até o seqüenciamento e edição, sendo que, de todas as amostras processadas somente 81 seqüências para a gp120 foram obtidas. Destas, 77 foram subtipadas como B,

enquanto somente 4 como F. Já para a gp41, foram obtidas 108 amostras do subtipo B e 4 do subtipo F, totalizando em 104 seqüências.

As amostras para as quais foram obtidas seqüências para as cinco regiões totalizaram em 71. Destas, 60,6 por cento foram subtipadas como B em todas as regiões, contrastando com somente 4,2 por cento como F para todas as regiões. O padrão da CRF_28 seria, na seqüência correta protease, RT, integrase, gp120 e gp41, F1/B/B/B/B; neste padrão, foram encontradas 12 seqüências, referentes a 16,9 por cento das amostras seqüenciadas para todas as regiões. Já o padrão da CRF_29 que, na mesma ordem, seria F1/B/F1/B/B; representou 12,7 por cento ainda dentro destas seqüências, ou seja, 9 seqüências. As amostras restantes são URF e representam 5,6 por cento deste total.

Apesar de não se poder afirmar que estas seqüências são as CRF em questão, já que não foi avaliado exatamente o ponto de quebra da recombinação, o número de seqüências com o padrão quanto aos subtipos das CRF reforçam a importância destas na epidemia local, como já descrita por De Sa Filho, em 2006.

Nenhuma seqüência analisada foi subtipada como C, o que não traz prejuízos para o trabalho por não terem sido desenvolvidas sondas que detectassem este subtipo. Por esta razão, não houve representatividade da CRF_31, entre os subtipos B e C descritas por Santos, em 2006.

A validação da utilização dos sistemas para PCR em tempo real desenvolvidos em amostras clínicas será realizada no futuro, em uma próxima etapa, utilizando as informações obtidas do processamento das amostras clínicas provenientes de Santos até a subtipagem.

Este trabalho disponibiliza uma nova ferramenta para auxílio no estudo do HIV-1, como o estudo dos subtipos B e F encontrados na epidemia brasileira, recombinação entre estes e prevalência dos mesmos. A padronização foi realizada em sobrenadante de cultura dos isolados virais BZ167 (subtipo B) e BR020 (subtipo F) e do co-cultivo de ambos, determinando 100 por cento de especificidade. Esta ferramenta deverá, entretanto, quando na análise de amostras de campo, ser utilizada com objetivos de triagem destes subtipos, pois, apesar das sondas subtipo-específicas terem sido desenhadas com embasamento em alinhamento de diversas amostras clínicas já descritas, a alta variabilidade amplamente descrita para o HIV-1 poderia prejudicar as hibridações das sondas, trazendo resultados inespecíficos ou mesmo falso-negativos.

Ainda assim, esta nova ferramenta se mostra eficaz e vantajosa ao ser comparada com as metodologias utilizadas na atualidade. Isto porque a PCR em tempo real, além de ser uma metodologia inovadora, pode ser considerada menos custosa e menos trabalhosa, em relação à amplificação seguida de seqüenciamento, para a finalidade de subtipagem, ao dispensar uma etapa de amplificação, eletroforeses, purificações de produtos de PCR, reação de

seqüenciamento e edição de seqüências geradas. Esta ferramenta já poderia ser aplicada em estudos dos isolados virais utilizados para a padronização em cultura, averiguando mais a fundo a geração de recombinantes entre estes isolados em co-cultivo, bem como o comportamento dos mesmos quando em exposição a anti-retrovirais. De outra forma, a futura padronização em amostras de campo auxiliaria a decisão da amostragem de trabalhos que levassem em consideração os subtipos destas regiões aqui estudadas, bem como elucidaria a atual distribuição destes subtipos em nossa localidade.

6. CONCLUSÃO

Os sistemas de PCR em tempo real desenvolvidos para detecção dos subtipos B e F nas regiões da protease, transcriptase reversa e integrase (*pol*) e nas regiões da gp120 e gp41 (*env*) podem ser utilizados para detecção específica dos isolados virais BZ167 e BR020 em ensaios de cultura, para determinação de predominância e geração de recombinantes entre os mesmos.

A aplicação destes sistemas em ensaios de co-cultivo de até cinco passagens, sugeriu o predomínio do isolado viral BR020 (subtipo F), em relação ao isolado viral BZ167 (subtipo B), com o passar do tempo, para todas as regiões estudadas, a não ser para a região da integrase, na qual somente o isolado de subtipo B foi detectado, o que sugere fortemente que tenha ocorrido recombinação intergênica.

Os resultados da subtipagem, até então, relevaram a importância de se estudar as estruturas recombinantes e o papel das CRF recentemente descobertas em nossa epidemia, devido à notável presença de seqüências que apresentam os padrões das CRF 28 e 29, bem como de URF.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- BARRE-SINOUSI, F. HIV as the cause of AIDS. Lancet, v.348, n.9019, Jul 6, p.31-5. 1996.
- BARRE-SINOUSI, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, v.220, n.4599, May 20, p.868-71. 1983.
- BENSON, R. E., SANFRIDSON, A., OTTINGER, J. S., DOYLE, C. e CULLEN, B. R. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. J Exp Med, v.177, n.6, Jun 1, p.1561-6. 1993.
- BONGERTZ, V., BOU-HABIB, D. C., BRIGIDO, L. F., CASEIRO, M., CHEQUER, P. J., COUTO-FERNANDEZ, J. C., *et al.* HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. J Acquir Immune Defic Syndr, v.23, n.2, Feb 1, p.184-93. 2000.
- BOULERICE, F., LI, X. G., LVOVICH, A. e WAINBERG, M. A. Recovery of infectious human immunodeficiency virus type 1 after fusion of defectively infected clones of U-937 cells. J Virol, v.65, n.10, Oct, p.5589-92. 1991.
- BUONAGURO, L., DEL GUADIO, E., MONACO, M., GRECO, D., CORTI, P., BETH-GIRALDO, E., *et al.* Heteroduplex mobility assay and phylogenetic analysis of V3 region sequences of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Gulu, northern Uganda. The Italian-Ugandan Cooperation AIDS Program. J Virol, v.69, n.12, Dec, p.7971-81. 1995.
- BURNS, C. C., GLEASON, L. M., MOZAFFARIAN, A., GIACHETTI, C., CARR, J. K. e OVERBAUGH, J. Sequence variability of the integrase protein from a diverse collection of HIV type 1 isolates representing several subtypes. AIDS Res Hum Retroviruses, v.18, n.14, Sep 20, p.1031-41. 2002.
- CALAZANS, A., BRINDEIRO, R., BRINDEIRO, P., VERLI, H., ARRUDA, M. B., GONZALEZ, L. M., *et al.* Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. J Infect Dis, v.191, n.11, Jun 1, p.1961-70. 2005.
- CARR, J. K., AVILA, M., GOMEZ CARRILLO, M., SALOMON, H., HIERHOLZER, J., WATANAVEERADEJ, V., *et al.* Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. AIDS, v.15, n.15, Oct 19, p.F41-7. 2001.
- CHRISTOPHERSON, C., KIDANE, Y., CONWAY, B., KROWKA, J., SHEPPARD, H. e KWOK, S. PCR-Based assay to quantify human immunodeficiency virus type 1 DNA in peripheral blood mononuclear cells. J Clin Microbiol, v.38, n.2, Feb, p.630-4. 2000.
- CLAPHAM, P. R. HIV and chemokines: ligands sharing cell-surface receptors. Trends Cell Biol, v.7, n.7, Jul, p.264-8. 1997.

- CLAPHAM, P. R. e WEISS, R. A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. Nature, v.388, n.6639, Jul 17, p.230-1. 1997.
- CLAVEL, F., GUETARD, D., BRUN-VEZINET, F., CHAMARET, S., REY, M. A., SANTOS-FERREIRA, M. O., *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science, v.233, n.4761, Jul 18, p.343-6. 1986.
- CLAVEL, F., HOGGAN, M. D., WILLEY, R. L., STREBEL, K., MARTIN, M. A. e REPASKE, R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. J Virol, v.63, n.3, Mar, p.1455-9. 1989.
- COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J. A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., *et al.* Human immunodeficiency viruses. Science, v.232, n.4751, May 9, p.697. 1986.
- COFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science, v.267, n.5197, Jan 27, p.483-9. 1995.
- COHEN, M. S., HELLMANN, N., LEVY, J. A., DECOCK, K. e LANGE, J. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. J Clin Invest, v.118, n.4, Apr, p.1244-54. 2008.
- COLLINS, K. L., CHEN, B. K., KALAMS, S. A., WALKER, B. D. e BALTIMORE, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. Nature, v.391, n.6665, Jan 22, p.397-401. 1998.
- CULLEN, B. Posttranscriptional Regulation by the HIV-1 Rev Protein. Seminars in VIROLOGY, v.8, p.327-34. 1998a.
- CULLEN, B. R. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. Cell, v.93, n.5, May 29, p.685-92. 1998b.
- DE BAAR, M. P., TIMMERMANS, E. C., BAKKER, M., DE ROOIJ, E., VAN GEMEN, B. e GOUDSMIT, J. One-tube real-time isothermal amplification assay to identify and distinguish human immunodeficiency virus type 1 subtypes A, B, and C and circulating recombinant forms AE and AG. J Clin Microbiol, v.39, n.5, May, p.1895-902. 2001.
- DE SA FILHO, D. J., SUCUPIRA, M. C., CASEIRO, M. M., SABINO, E. C., DIAZ, R. S. e JANINI, L. M. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses, v.22, n.1, Jan, p.1-13. 2006.
- DELWART, E. L., HERRING, B., RODRIGO, A. G. e MULLINS, J. I. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. PCR Methods Appl, v.4, n.5, Apr, p.S202-16. 1995.
- DELWART, E. L., SHPAER, E. G., LOUWAGIE, J., MCCUTCHAN, F. E., GREZ, M., RUBSAMEN-WAIGMANN, H., *et al.* Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. Science, v.262, n.5137, Nov 19, p.1257-61. 1993.

DIAZ, R. S., SABINO, E. C., MAYER, A., MOSLEY, J. W. e BUSCH, M. P. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. The Transfusion Safety Study Group. J Virol, v.69, n.6, Jun, p.3273-81. 1995.

DOMINGO, E. Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. Clin Diagn Virol, v.10, n.2-3, Jul 15, p.97-101. 1998.

FUSUMA, E. E., CARUSO, S. C., LOPEZ, D. F., COSTA, L. J., JANINI, L. M., DE MENDONCA, J. S., *et al.* Duplication of peri-kappaB and NF-kappab sites of the first human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) transmission in Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses, v.21, n.11, Nov, p.965-70. 2005.

GALLO, R. C., SALAHUDDIN, S. Z., POPOVIC, M., SHEARER, G. M., KAPLAN, M., HAYNES, B. F., *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science, v.224, n.4648, May 4, p.500-3. 1984.

GAO, F., MORRISON, S. G., ROBERTSON, D. L., THORNTON, C. L., CRAIG, S., KARLSSON, G., *et al.* Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. The WHO and NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization. J Virol, v.70, n.3, Mar, p.1651-67. 1996.

GARCIA, J. V. e MILLER, A. D. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. Nature, v.350, n.6318, Apr 11, p.508-11. 1991.

GIBELLINI, D., VITONE, F., SCHIAVONE, P., PONTI, C., LA PLACA, M. e RE, M. C. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR green real-time PCR technique. J Clin Virol, v.29, n.4, Apr, p.282-9. 2004.

GOFF, S. P. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: D. M. Knippe, P. M. Howley e D. E. Griffin (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Retroviridae: the retroviruses and their replication., p.1871-1939

GOH, W. C., ROGEL, M. E., KINSEY, C. M., MICHAEL, S. F., FULTZ, P. N., NOWAK, M. A., *et al.* HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. Nat Med, v.4, n.1, Jan, p.65-71. 1998.

GOILA-GAUR, R. e STREBEL, K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. Retrovirology, v.5, p.51. 2008.

GOLOVKINA, T. V., JAFFE, A. B. e ROSS, S. R. Coexpression of exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus RNA in vivo results in viral recombination and broadens the virus host range. J Virol, v.68, n.8, Aug, p.5019-26. 1994.

GONDA, M. A., WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C., CLEMENTS, J. E., NARAYAN, O. e GILDEN, R. V. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. Science, v.227, n.4683, Jan 11, p.173-7. 1985.

GONZALEZ, L. M., BRINDEIRO, R. M., TARIN, M., CALAZANS, A., SOARES, M. A., CASSOL, S., *et al.* In vitro hypersusceptibility of human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease to lopinavir. Antimicrob Agents Chemother, v.47, n.9, Sep, p.2817-22. 2003.

GOODRICH, D. W. e DUESBERG, P. H. Retroviral recombination during reverse transcription. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.6, Mar, p.2052-6. 1990.

GOTTLIEB, M. S., SCHROFF, R., SCHANKER, H. M., WEISMAN, J. D., FAN, P. T., WOLF, R. A., *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med, v.305, n.24, Dec 10, p.1425-31. 1981.

GUIMARAES, M. L., EYER-SILVA, W. A., COUTO-FERNANDEZ, J. C. e MORGADO, M. G. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. AIDS, v.22, n.3, Jan 30, p.433-5. 2008.

HEYNDRICKX, L., JANSSENS, W., ZEKENG, L., MUSONDA, R., ANAGONOU, S., AUWERA, G., *et al.* Simplified Strategy for Detection of Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M Isolates by gag/env Heteroduplex Mobility Assay. Journal of Virology, v.74, n.1, p.363-70. 2000.

HOELSCHER, M., DOWLING, W. E., SANDERS-BUELL, E., CARR, J. K., HARRIS, M. E., THOMSCHKE, A., *et al.* Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay. AIDS, v.16, n.15, Oct 18, p.2055-64. 2002.

HU, W. S. e TEMIN, H. M. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.4, Feb, p.1556-60. 1990.

JANINI, L. M., PIENIAZEK, D., PERALTA, J. M., SCHECHTER, M., TANURI, A., VICENTE, A. C., *et al.* Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. Virus Genes, v.13, n.1, p.69-81. 1996.

JANINI, L. M., TANURI, A., SCHECHTER, M., PERALTA, J. M., VICENTE, A. C., DELA TORRE, N., *et al.* Horizontal and vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 dual infections caused by viruses of subtypes B and C. J Infect Dis, v.177, n.1, Jan, p.227-31. 1998.

JOST, S., BERNARD, M. C., KAISER, L., YERLY, S., HIRSCHL, B., SAMRI, A., *et al.* A patient with HIV-1 superinfection. N Engl J Med, v.347, n.10, Sep 5, p.731-6. 2002.

KELLAM, P. e LARDER, B. A. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. J Virol, v.69, n.2, Feb, p.669-74. 1995.

KOZAL, M. J., SHAH, N., SHEN, N., YANG, R., FUCINI, R., MERIGAN, T. C., *et al.* Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. Nat Med, v.2, n.7, Jul, p.753-9. 1996.

LE GALL, S., ERDTMANN, L., BENICHO, S., BERLIOZ-TORRENT, C., LIU, L., BENAROUS, R., *et al.* Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. Immunity, v.8, n.4, Apr, p.483-95. 1998.

LEVY, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol Rev, v.57, n.1, Mar, p.183-289. 1993.

LEVY, J. A. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. Adv Dent Res 2006. 10-6 p.

LEVY, J. A., HOFFMAN, A. D., KRAMER, S. M., LANDIS, J. A., SHIMABUKURO, J. M. e OSHIRO, L. S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. Science, v.225, n.4664, Aug 24, p.840-2. 1984.

LIMA, M. Análise de correlação entre eventos de hipermutação e carga viral em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Disciplina de Infectologia - Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009. 110 p.

MALIM, M. H., HAUBER, J., LE, S. Y., MAIZEL, J. V. e CULLEN, B. R. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. Nature, v.338, n.6212, Mar 16, p.254-7. 1989.

MANSKY, L. M. e TEMIN, H. M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. J Virol, v.69, n.8, Aug, p.5087-94. 1995.

MASUR, H., MICHELIS, M. A., GREENE, J. B., ONORATO, I., STOUWE, R. A., HOLZMAN, R. S., *et al.* An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N Engl J Med, v.305, n.24, Dec 10, p.1431-8. 1981.

MCDERMOTT, J. L., GIRI, A. A., MARTINI, I., BONO, M., GIACOMINI, M., CAMPELLI, A., *et al.* Level of human immunodeficiency virus DNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with efficacy of antiretroviral therapy. J Clin Microbiol, v.37, n.7, Jul, p.2361-5. 1999.

MORGADO, M. G., GUIMARAES, M. L. e GALVAO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.2, Mar, p.143-50. 2002.

MORRIS, A., MARSDEN, M., HALCROW, K., HUGHES, E. S., BRETTLE, R. P., BELL, J. E., *et al.* Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations. J Virol, v.73, n.10, Oct, p.8720-31. 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

MOUTOUH, L., CORBEIL, J. e RICHMAN, D. D. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.12, Jun 11, p.6106-11. 1996.

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

NOLAN, T., HANDS, R. E. e BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc, v.1, n.3, p.1559-82. 2006.

ONDOA, P., DAVIS, D., WILLEMS, B., HEYNDRICKX, L., KESTENS, L., VAN DER BERG, I., *et al.* Genetic variability of the V1 and V2 env domains of SIVcpz-ant and neutralization pattern of plasma viruses in a chimpanzee infected naturally. J Med Virol, v.65, n.4, Dec, p.765-76. 2001.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.

PIENIAZEK, D., PERALTA, J. M., FERREIRA, J. A., KREBS, J. W., OWEN, S. M., SION, F. S., *et al.* Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction. AIDS, v.5, n.11, Nov, p.1293-9. 1991.

PROUDFOOT, A. E., WELLS, T. N. e CLAPHAM, P. R. Chemokine receptors--future therapeutic targets for HIV? Biochem Pharmacol, v.57, n.5, Mar 1, p.451-63. 1999.

ROBERTSON, D. L., ANDERSON, J. P., BRADAC, J. A., CARR, J. K., FOLEY, B., FUNKHOUSER, R. K., *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. Science, v.288, n.5463, Apr 7, p.55-6. 2000.

ROSS, T. M., ORAN, A. E. e CULLEN, B. R. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. Curr Biol, v.9, n.12, Jun 17, p.613-21. 1999.

SA-FILHO, D. J. CARACTERIZAÇÃO DE SUBTIPOS E DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1) EM AMOSTRAS DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO - SP. (Doutorado). Disciplina de Infectologia - Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003. 75 p.

SA FILHO, D. J., SANABANI, S., DIAZ, R. S., MUNERATO, P., BRUNSTEIN, A., FUSUMA, E., *et al.* Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in Sao Paulo, Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses, v.21, n.2, Feb, p.145-51. 2005.

SABINO, E. C., SHPAER, E. G., MORGADO, M. G., KORBER, B. T., DIAZ, R. S., BONGERTZ, V., *et al.* Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. J Virol, v.68, n.10, Oct, p.6340-6. 1994.

SANTOS, A. F., SOUSA, T. M., SOARES, E. A., SANABANI, S., MARTINEZ, A. M., SPRINZ, E., *et al.* Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. AIDS, v.20, n.16, Oct 24, p.2011-9. 2006.

- SAUNDERS, N. A. Quantitative Real-Time PCR. In: K. Edwards, J. Logan e N. A. Saunders (Ed.). REAL-TIME PCR, AN ESSENCIAL GUIDE. London: Horizon Bioscience, 2004. Quantitative Real-Time PCR, p.103-123
- SIMMONDS, P., BALFE, P., LUDLAM, C. A., BISHOP, J. O. e BROWN, A. J. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. J Virol, v.64, n.12, Dec, p.5840-50. 1990.
- SIMMONS, G., REEVES, J. D., HIBBITTS, S., STINE, J. T., GRAY, P. W., PROUDFOOT, A. E., *et al.* Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. Immunol Rev, v.177, Oct, p.112-26. 2000.
- SRINIVASAN, A., YORK, D., JANNOUN-NASR, R., KALYANARAMAN, S., SWAN, D., BENSON, J., *et al.* Generation of hybrid human immunodeficiency virus by homologous recombination. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.16, Aug, p.6388-92. 1989.
- STUHLMANN, H. e BERG, P. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. J Virol, v.66, n.4, Apr, p.2378-88. 1992.
- TATT, I. D., BARLOW, K. L. e CLEWLEY, J. P. A gag gene heteroduplex mobility assay for subtyping HIV-1. J Virol Methods, v.87, n.1-2, Jun, p.41-51. 2000.
- TEMIN, H. M. Sex and recombination in retroviruses. Trends Genet, v.7, n.3, Mar, p.71-4. 1991.
- THOMSON, M. M., SIERRA, M., TANURI, A., MAY, S., CASADO, G., MANJON, N., *et al.* Analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Brazil reveals their independent origins and their lack of relationship to CRF12_BF. AIDS Res Hum Retroviruses, v.20, n.10, Oct, p.1126-33. 2004.
- TUMAS, K. M., POSZGAY, J. M., AVIDAN, N., KSIAZEK, S. J., OVERMOYER, B., BLANK, K. J., *et al.* Loss of antigenic epitopes as the result of env gene recombination in retrovirus-induced leukemia in immunocompetent mice. Virology, v.192, n.2, Feb, p.587-95. 1993.
- VAISHNAV, Y. N. e WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. Annu Rev Biochem, v.60, p.577-630. 1991.
- WAINBERG, M. A. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. AIDS, v.18 Suppl 3, Jun, p.S63-8. 2004.
- WILLEY, R. L., MALDARELLI, F., MARTIN, M. A. e STREBEL, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. J Virol, v.66, n.12, Dec, p.7193-200. 1992.
- WOOLEY, D. P., SMITH, R. A., CZAJAK, S. e DESROSIERS, R. C. Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey. J Virol, v.71, n.12, Dec, p.9650-3. 1997.
- YAMAGUCHI-KABATA, Y. [Sequence variation of HIV and bioinformatics]. Uirusu, v.54, n.1, Jun, p.33-8. 2004.

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](#)